

Sommaire

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS.....	II
SOMMAIRE.....	VI
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES PHOTOS.....	XV
RESUME	XVI
ABSTRACT	XVII
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
CHAPITRE 1 : HISTORIQUE DE LA THA	5
1.1. Première description de la THA	5
1.2. Identification de l'agent pathogène.....	5
1.3. Evolution de la THA au cours du 20^{ème} siècle à nos jours	6
CHAPITRE 2 : LES TRYpanosomes.....	10
2.1. Taxonomie	10
2.2. Morphologie et cycle évolutif.....	13

2.3. Mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire	15
2.3.1. Glycoprotéines variables de surface et variation antigénique	15
2.3.2. Résistance au sérum humain.....	17
CHAPITRE 3 : DIVERSITE CLINIQUE, DIAGNOSTIC, ET TRAITEMENT DE LA THA ...	20
3.1. Diversité clinique résultant de l'infection par <i>T. b. gambiense</i>	20
3.2. Diagnostic de la THA.....	24
3.2.1. Diagnostic indirect.....	24
3.2.2. Diagnostic direct.....	25
3.2.3. Diagnostic de phase.....	26
3.2.4. Les limites du Diagnostic de la THA.....	27
3.3. Traitement de la THA.....	31
CHAPITRE 4 : FACTEURS GENETIQUES ET IMMUNOLOGIQUES ASSOCIES A LA SUSCEPTIBILITE/RESISTANCE A L'INFECTION PAR LES TRYPANOSOMES.....	33
4.1. FACTEURS PARASITAIRES ET DIVERSITE CLINIQUE DANS LA THA.....	33
4.1.1. Variabilité génétique des souches et diversité de réponses à l'infection	33
4.1.2. Facteurs parasitaires influençant la diversité de réponses à l'infection	34
4.1.2.1 Infection à <i>T. b. brucei</i> et diversité de réponses dans le modèle Souris	34
4.1.2.2. Infection à <i>T. b. gambiense</i> et diversité de réponses dans le modèle souris.....	35
4.2. VARIABILITE « GENETIQUE » DE L'HOTE ET DIVERSITE DE REPONSES A L'INFECTION	36
4.2.1. Apport des modèles expérimentaux.....	36
4.2.1.1. Contrôle génétique des trypanosomes chez les bovins	36
4.2.1.1.1. Approche génétique	36
4.2.1.1.2. Approche transcriptomique	37
4.2.1.2. Contrôle génétique des trypanosomes chez les souris	39
4.3. GENETIQUE HUMAINE ET THA.....	41
4.3.1. Arguments indirects en faveur d'une composante génétique chez l'Homme.....	41

4.3.2. Association génétique et cytokines	42
4.4. LA REPONSE IMMUNITAIRE DE L'HOTE DANS LES TRYPANOSOMOSES AFRICAINES.....	44
4.4.1. Les études immunologiques chez la souris	44
4.4.2. Les études immunologiques chez l'Homme	48
CHAPITRE 5 : PROBLEMATIQUE.....	50
DEUXIEME PARTIE : METHODOLOGIE.....	52
CHAPITRE 1 : ZONES D'ETUDES ET PROSPECTIONS MEDICALES.....	52
1.1. Présentation des zones d'études	53
1.1.1. Le foyer de Forécariah.....	54
1.1.2. Le foyer de Dubréka	55
1.1.3. Le foyer de Boffa	56
1.2. Dépistage et inclusion des sujets	56
1.2.1. Préparation de la prospection médicale	56
1.2.2. Prospection médicale	57
1.2.3. Inclusion des sujets	59
1.2.4. Suivi des trypanosomés et des séropositifs.....	60
1.3. Diagnostic parasitologique : amélioration de la sensibilité de la mAECT	61
1.4. Résultats des prospections médicales dans les 3 foyers	64
CHAPITRE 2 : ACTIVITES DE LABORATOIRE	68
2.1. Méthodologie pour la définition des phénotypes de l'étude	68
2.1.1. PCR diagnostique TBR1/TBR2.....	68
2.1.2. Trypanolyse	69
2.2. Méthodologie pour le dosage des cytokines.....	70
2.2.1. Dosage des cytokines par Cytométrie en flux : utilisation de la technique Cytometric Bead Array (CBA)	70
2.2.1.1. Principe	70

2.2.1.2. Mode opératoire du CBA	73
2.3. Méthodologie pour la quantification de l'expression du gène <i>APOL1</i>.....	74
2.3.1. Extraction d'ARN	74
2.3.2. Vérification de la quantité et de la qualité des ARNs extraits	75
2.3.3. Rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaires (ADNc)	75
2.3.4. Real Time Quantitative-PCR (RTQ-PCR).....	76
2.3.4.1. Principe de la RTQ-PCR	77
2.3.4.2. Choix du contrôle endogène (gène ubiquitaire) et design des amorces	79
2.3.4.3. Détermination de l'efficacité des réactions d'amplifications.....	81
2.3.4.4. Méthode de quantification.....	82
CHAPITRE 3 : ANALYSES STATISTIQUES	83
3.1. Analyse statistique pour les études épidémiologiques dans le foyer de Forécariah.....	83
3.2. Analyse statistique pour l'étude immunologique	83
3.2. Analyse statistique pour la quantification de <i>APOL1</i>	83
TROISIEME PARTIE : RESULTATS	85
I. Etude épidémiologique dans le foyer de Forécariah	85
I.1. Répartition géographique et prévalence de la THA dans la zone d'étude	85
I.2. Caractéristiques diagnostiques dans le foyer de Forécariah.....	88
I.3. Evolution temporelle du statut des trypanosomés et des SERO au cours de leur suivi	90
II. Caractérisation du statut SERO TL+ sur l'ensemble des foyers du littoral guinéen.....	94
III. Etude immunologique : déterminants immunologiques du contrôle de l'infection à <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> chez l'homme.....	99
III.1. Profil cytokinique dans le LCR et dans le plasma chez les individus trypanosomés dans les différentes phases de la maladie	99
III.2. Comparaison des profils cytokiniques du plasma entre les trypanosomés, les SERO TL ⁺ et les contrôles endémiques.....	101
III.3. Analyses multivariées des profils cytokiniques chez les trypanosomés et les SERO TL ⁺	102
III.4. Valeur pronostique des cytokines sur l'évolution de l'infection chez les individus SERO TL ⁺	106
IV. Etude moléculaire : l'expression d'<i>APOL1</i> est induite par <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> mais n'est pas associée au contrôle de l'infection	108
IV.1. L'expression d' <i>APOL1</i> : un trait phénotypique au déterminisme complexe.	108

IV.2. Nature de la relation entre l'infection par <i>T. b. gambiense</i> et l'expression d' <i>APOL1</i>	112
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	114
I. Dicussion des résultats de l'étude épidémiologique dans le Foyer de Forécariah et sur l'ensemble des foyers du littoral guinéen.....	115
I.1. Epidémiologie de la THA dans le foyer de Forécariah	115
I.2. Spécificités du diagnostic et du traitement.....	115
I.3. Séropositifs et trypanotolérance humaine.....	116
II. Quantification d' <i>APOL1</i> et le lien entre les différents phénotypes clinique de la THA.	120
III. Discussion des résultats de l'étude immunologique	121
III.1. Dans le LCR, IL-10, IL-8 et IL-6 sont des marqueurs de la deuxième phase avancée.	121
III.2. Inflammation, immunité innée et contrôle de l'infection	122
CONCLUSION.....	126
PERSPECTIVES	127
1. Clarification du rôle épidémiologique des individus trypanotolérants.....	127
2. Facteurs responsables de la diversité de réponses à l'infection	127
RECOMMANDATIONS	130
1. Pour la recherche thérapeutique.....	130
2. Aux PNLTHA	130
BIBLIOGRAPHIE	132
ANNEXES	I
Annexe 1 : questionnaire épidémiologique et clinique.....	I
Annexe 2 : déroulement d'une prospection médicale	III
Annexe 3 : Publications	VI

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APOL1	Apolipoprotéine L1
ARN	Acide ribonucléique
CATT	Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (test d'agglutination pour la trypanosomiase humaine africaine)
CBA	Cytometric Bead Array
CIRDES	Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone subhumide
Hb	Hémoglobine
HDL	High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HPR	Haptoglobin Related Protéine (protéine apparentée à l'haptoglobine)
IFN- γ	Interféron-gamma
IL-1 β	Interleukine-1 beta
IPR	Institut Pierre Richet
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
mAECT	miniature Anion Exchange Centrifugation Technique (technique de filtration sur mini-colonne échangeuse d'anions)
NECT	Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy (Combinaison thérapeutique de nifurtimox et d'éflornithine)
OMS	Organisation Mondial de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne de la polymérase)
PNLTHA	Programme National de Lutte contre la THA
QTL	Quantitative Trait Loci (loci à caractère quantitatif)
RDC	République Démocratique du Congo
RTQ PCR	Real Time Quantitative-PCR (PCR quantitative à temps réel)
SERO TL $^-$	Séropositif négatif au test de la Trypanolyse
SERO TL $^+$	Séropositif positif au test de la Trypanolyse
SERO	Séropositif
SNC	Système Nerveux Central
SRA	Serum Resistance-Associated (sérum associé à la résistance)
T $^+$	Trypanosomé
THA	Trypanosomose Humaine Africaine
TL	Trypanolyse
TL $^-$	Trypanolyse négatif
TL $^+$	Trypanolyse positif
TLF	Trypanolytic Factor (facteur trypanolytique)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)
VAT	Variant Antigen Type (Antigène variant)
VSG	Variable Surface Glycoprotein (glycoprotéine variable de surface)

Liste des figures

Figure 1 : Evolution de la THA en Afrique de 1939 à 2004 (Steverding, 2008).....	7
Figure 2 : Situation actuelle de la THA.....	9
Figure 3 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes (Keeling <i>et al.</i> , 2009).....	12
Figure 4 : Divergence génétique des taxons au sein du sous genre <i>Trypanozoon</i> (Gibson, 2007).....	12
Figure 5 : Constituants fondamentaux d'un trypanosome.....	13
Figure 6 : Cycle de vie du trypanosome.....	15
Figure 7 : Représentation schématique de l'évolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps, illustration du phénomène de la variation antigénique.	17
Figure 8 : Le facteur trypanolytique humain (Pays et Vanhollebeke, 2008).	19
Figure 9 : Chromosomes humains et synténie avec les QTLS bovins et souris en regard de la résistance/susceptibilité à l'infection par les trypanosomes (Courtin <i>et al.</i> , 2008).....	44
Figure 10 : Interaction hôte-parasite, model d'activation classique (caMΦ) et alternative des macrophages (aaMΦ) durant l'infection par les trypanosomes africains (Baetselier <i>et al.</i> , 2001).	46
Figure 11 : Equilibre entre l'oxyde nitrique synthétase et l'arginase, et l'effet des macrophages sur les trypanosomes (Vincendeau <i>et al.</i> , 2003).	47
Figure 12 : Carte de la Guinée et localisation des zones d'études.	52
Figure 13 : Stratégie classique de dépistage de masse de la Trypanosomose Humaine Africaine.	58
Figure 14 : Evaluation expérimentale et sur le terrain de la technique de filtration sur mini-colonne échangeuse d'anions (mAECT-bc).....	63
Figure 15 : Cartes de répartition des trypanosomés et des SERO dans les zones d'études.	67
Figure 16 : La Trypanolyse est un marqueur de la transmission active de la Trypanosomose Humaine Africaine.	70
Figure 17 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux	72

Figure 18 : Analyse multiplexée d'interleukines par cytométrie en flux (Lizard <i>et al.</i> , 2004).73	
Figure 19 : Présentation des différentes étapes d'une réaction de RTQ-PCR utilisant le Syber Green I comme système de détection des amplicons (Poitras et Houde, 2002).....77	
Figure 20 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (Tse et Capeau, 2003)78	
Figure 21 : Concentration des amorces (sens et anti-sens) du GAPDH en fonction du ct.....80	
Figure 22 : Concentration des amorces (sens et anti-sens) d'APOL1 en fonction du ct.....81	
Figure 23 : Répartition géographique des trypanosomés et des SERO dans le foyer de Forécariah.....87	
Figure 24 : Distribution des signes cliniques en fonction du statut de la THA.....90	
Figure 25 : Suivi des sujets de l'étude dans le foyer de Forécariah.93	
Figure 26 : Evolution du statut sérologique et parasitologique des SERO TL ⁺95	
Figure 27 : Prévalence de la THA et séroprévalence sur l'ensemble des foyers du littoral guinéen.97	
Figure 28 : Profil des cytokines IL-10, IL-8 et IL-6 dans le LCR en fonction des phases de la THA.....100	
Figure 29 : Profil des cytokines IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α et INF- γ dans le plasma en fonction des phases de la THA.101	
Figure 30 : Profil des cytokines plasmatiques chez les SERO TL ⁺ , les trypanosomés et les contrôles endémiques.102	
Figure 31 : Analyse en Composante principale.104	
Figure 32 : Evolution du statut sérologique et parasitologique des SERO TL ⁺107	
Figure 33 : Valeur pronostique des cytokines mesurée à l'inclusion sur l'évolution du statut SERO TL ⁺107	
Figure 34 : Variabilité de l'expression d'APOL1 dans la population d'étude.110	
Figure 35 : Evolution d'un foyer de THA119	
Figure 36 : Mécanisme immunologique du contrôle des trypanosomes chez les SERO TL ⁺ 125	

Liste des tableaux

Tableau I : Bilan des prospections médicales menées dans les 3 foyers de 2007 à 2011	64
Tableau II : Concentrations utilisées pour la détermination des concentrations optimales de nos amorces.	80
Tableau III : Amorces utilisées pour la RTQ-PCR	82
Tableau IV : Résultats des prospections médicales et des activités de suivi	86
Tableau V : Spécificités du diagnostic à Forécariah.	89
Tableau VI : Pourcentage des différents phénotypes caractérisés	98
Tableau VII : Analyse par régression logistique des profils cytokiniques chez les trypanosomés et les SERO TL ⁺	105
Tableau VIII : Effet des variables enregistrées sur les niveaux d'expression d'APOL1.	111
Tableau IX : Analyse multivariée par régression linéaire de l'effet de la parasitémie sanguine (1-) et du statut clinique (2-) sur l'expression d'APOL1 en fonction du foyer.....	113

Liste des photos

Photo 1: <i>Trypanosoma brucei</i> sp (www.sleeping-sickness.com)	13
Photo 2 : Exemples de signes cliniques de la THA.....	22
Photo 3 : Exemple de méthodes directes utilisées dans le diagnostic de la THA (source IRD/CIRDES).	26
Photo 4 : Ponction lombaire (Source : IRD/CIRDES).....	27
Photo 5 : Différents faciès favorables à la transmission de la THA en zone de mangrove (source IRD/CIRDES).....	54
Photo 6 : CATT sang et CATT plasma (source IRD/CIRDES).....	59
Photo 7 : Révélation d'une PCR sur gel d'agarose (source : IRD/CIRDES).....	68
Photo 8 : Nanodrop ND 1000 (source IRD/CIRDES).	75
Photo 9 : Migration des ARNs extraits sur gel d'agarose (1%) (source IRD/CIRDES).....	75

Résumé

En Afrique de l'Ouest, la Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est causée par *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*). Classiquement, la maladie se caractérise par une phase lymphatico-sanguine (stade 1) suivie d'une phase méningo-encéphalique (stade 2) conduisant à des troubles neurologiques et à la mort en absence de traitement. Cependant de nombreuses observations de terrain suggèrent qu'une diversité d'évolutions cliniques plus importante résulte de l'infection par *T. b. gambiense* allant d'une progression rapide vers le stade 2 de la maladie à des infections asymptomatiques pouvant durer plusieurs années, voir même des guérisons spontanées en l'absence de traitement. En particulier, on peut noter qu'en zone d'endémie, une importante proportion des individus positifs aux tests sérologiques, appelés séropositifs (SERO), est négative aux tests parasitologiques, un statut que certains auteurs associent à l'existence d'un phénotype de trypanotolérance humaine, comme cela est observé dans les modèles souris ou chez les bovins. Cette thèse réalisée dans les foyers actifs du littoral guinéen, avait pour objectif la caractérisation fine de cette diversité de réponses à l'infection. Celle-ci a été réalisée par des prospections médicales, des suivis longitudinaux de malades après traitement et d'individus SERO, ainsi que par l'application de tests plus spécifiques (Trypanolyse, TL) et plus sensibles (PCR) que ceux utilisables sur le terrain. Les résultats de ces enquêtes épidémiologiques ont permis notamment de caractériser une importante diversité au sein du groupe SERO TL⁺ : (i) parasitémie devenant détectable au cours du suivi; (ii) maintien d'une sérologie élevée dans le temps (> 2ans); (iii) négativation progressive de la sérologie. Ces résultats suggèrent fortement qu'une partie des SERO TL⁺ contrôlent l'infection à des niveaux de parasitémies indétectables par les tests parasitologiques utilisés sur le terrain. Dans un deuxième temps, les échantillons de plasma et d'ARNs sanguins collectés lors des études de terrain ont permis d'étudier les mécanismes moléculaires et immunologiques qui caractérisent la trypanotolérance humaine. Nous avons ainsi pu montrer que si l'infection par *T. b. gambiense* semble induire l'expression du gène *APOL1*, dont le produit joue un rôle central dans l'immunité innée dirigée contre les trypanosomes, aucune différence n'a été observée entre les malades et les individus SERO TL⁺. Au contraire, d'importantes différences ont été observées au niveau des profils de cytokines entre ces deux groupes d'individus. Chez les SERO TL⁺, on observe une réponse inflammatoire marquée avec de forte concentration d'IL-8, d'IL-6 et de TNF- α en contraste avec le profil observé chez les malades où l'on trouve essentiellement des cytokines de la réponse cellulaire T adaptative (IL-2, IL-4 et IL-10). Par ailleurs, chez les SERO TL⁺, les niveaux d'IL-10 (forts) et de TNF- α (faibles) d'une part et les niveaux d'IL-8 (forts) d'autre part sont prédictifs de l'évolution ultérieure du statut parasitologique (développement d'une parasitémie détectable) et sérologique (négativation) respectivement. Globalement, ces résultats suggèrent que chez l'homme, neutrophiles et immunité innée jouent un rôle déterminant dans le contrôle de l'infection par *T. b. gambiense* et ouvrent de nouvelles perspectives pour l'identification de nouvelles cibles diagnostiques ou thérapeutiques.

Mots clefs : séropositifs, *T. b. gambiense*, trypanolyse, cytokines, APOL1, Guinée, Trypanosomose Humaine Africaine.

Abstract

In West Africa, human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is caused by *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*). Classically, the disease is characterised by an early haemolymphatic phase (stage 1) followed by a meningoencephalitic phase (stage 2) leading to neurological disorders and death if left untreated. However, field observations suggest that a great diversity of clinical outcomes result from the infection by *T. b. gambiense* ranging from rapid progressions to stage 2, asymptomatic infections that can last for years or even spontaneous cure in the absence of treatment. In particular, in *T. b. gambiense* endemic area a high proportion of individuals displaying positive serological results, called seropositives (SERO), are negative to direct parasitological investigations, a status that some authors associate to the existence of a human trypanotolérance phenotype, as observed in mice models or in cattle. This thesis, carried out in the active foci of costal Guinea, had for objective the characterization of the diversity of response to *T. b. gambiense* infection. This was carried out through medical surveys, longitudinal follow-up of SERO individuals and patients after treatment as well as by the application of more specific (Trypanolysis, TL) and more sensitive (PCR) tools than those available in the field. The result of these epidemiological investigations enabled to characterize an important diversity within the SERO TL⁺ group: (i) parasitaemia becoming detectable during the follow-up, (ii) maintenance of high serology over time (> 2ans), (iii) progressive negativation of serology. These results strongly suggest that a part of SERO TL⁺ are able to control infection to levels that are undetectable by the parasitological tests used in the field. In a second step, plasma and blood RNA samples collected during the field surveys have allowed to study the molecular and immunological mechanisms underlying human trypanotolerance. We have shown that if the infection by *T. b. gambiense* appears to induce expression of the *APOL1* gene, the product of which plays a central role in innate immunity to trypanosomes, no differences were observed between patients and SERO individuals. On the contrary, significant differences were observed in the cytokine profiles between these two groups of individuals. In SERO TL⁺ individuals, we observed a marked inflammatory response with high levels of IL-8, IL-6 and TNF- α in contrast to the profile observed in the patients where essentially cytokines of the adaptive cellular response T (IL-2, IL-4, and IL-10) were found. Interestingly, in SERO TL⁺ the levels of IL-10 (high) and TNF- α (low) on hand and the levels of IL-8 (high) on the other hand were predictive of the subsequent evolution of the parasitological (development of detectable parasitaemia) and serological (negativation) status respectively. Globally, these results suggest that in humans, innate immunity and neutrophils play a determining role in the control of infection by *T. b. gambiense* and open new perspectives for the identification of new diagnostic or therapeutic targets.

Keywords: seropositives, *T. b. gambiense*, trypanolysis, cytokines, APOL1, Guinea, human African trypanosomiasis

Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est due à un protozoaire flagellé du genre *Trypanosoma* dont la transmission est assurée par la glossine communément appelée mouche tsé-tsé. La THA a émergé/ré-émergé ce dernier siècle à l'échelle du continent africain. Après une situation épidémique dans les années 1900 à 1940, la THA a été déclarée sous contrôle dans les années 1960. Cependant, on a assisté depuis les années 1970 à une recrudescence progressive du nombre de cas et la maladie a retrouvé, à la fin des années 1990, une situation aussi alarmante que celle du début du siècle. En 1998 et 1999, 45 000 nouveaux cas ont été reportés chaque année et en 2000, on estimait entre 300 000 à 500 000 le nombre d'individus infectés (Cattand *et al.*, 2001). Face à cette situation, les Programmes Nationaux de Lutte contre la THA (PNLTHA) des pays endémiques ont intensifié leurs efforts de lutte grâce notamment à un apport financier conséquent de l'OMS et un appui de plusieurs ONG et Institutions de Recherche du nord et du sud, telles que l'IRD, le CIRDES, mais aussi l'IPR Côte d'Ivoire et l'IMT Anvers, le Swiss Trop Institute. Les résultats semblent prometteurs puisque l'OMS vient d'annoncer un déclin significatif du nombre de cas reportés qui est passé en dessous de 10 000 pour la première fois depuis 50 ans (WHO, 2011). En Afrique de l'Ouest, la situation est moins sévère qu'en Afrique Centrale. Si dans de nombreux foyers historiques, la maladie semble actuellement absente (Sénégal, Togo, Bénin, Burkina-Faso, Mali), (Simarro *et al.*, 2011), la Guinée est actuellement le pays le plus touché par la maladie en Afrique de l'Ouest principalement sur le littoral (Camara *et al.*, 2005; Simarro *et al.*, 2008; Simarro *et al.*, 2011). C'est donc dans ce pays de la sous-région que doivent se concentrer les efforts de lutte.

Chez l'homme, la plupart des trypanosomes africains sont lysés par le facteur trypanolytique du sérum humain (TLF-1) (Pays et Vanhollebeke, 2009). Le TLF-1 est une sous catégorie de lipoprotéines de haute densité contenant deux protéines spécifiques des primates, l'apolipoprotéine L-1 (APOL1) et l'HPR (haptoglobin-related protein ou protéine apparentée à l'haptoglobine) qui constituent donc des composants importants de l'immunité innée vis à vis des trypanosomes. Seuls deux sous espèces de trypanosomes, *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) sont capables d'infecter l'homme et provoquer la THA car ils ont développé une résistance à la lyse par le TLF (Pays *et al.*, 2006). Chez l'homme, l'infection par ces parasites évolue en

deux phases. Durant la première phase, lymphatique-sanguine (phase 1), le parasite se multiplie sans signes cliniques spécifiques associés. La deuxième phase, méningo-encéphalique (phase 2), est déterminée par le passage du parasite dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et se caractérise par des troubles neurologiques qui entraînent la mort du patient en l'absence de traitement. Classiquement, dans le cas de la THA à *T. b. gambiense* qui sévit en Afrique de l'Ouest et Centrale, la première période est très variable (pouvant durer plusieurs années), les symptômes sont peu prononcés et l'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième période est souvent très progressive. A l'inverse dans le cas d'une infection à *T. b. rhodesiense* (Afrique de l'Est), la phase lymphatique-sanguine ne dure que quelques semaines à quelques mois, les symptômes sont plus marqués, l'atteinte du système nerveux est brutale et la mort peut survenir en quelques mois.

La THA a été pendant longtemps considérée comme une maladie fatale dans 100% des cas, cependant les observations de terrain et plusieurs études ont montré que ce n'est pas toujours le cas (Checchi *et al.*, 2008; Sternberg et Maclean, 2010; Bucheton *et al.*, 2011). En fait, l'infection par *T. b. gambiense* en Afrique de l'Ouest et Centrale se caractérise par une importante diversité clinique allant de formes asymptomatiques (Jamonneau *et al.*, 2002; Jamonneau *et al.*, 2004; Checchi *et al.*, 2008) à des infections aiguës (Truc *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2000), des guérisons spontanées étant même suspectées (Jamonneau *et al.*, 2000a; Jamonneau *et al.*, 2004). Par ailleurs, certains individus vivant en zone d'endémie, présentent une réactivité immunologique (stable dans le temps) vis-à-vis des antigènes de trypanosomes sans que les trypanosomes ne puissent être mis en évidence malgré des recherches répétées (Garcia *et al.*, 2000). Une partie de ces individus appelés séropositifs (SERO), chez qui de l'ADN parasitaire peut-être mis en évidence par PCR (Kabiri *et al.*, 1999; Koffi *et al.*, 2006), sont suspectés d'être des porteurs asymptomatiques de trypanosomes (Garcia *et al.*, 2006). N'étant généralement pas traités, ils pourraient contribuer au maintien de la transmission en zone d'endémie malgré les efforts de lutte entrepris par les programmes nationaux (Bucheton *et al.*, 2011).

Le déterminisme de cette diversité clinique est encore mal connu mais repose certainement en grande partie sur la nature des interactions entre le trypanosome et son hôte. Il doit être recherché à la fois chez le parasite (variabilité génétique) et chez l'hôte (susceptibilité individuelle à la maladie). Concernant les facteurs génétiques de l'hôte, leur existence a été démontrée pour de nombreuses maladies infectieuses comme la lèpre ou la tuberculose (Burgner *et al.*, 2006), ou parasitaires : schistosomiase (Marquet *et al.*, 1996),

paludisme (Abel *et al.*, 1991; Garcia *et al.*, 1998) et leishmaniose (Bucheton *et al.*, 2003). L'importance de ces facteurs génétiques dans le contrôle des infections dues aux trypanosomes africains a également été clairement démontrée dans les modèles animaux d'infection, aboutissant à la localisation de QTLs (Quantitative Trait Loci ou loci à caractère quantitatif) de résistance/susceptibilité à la fois sur les chromosomes murins et bovins (Iraqi *et al.*, 2000; Hanotte *et al.*, 2003). Chez l'homme, deux études menées en Côte d'Ivoire et en République Démocratique du Congo (RDC) ont mis en évidence des associations génétiques entre des polymorphismes de gènes de cytokines et un risque variable de développer la THA (Courtin *et al.*, 2006a; Courtin *et al.*, 2007). Par ailleurs, une étude récente a montré que deux variants d'APOL1 associés au développement de la maladie rénale chez les Afro-Américains, étaient capables de lyser *in vitro* des souches de *T. b. rhodesiense* mais pas *T. b. gambiense* (Genovese *et al.*, 2010). Ces polymorphismes d'APOL1 pourraient être impliqués dans le déterminisme de la susceptibilité humaine à l'infection à *T. b. rhodesiense* mais ils pourraient être moins importants dans l'infection à *T. b. gambiense*, espèce pour laquelle les mécanismes de résistance au sérum humain ne sont pas encore complètement établis (Kieft *et al.*, 2010). Bien que peu d'études soient encore disponibles, ces résultats suggèrent que chez l'homme également, l'infection par les trypanosomes, est en partie contrôlée par des facteurs génétiques de l'hôte (Bucheton *et al.*, 2011).

Actuellement aucun vaccin n'est disponible, et les traitements actuels nécessitent une hospitalisation longue dans des centres de traitement spécialisés souvent rares et éloignés du lieu d'habitation des patients. Les molécules disponibles sont anciennes et responsables d'effets secondaires sévères (de 5 à 10% d'encéphalopathies mortelles dans le cas du mélarsoprol utilisé en seconde période depuis 1948) (Kennedy, 2008). Par ailleurs, les derniers rapports font état de 25 à 30% d'échecs thérapeutiques au mélarsoprol en RDC. Une avancée très importante et récente dans le traitement de la deuxième phase de la THA est l'utilisation depuis 2009 d'un régime de traitement combinant le nifurtimox et l'éflornithine connu sous le nom de NECT (Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy). Cependant le NECT est cher, difficile à administrer et n'est pas utilisé dans le cas des infections à *T. b. rhodesiense* (Simarro *et al.*, 2011). Une meilleure caractérisation des processus biologiques contrôlant la trypanotolérance humaine ainsi que de leurs importances au niveau épidémiologique apparaît donc comme un point crucial qui doit permettre de progresser (i) dans la connaissance des processus biologiques impliqués dans le contrôle ou non de l'infection avec comme perspective l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou

vaccinales et (ii) dans la mise en place de stratégies de lutte contre la THA plus efficaces et durables.

L'objectif de cette thèse a été de caractériser la diversité des réponses à l'infection à *T. b. gambiense* afin de réaliser une étude des déterminants immunologiques et moléculaires impliqués dans cette hétérogénéité de réponses observées. Cette étude a été réalisée en Guinée qui comprend les foyers de maladie du sommeil les plus actifs en Afrique de l'Ouest. Deux grandes étapes caractérisent donc ce travail :

1- La caractérisation de la diversité clinique résultant de l'infection par *T. b. gambiense*, notamment de la trypanotolérance, en combinant à la fois des suivis dans le temps et l'utilisation d'outils diagnostiques plus sensibles et plus spécifiques que ceux utilisés sur le terrain.

2- La caractérisation des réponses de l'hôte vis à vis des trypanosomes dans les différentes catégories d'individus par l'évaluation de la réponse immune (dosage de cytokines) et l'expression des gènes du TLF en particulier l'*APOL1* dans le compartiment sanguin.

Le plan retenu pour cette thèse s'organise autour de 4 parties. Dans la première partie, nous ferons d'abord une présentation générale de la THA, ensuite nous développerons les facteurs génétiques et immunologiques associés à la susceptibilité/résistance à l'infection par les trypanosomes africains. Nous terminerons cette première partie par la problématique de l'étude. La deuxième partie détaillera la méthodologie de cette thèse et les résultats seront présentés dans la troisième partie. Enfin la quatrième partie abordera la discussion des résultats obtenus.

Première partie : Revue bibliographique

Chapitre 1 : Historique de la THA

1.1. Première description de la THA

Les premiers cas de THA auraient été signalés dans les écrits de l'historien Arabe Ibn Khaldoun qui raconte la mort du Sultan Mari Djata II du Mali en 1374 et de certains de ses sujets après une période de sommeil continu. La première description de la THA est faite en 1742 par John Atkins qui rapporte un trouble profond du sommeil qu'il nomme « *Sleeping distemper* » dans son ouvrage *The Navy Surgeon*. Par la suite et jusqu'au début du 19^{ème} siècle, la THA est signalée un peu partout le long des côtes ouest –africaines, de l'Angola jusqu'à Dakar par des observateurs français, anglais et portugais. Winterbottom, en 1803, dans sa description du “ *lethargus* ” remarque l'importance de l'hypertrophie des ganglions du cou. Ce signe était non seulement connu des trafiquants d'esclaves qui rejetaient systématiquement les porteurs d'adénopathies cervicales, mais aussi de plusieurs tribus africaines qui pratiquaient l'ablation systématique des ganglions cervicaux à des fins curatives. Dans le courant du 19^{ème} siècle, de nombreux cas sont signalés en Afrique de l'Ouest et Centrale, mais sans que l'on puisse quantifier l'importance de la THA. Une première épidémie est alors décrite dans les années 1880-1890, notamment au Congo, en République Centrafricaine et en Ouganda où 200.000 morts ont été signalés dans la région de Busoga. De nombreux villages sont décimés par la THA (Martin *et al.*, 1909). L'agent responsable de cette affection reste toujours inconnu et beaucoup pensent qu'elle est d'origine infectieuse et contagieuse.

1.2. Identification de l'agent pathogène

C'est en 1901 que le parasite responsable de la THA est identifié par Robert Forde qui voit des formes mobiles dans le sang d'un capitaine de bateau faisant du trafic fluvial depuis 6 ans en Gambie. A la demande de Robert Forde, Joseph Dutton examine le sang du patient et identifie un trypanosome qu'il décrit sous le nom de *Trypanosoma gambiense* (découvert en Gambie). En 1903, Dutton et Todd retrouvent plusieurs fois le même trypanosome chez des

africains en Gambie (Dutton, 1903; Dutton et Todd, 1906), et la même année, Castellani trouve en Ouganda des trypanosomes dans le LCR des malades atteints de THA (Castellani, 1903). Cependant, il pense qu'il existe en fait deux espèces de trypanosomes distincts : l'un sanguicole et peu pathogène, l'autre localisé dans le système nerveux et responsable de la THA. Il nomme cette dernière espèce : *Trypanosoma ugandense*. Dans la même année, David Bruce et David Nabarro constatent que les trypanosomes sanguicoles sont identiques à ceux du système nerveux et qu'ils constituent le premier stade de la maladie (Girolami, 1971). Bruce confirme alors que *Trypanosoma gambiense* est l'agent étiologique de l'endémie sommeilleuse. En 1908, en Afrique de l'Est, des cas apparemment plus sévères de la même maladie semblant conduire beaucoup plus rapidement à la mort sont rapportés. Il est démontré par la suite que le parasite responsable de cette forme aiguë de la THA diffère de *Trypanosoma gambiense* et Harold Fantham et John Stephens, en 1910 le baptisent *Trypanosoma rhodesiense* (découvert en Rhodésie).

Sachant désormais que la THA évolue en deux phases et que l'agent responsable est le trypanosome, la question principale portait sur la transmission de ce trypanosome.

David Bruce suspecte les glossines d'être le vecteur de cette maladie et en fournit la preuve expérimentale avec l'aide de David Nabarro en infectant des singes à la fois par piqûre de glossines sauvages et de glossines nourries au préalable sur des sommeilleux. En 1912, Allan Kinghorn et Warrington Yorke démontrent le rôle de *Glossina morsitans* dans la transmission de *Trypanosoma rhodesiense* pendant qu'Emile Roubaud et Gaston Bouet prouvent en 1913, que le cycle du trypanosome chez la glossine varie en fonction des espèces de parasites.

1.3. Evolution de la THA au cours du 20^{ème} siècle à nos jours

La THA continue de sévir en Afrique noire malgré ces importantes découvertes. Une épidémie se déclare en Afrique de l'Ouest et Centrale au début des années 1920 et la situation devient dramatique dans les années 1924-1926, notamment au Cameroun où 45% des décès lui sont imputables. C'est en 1926, devant l'ampleur de la situation que le médecin militaire français Eugène Jamot (1879-1937) développe les premières équipes mobiles de dépistage et de traitement, qui vont sillonna toutes les zones touchées par l'épidémie entre 1926 et 1932. Ces campagnes de lutte, basées sur le dépistage de masse et la lutte anti-vectorielle vont permettre de contenir l'épidémie et dans les années 1960, les enquêtes épidémiologiques

menées dans la plupart des pays d'Afrique noire ne décèlent plus que quelques rares cas de THA (**figure 1**). La méthode proposée par Jamot pour combattre la THA reste le modèle de lutte contre une "grande endémie" en zone tropicale (Gentilini, 1993). Les faibles prévalences observées dans les années 1960 laissaient à penser que la maladie du sommeil était en voie d'élimination. Cependant, la maladie a commencé à réapparaître dans la plupart des foyers historiques à partir des années 1970 pour atteindre à nouveau dans les années 1990, des niveaux comparables à ceux observés lors de l'épidémie précédente (WHO, 1998). Si la baisse des moyens financiers et l'instabilité politique et sociale, qui a résulté de l'accès à l'indépendance des pays concernés, sont des facteurs qui ont certainement joué un rôle déterminant dans cette ré-émergence, d'autres facteurs, d'ordre biologique et épidémiologique, ont également certainement joué un rôle important, en particulier : l'existence suspectée (i) de réservoirs animaux de parasites (Truc *et al.*, 1991; Simo *et al.*, 2006; Njiokou *et al.*, 2010) ainsi que (ii) d'individus porteurs asymptomatiques de parasites non détectés par les programmes de lutte (Bucheton *et al.*, 2011).

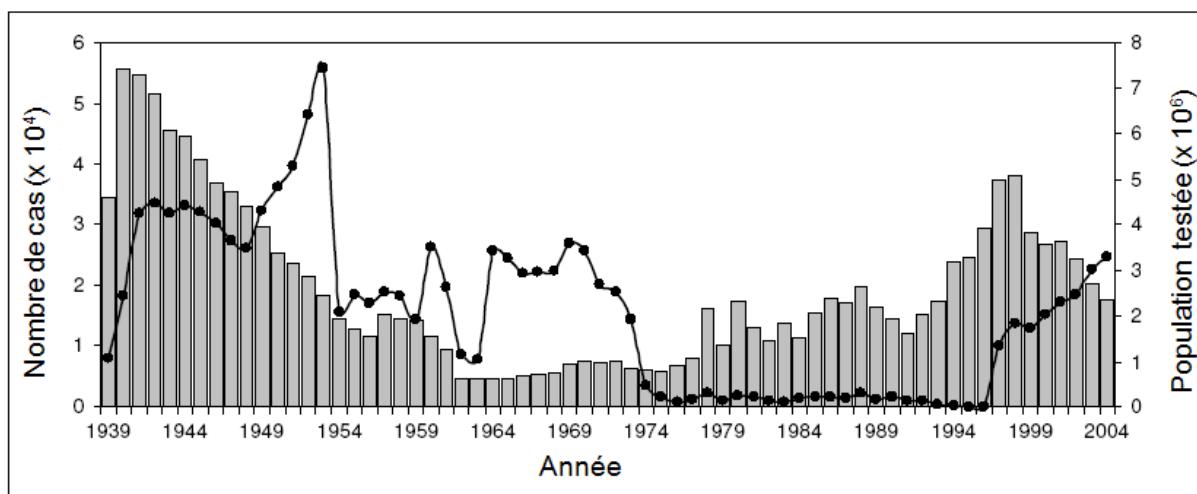


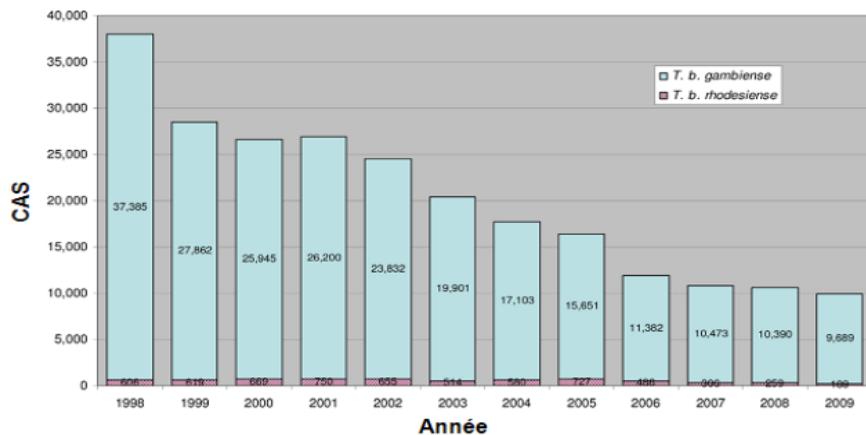
Figure 1 : Evolution de la THA en Afrique de 1939 à 2004 (Steverding, 2008).

Colonne grise = nombre de cas ; cercle noir = population testée

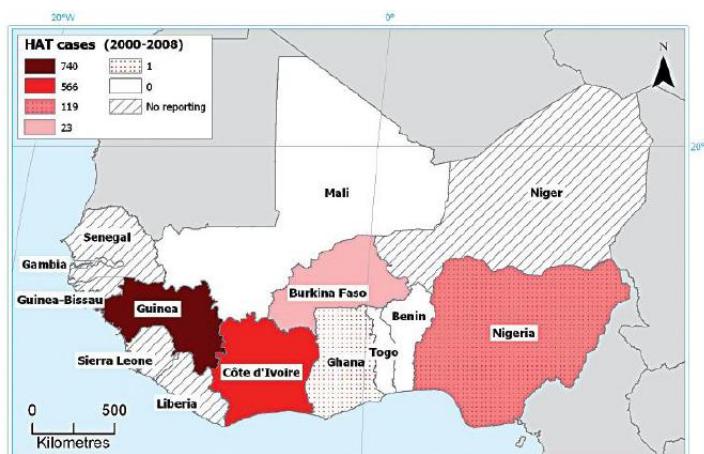
Parmi les 36 pays d'Afrique « infestés par les glossines », on estime actuellement que 60 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la THA, parmi lesquels moins de 4 millions sont sous surveillance régulière (OMS, 2002). Au début des années 2000, le nombre de personnes infectées était estimé entre 300 000 et 500 000 par l'OMS. En 2004, après un effort considérable de lutte en Afrique Centrale notamment, environ 25 000 cas ont

été rapportés et l'OMS, en 2005, annonçait le retour à une situation où l'élimination de la maladie du sommeil comme problème de santé publique était envisageable (Jannin, 2005). En 2009, le nombre de cas notifiés par l'OMS est passé en dessous de 10 000 (9 689, **figure 2-a**) pour la première fois en 50 ans (WHO, 2011). En 2008 et 2009, seules la RDC et la République Centrafricaine déclaraient plus de 1 000 cas par an (**figure 2-c**). L'Angola, le Tchad, le Soudan et l'Ouganda ont déclaré entre 100 et 1000 nouveaux cas par an. Des pays tels que le Cameroun, le Congo, la Côte d'Ivoire, le Gabon, la Guinée, la Guinée équatoriale, le Kenya, le Malawi, la Tanzanie, la Zambie et le Zimbabwe font désormais état de moins de 100 nouveaux cas par an. Le Benin, le Botswana, le Burkina Faso, le Burundi, l'Éthiopie, la Gambie, le Ghana, la Guinée-Bissau, le Libéria, le Mali, le Mozambique, la Namibie, le Niger, le Rwanda, le Sénégal, la Sierra Leone, le Swaziland et le Togo n'ont notifié aucun nouveau cas depuis plus de 10 ans. Notons cependant que des cas rares venant de la Côte d'Ivoire ont été dépistés par le PNLTHA du Burkina-Faso ces dernières années. Si cette situation semble de plus en plus encourageante, ces chiffres ne reflètent que partiellement la réalité du fait de nombreuses zones à risque qui demeurent sans surveillance à cause de l'instabilité sociale et/ou des difficultés d'accès qui font obstacle aux activités de surveillance et de diagnostic. En Afrique de l'Ouest, la Guinée et la Côte d'Ivoire sont les deux pays les plus touchés (Cecchi *et al.*, 2009; Simarro *et al.*, 2010; Simarro *et al.*, 2011). Par exemple, en Guinée et en Côte d'Ivoire, les récentes prospections médicales (2000 à 2009) ont permis de dépister plusieurs centaines de malades notamment dans les foyers de Boffa et Dubréka en Guinée (Camara *et al.*, 2005), et dans les foyers de Bonon, Sinfra, Oumé en Côte d'Ivoire (Kaba *et al.*, 2006) comme illustré sur la **figure 2-b** (Cecchi *et al.*, 2009).

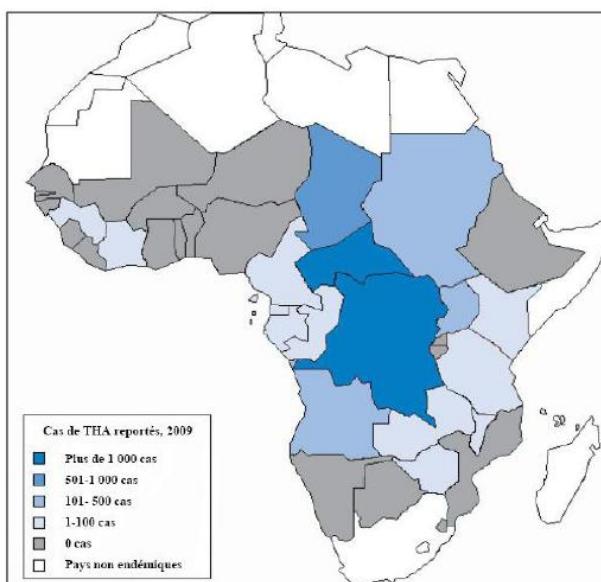
Dans le contexte actuel où le nombre de cas déclarés est de nouveau passé sous la barre des 10 000, il est donc important de bien caractériser les facteurs responsables du maintien de l'endémie sommeilleuse à bas bruit ou de sa réémergence, de manière à proposer de nouvelles stratégies permettant un contrôle durable voir une élimination de la THA.



a) évolution du nombre de cas des deux formes de la THA de 1998 à 2009 (Simarro et al., 2011)



b) nombre de cas de THA reportés en Afrique de l'Ouest de 2000 à 2008 (Cecchi et al., 2009)



c) classification de la THA en fonction du niveau d'endémicité selon les cas reportés en 2009 (Simarro et al., 2011)

Figure 2 : Situation actuelle de la THA.

Chapitre 2 : Les trypanosomes

2.1. Taxonomie

La classification subspécifique du complexe *Trypanosoma brucei* ssp a toujours été très discutée ces dernières années. En effet des études récentes basées sur des analyses phylogénétiques des séquences clonées d'ADNr, après amplification par PCR ont donné la classification suivante (Cavalier-Smith, 2004, 2009) de l'espèce *Trypanosoma brucei*. *Trypanosoma brucei* appartient au domaine des *Eukaryota*, au sous-domaine des *Bikonta* (avec les plantes et les algues brunes), au règne des *Excavata* ou *Excavabionta* (avec les *Metamonadina* dont *Giardia* sp), au super-embranchement des *Discicristata* (avec les *Percolozoa* dont *Naegleria* sp), à l'embranchement (phylum) des *Euglenozoa* (avec les euglènes) puis à la classe *Kinetoplastea*, à l'ordre *Trypanosomatida*, à la famille *Trypanosomatidae* et au genre *Trypanosoma* (Keeling *et al.*, 2009) (**figure 3**). Au sein du genre *Trypanosoma*, et selon les modalités de développement du trypanosome chez l'insecte vecteur on distingue deux sections : *Stercoraria* et *salivaria*.

La section *Stercoraria* se caractérise par un cycle de développement du parasite se déroulant entièrement dans le tractus digestif de l'insecte vecteur et s'achevant dans l'intestin postérieur. Les formes infectantes sont alors transmises par les fèces du vecteur et pénètrent de façon active à travers la peau de l'hôte. On parle de cycle de développement à transmission postérograde. Cette section comprend 3 sous-genres : *Megatrypanum* (*T. theileri*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) et *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, agent de la maladie de chagas).

La section *Salivaria* se caractérise par un cycle de développement se déroulant dans l'intestin et/ou dans la région buccale du vecteur (insecte hématophage) et s'achevant dans les pièces buccales ou les glandes salivaires. La transmission se fait par inoculation des formes infectantes lors de la piqûre de l'insecte, on parle alors de cycle de développement à transmission antérograde. Cette section regroupe 5 sous-genres : *Tejeraia* (*T. rangeli*), *Duttonella* (*T. vivax*, *T. uniforme*), *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*), *Pycnomonas* (*T. suis*) et *Trypanozon* (*T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. brucei*).

Les trypanosomes responsables de la THA appartiennent au sous-genre *Trypanozoon*. Ce sous-genre regroupe trois espèces qui sont : *T. evansi*, *T. equiperdum* et *T. brucei* ssp., toutes indistinguables morphologiquement. *T. evansi*, transmis exclusivement de façon

mécanique par les tabanidés et les chauves souris vampires, est responsable du surra, maladie des chevaux, des camélidés et des bovidés d'Afrique et d'Asie. *T. equiperdum*, responsable de la dourine chez le cheval, est transmis par voie sexuelle. Cependant le statut spécifique de *T. evansi* et de *T. equiperdum* a été récemment mis en doute (Claes *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Par exemple, concernant *T. equiperdum*, Claes *et al.*, (2005) ont proposé une définition alternative de la dourine : une maladie contagieuse et chronique des équidés causées par *T. b. brucei* ou *T. evansi* transmis directement d'animaux en animaux au cours du coït, ou par des insectes vecteurs. Il est maintenant admis que *T. evansi* et *T. equiperdum* ne seraient que des variants de *T. brucei* ayant perdu totalement ou en partie leur ADN kinétoplastique, ce qui leur permet d'être transmis mécaniquement, et hors d'Afrique, mais n'auraient pas un statut d'espèce (Lai *et al.*, 2008). L'espèce *T. brucei*, transmise uniquement par les glossines, comprend trois sous espèces qui sont morphologiquement identiques. Leur identification est basée sur leurs caractères infectieux et leur pathogénicité, ainsi que par leur distribution géographique :

- *T. b. brucei* parasite les animaux domestiques et sauvages, il est présent sur toute l'aire de répartition des glossines (Afrique intertropicale). Ce parasite sensible au TLF présent dans le sérum humain est non pathogène pour l'Homme.
- *T. b. rhodesiense* est présent en Afrique de l'Est et est responsable de la forme aiguë de la THA. Le caractère infectieux pour l'homme de *T. b. rhodesiense* ne paraît pas obligatoire et serait sous la dépendance du gène SRA, gène de résistance au sérum humain (Xong *et al.*, 1998).
- *T. b. gambiense* est présent en Afrique de l'Ouest et Centrale où il est responsable de la forme chronique de la THA.

D'un point de vue génétique, les études utilisant les isoenzymes (Gibson *et al.*, 1980; Godfrey *et al.*, 1990) et plus récemment les marqueurs microsatellites (Gibson, 2007; Balmer *et al.*, 2011), ont permis d'établir clairement que *T. b. gambiense* était génétiquement distinct de *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei*, tandis que *T. b. rhodesiense* serait un variant de *T. b. brucei* ne différant que par sa capacité à infecter l'homme à cause du gène SRA (**figure 4**).

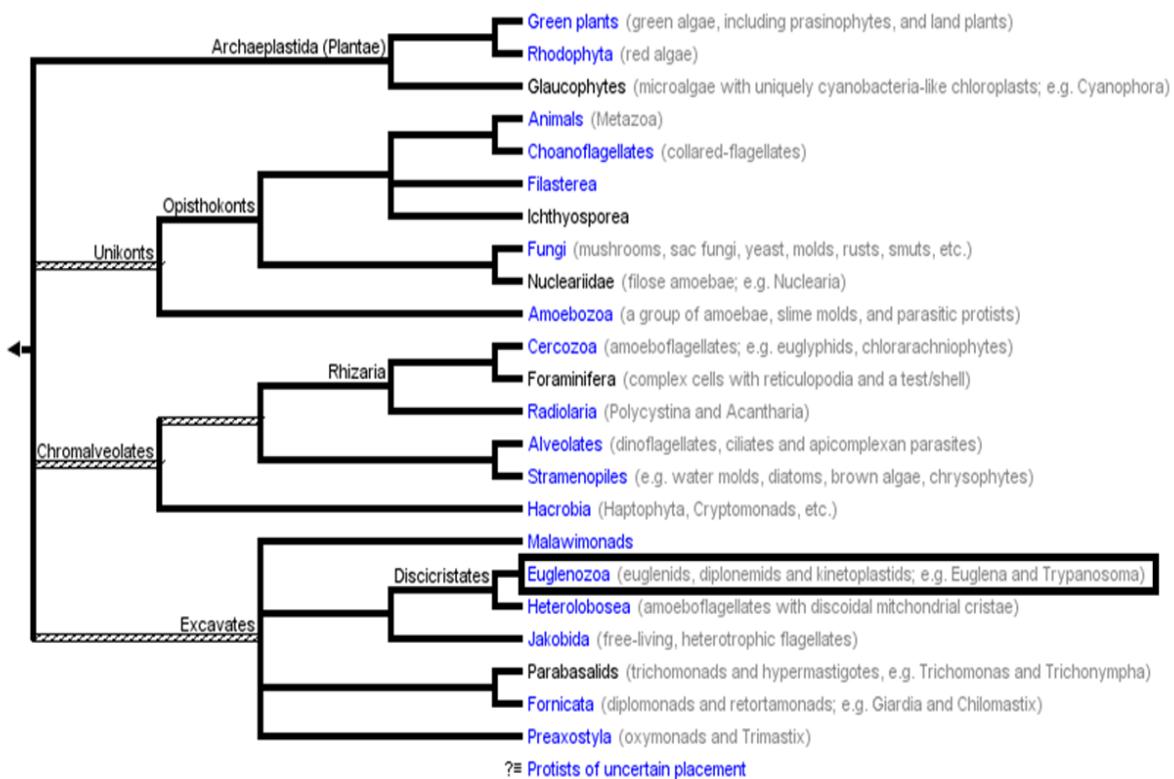


Figure 3 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes (Keeling *et al.*, 2009)

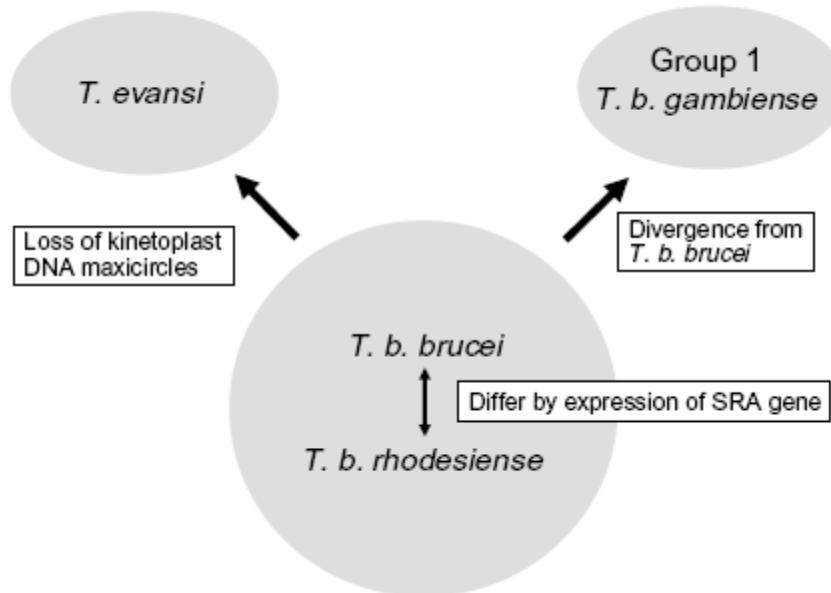


Figure 4 : Divergence génétique des taxons au sein du sous genre *Trypanozoon* (Gibson, 2007).

2.2. Morphologie et cycle évolutif

Les trypanosomes du complexe d'espèce *brucei*, mesurent de 20 à 30 µm de long sur 2 à 3 µm de large (**photo 1**). Ils se multiplient essentiellement par division binaire longitudinale mais peuvent aussi se reproduire de façon sexuée. En microscopie optique, outre les constituants fondamentaux de la cellule (noyau, cytoplasme et membrane), les trypanosomes se caractérisent par la présence d'un kinétoplaste (organite cytoplasmique) et d'un flagelle rattaché à la paroi du corps par une membrane ondulante (**figure 5**). Le kinétoplaste est situé dans la partie postérieure de la cellule, près du corps basal du flagelle, à l'intérieur de la grande mitochondrie qui s'étend sur toute la longueur du corps cellulaire, il contient de l'ADN extra nucléaire (l'ADN kinéoplastique). Le flagelle, dirigé vers l'avant, est formé d'un axonème (avec 9 paires de microtubules périphériques entourant 2 microtubules centraux) et d'un bâtonnet paraxial, formé d'un réseau de filaments. Il naît d'un corps basal situé à l'intérieur de la poche flagellaire et assure la mobilité du trypanosome.



Photo 1: *Trypanosoma brucei* sp (www.sleeping-sickness.com).

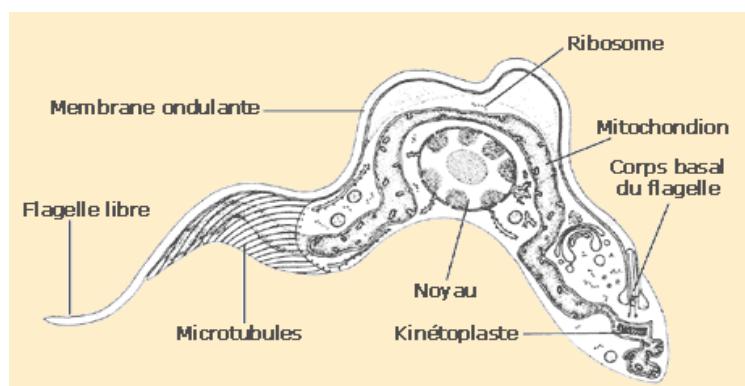


Figure 5 : Constituants fondamentaux d'un trypanosome (www.sleeping-sickness.com).

T. brucei suit un cycle de développement hétéroxène qui se déroule chez la glossine et un hôte vertébré (**figure 6**).

Chez l'hôte vertébré, les trypanosomes sont transmis lors d'un repas sanguin par la glossine qui injecte les formes métacycliques infectieuses présentes dans ses pièces buccales. Les formes métacycliques se multiplient au point d'inoculation induisant localement une réaction inflammatoire donnant dans certains cas un chancre d'inoculation. Ils envahissent ensuite le compartiment sanguin et lymphatique où ils se multiplient et se dispersent dans différents organes. La durée de la période prépatente (de l'inoculation à la détection du parasite dans le sang) varie généralement de 1 à 3 semaines en fonction de l'espèce, de la souche de trypanosome, du nombre de parasites injectés par la glossine, et de l'état immunitaire de l'hôte (Authié *et al.*, 1999). En raison du phénomène de variation antigénique (voir ci-dessous), les trypanosomes évoluent par « vagues parasitaires ». Les formes sanguines présentent un certain pléomorphisme : des formes longues (slender) en division rapide précèdent le développement de formes courtes (stumpy), qui sont des formes de dégénérescence et de préadaptation à la glossine, ne se divisant plus (Vickerman, 1985).

La glossine s'infecte en se nourrissant sur un hôte parasité et une fois infectée, elle reste infectieuse durant toute sa vie. Le trypanosome subit chez la glossine un cycle complexe impliquant une dédifférenciation et la transformation dans l'intestin en formes procycliques non-infectieuses. Dans les glandes salivaires, les trypanosomes se transforment en formes épimastigotes qui se multiplient activement. La différenciation finale conduit au stade infectieux, représenté par les formes métacycliques, qui ne se divisent plus. Cette dernière forme est infectante pour l'hôte mammifère (on parle de formes promastigotes métacycliques). La durée totale du cycle chez la glossine est d'environ 20 à 35 jours.

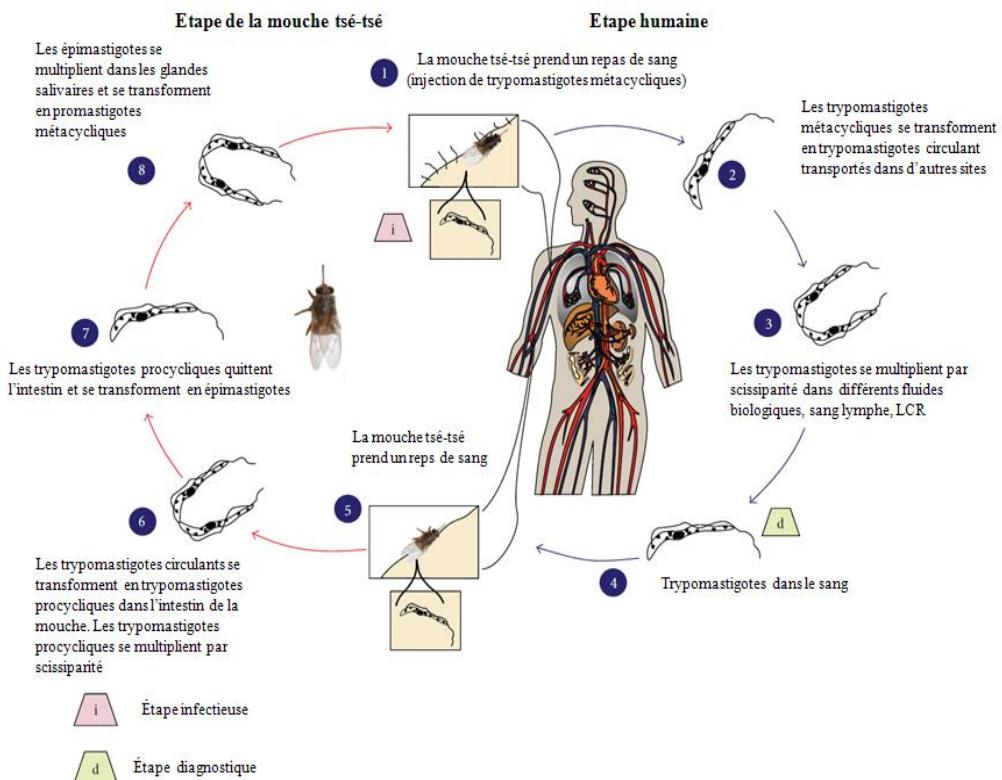


Figure 6 : Cycle de vie du trypanosome

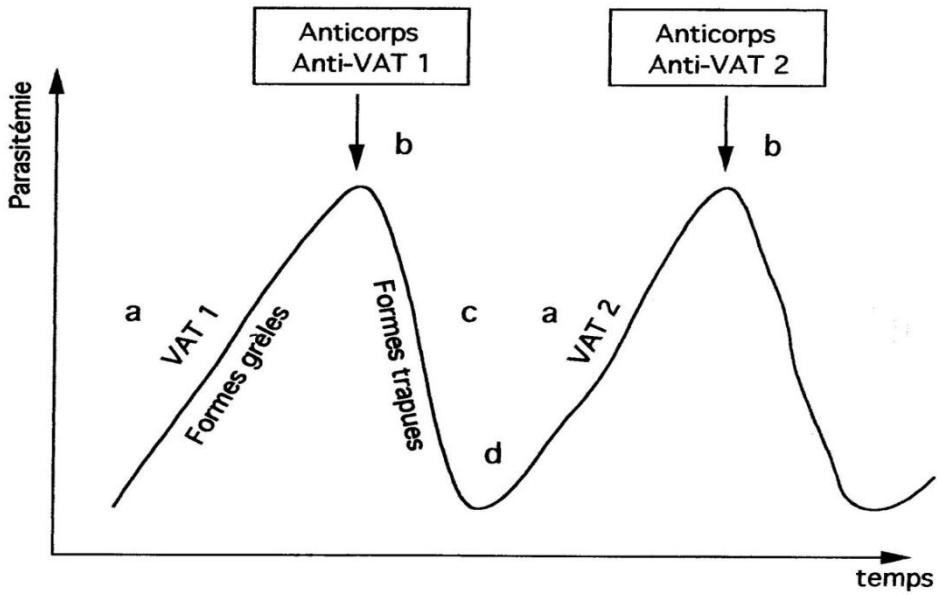
(<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm>)

2.3. Mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire

2.3.1. Glycoprotéines variables de surface et variation antigénique

Chez l'Homme, le trypanosome est recouvert d'un manteau de glycoprotéines de surface. Le revêtement antigénique se compose d'un antigène majeur ou VSG (Variable Surface Glycoprotein) et de divers antigènes mineurs (Pays et Berberof, 1995). Ce manteau de surface est visible au microscope électronique sous forme d'une couche dense caractéristique de 12 à 15 nm d'épaisseur, situé au-dessus de la couche lipidique externe de la membrane. Les VSG ne recouvrent que les formes sanguicoles du parasite, ainsi que les formes métacycliques infectantes des glandes salivaires de la glossine et représentent une des principales stratégies parasitaires d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte.

Le trypanosome possède dans son ADN nucléaire environ un millier de VSG différents mais ne synthétise qu'un seul type de VSG à la fois (Van der Ploeg *et al.*, 1992; Borst et Rudenko, 1994). Les antigènes variants ou VAT (Variant Antigen Type) sont portés par les VSG. En réponse à l'agression, l'hôte développe une réponse anticorps contre le VAT exprimé (**figure 7**), la parasitémie diminue, aboutissant à une phase de rémission. Les anticorps produits provoquent la destruction du parasite par phagocytose ou par fixation du complément et lyse massive, qui se traduit cliniquement par des pics fébriles en première phase de la maladie. Cependant, une partie mineure de la population parasitaire qui exprime un autre type de VSG portant un VAT différent se multiplie, créant ainsi une colonie nouvelle, antigéniquement différente de la première et hors de portée de première vague d'anticorps. Ce second VAT devient le type dominant, donnant lieu à une recrudescence de la parasitémie, et à la synthèse de nouveaux anticorps. Plusieurs phases de destruction identiques peuvent se succéder, provoquant un épuisement de la réponse humorale. Beaucoup de questions restent non résolues concernant notamment les mécanismes de changement des VSG (McCulloch, 2004). Quoi qu'il en soit, ce mécanisme de la variation antigénique perturbe l'homéostasie de l'hôte et freine l'acquisition d'une véritable immunité protectrice. Cette variabilité et ce phénomène d'échappement représentent des obstacles importants dans la mise au point d'un vaccin.



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

Figure 7 : Représentation schématique de l'évolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps, illustration du phénomène de la variation antigénique.

2.3.2. Résistance au sérum humain

Les humains et certains primates sont résistants à la plupart des trypanosomes africains. En 1912, Laveran et Mesnil ont remarqué que la lyse des trypanosomes par le sérum humain n'était pas associée aux immunoglobulines ou à la lyse par le complément sanguin (Laveran et Mesnil, 1912). En effet, la résistance humaine à l'infection par *T. b. brucei* est due à la présence d'un facteur lytique (Hager *et al.*, 1994), le TLF (Trypanosome lytic factor)-1. Le TLF-1 est une sous fraction mineure de lipoprotéine humaine de haute densité (HDL = High Density Lipoprotein) présent dans le sérum contenant l'apolipoprotéine A-1 (APOA1), l'apolipoprotéine L-1 (APOL1) et l'haptoglobine-related protéine (HPR). Des études ont montré que seule APOL1 est cytotoxique pour *T. b. brucei* et que l'HPR permet l'entrée rapide et efficace de APOL1 dans le parasite (Vanhamme *et al.*, 2003; Pays *et al.*, 2006; Shiflett *et al.*, 2007). APOL1 a donc été identifiée comme étant le facteur lytique. APOL1 qui

fait partie des particules d'HDL est absorbée par le parasite par l'intermédiaire du récepteur de surface au niveau de la poche flagellaire qui reconnaît spécifiquement le complexe HPR – Hb (hémoglobine) (Vanhollebeke *et al.*, 2008). En raison de l'acidification consécutive au processus de digestion, un changement de conformation permet à APOL1 de se détacher des particules d'HDL et de s'insérer dans la membrane lysosomiale. Dans cette membrane, APOL1 ouvre un pore qui permet le passage des ions chlore du cytoplasme vers la lumière du lysosome. Le flux ionique, associé à un passage d'eau provoque un gonflement osmotique incontrôlable de la vacuole digestive, entraînant la mort du parasite (**figure 8**). Cependant, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* sont résistants au facteur trypanolytique du sérum humain et sont donc capables d'infecter l'Homme et de provoquer la THA (Laveran et Mesnil, 1912). En effet, il a été démontré qu'un gène appelé Serum Resistance-Associated (*SRA*) gene est exprimé uniquement dans les clones résistants de *T. b. rhodesiense* et non dans les clones sensibles du même parasite (De Greef *et al.*, 1992; Pays *et al.*, 2006). La protéine SRA de *T. b. rhodesiense* interagit directement avec APOL1 (**figure 8**) en bloquant le processus de lyse et rend cette sous espèce résistante à la lyse (Perez-Morga *et al.*, 2005; Lecordier *et al.*, 2009). Le SRA est nécessaire et suffisant pour la résistance contre le sérum humain normal (Xong *et al.*, 1998). Il est associé comme une ESAGs (Expression Site Associated Genes) à une VSG-ES spécifique appelés R-ES qui est sélectionnée dans le sérum humain par la variation antigénique (Xong *et al.*, 1998). L'expression de SRA par *T. b. rhodesiense* n'est pas un phénomène permanent, le trypanosome perd la résistance au sérum humain en l'absence du facteur trypanolytique, par exemple après plusieurs passages chez les souris (van Meirvenne *et al.*, 1976). De même on ne retrouve pas l'expression de SRA chez les parasites *T. b. rhodesiense* isolés chez les animaux non primates (Welburn *et al.*, 2001). Le SRA contient toutes les caractéristiques d'un VSG sauf que la région codante pour l'épitope de surface exposé est absente en raison d'une délétion (De Greef et Hamers, 1994; Campillo et Carrington, 2003). Ce gène est absent chez *T. b. gambiense*, sous espèce pour laquelle le mécanisme de résistance n'est pas totalement connu. Pour cette sous espèce, la résistance semble être plutôt liée à une faible expression du récepteur parasitaire Hb/Hp qui réduit l'absorption d'APOL1 par *T. b. gambiense* par rapport à *T. b. brucei* et à *T. b. rhodesiense* (Kieft *et al.*, 2010).

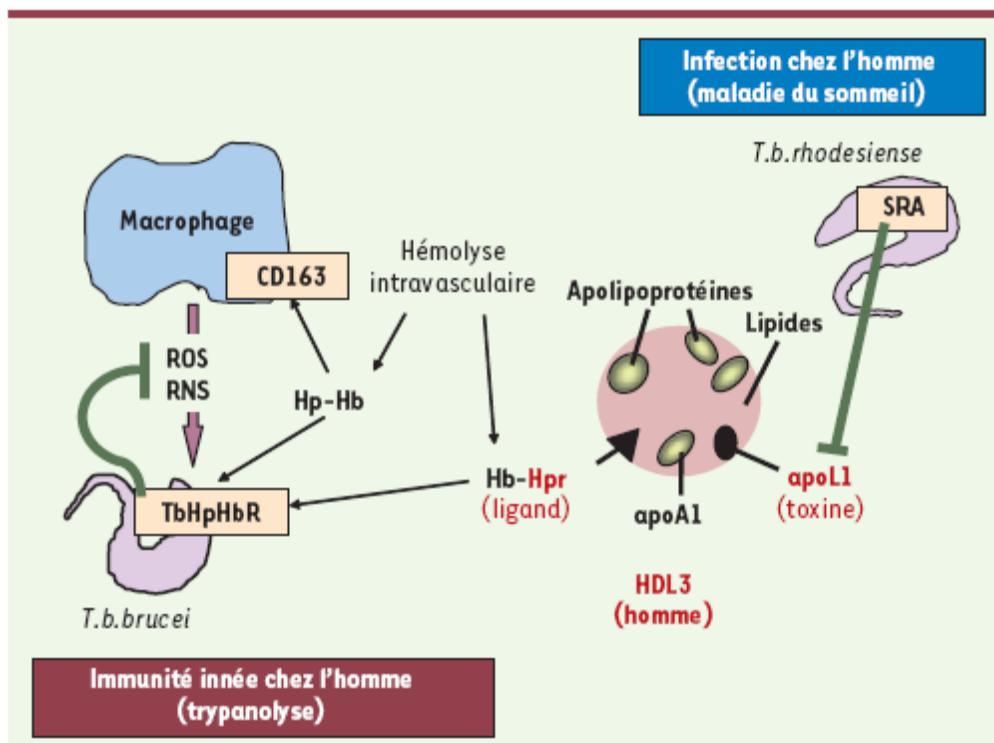


Figure 8 : Le facteur trypanolytique humain (Pays et Vanhollebeke, 2008).

Le rôle de ligand joué par l'HPR dans les particules trypanolytiques explique l'effet accélérateur de cette protéine dans le processus de trypanolyse. Les particules d'HDL trypanolytiques sont constituées de deux protéines humaines à fonctions distinctes : l'HPR, qui permet l'entrée efficace et rapide des particules dans le parasite, et APOL1, la toxine qui tue le trypanosome.

Chapitre 3 : Diversité clinique, diagnostic, et traitement de la THA

3.1. Diversité clinique résultant de l'infection par *T. b. gambiense*

Les manifestations cliniques qui caractérisent la maladie du sommeil sont en général les mêmes pour la forme chronique gambienne et pour la forme aiguë rhodésienne. La principale différence réside dans l'évolution plus ou moins rapide vers l'atteinte neurologique puis la mort. La THA évolue chez l'homme en deux périodes. Durant la première période, le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphé (phase lymphatico-sanguine). Elle peut durer plusieurs années dans le cas de la forme gambienne. Durant la deuxième période (phase neurologique) les trypanosomes passent dans le LCR et envahissent l'ensemble du système nerveux central (SNC). Des signes cliniques plus spécifiques, souvent neurologiques tels que l'apparition de troubles du sommeil, sont associés à cette phase de l'infection.

➤ ***Les toutes premières phases de l'infection***

Peu après la piqûre infestante de la glossine, l'homme développe un chancre d'inoculation, rougeâtre et douloureux (**photo 2-a**). Cette lésion est le témoin de la multiplication des trypanosomes *in situ* et permet dans certains cas de dater le début de l'infection. Si ce chancre est fréquemment observé dans l'infection à *T. b. rhodesiense*, il est rare et passe généralement inaperçu dans les zones d'endémies à *T. b. gambiense*, où il est plus difficile d'évaluer la nature chronique de l'infection.

➤ ***La phase lymphatico-sanguine ou première phase.***

Les trypanosomes envahissent ensuite le système lymphatique puis le sang. Durant la première phase les signes sont variés, rarement tous présents, et peuvent persister longtemps ou au contraire disparaître, laissant croire à une rémission avant de réapparaître ou de s'aggraver (Dumas et Bouteille, 1996; Molyneux *et al.*, 1996). Les symptômes les plus rapportés au cours de la première période sont : la fièvre, les céphalées, l'asthénie et des douleurs musculaires et articulaires. Ces symptômes apparaissent de façon cyclique (on parle de pics fébriles) et sont témoins de la production de vagues successives de parasites et de réponses immunitaires (Donelson et Turner, 1985). Des signes plus spécifiques traduisent l'envahissement des différents viscères tels que le foie, la rate et le cœur. Ainsi des hépatosplénomégalies ainsi que des troubles cardio-vasculaires sont parfois rencontrés. Des signes

cutanés, spécifiques ou non, sont très fréquents : prurit, éruptions cutanées et trypanides (**photo 2-b**). Les adénopathies cervicales, signes de Winterbottom (**photo 2-c**) apparaissent pendant cette période, en réponse à l'envahissement ganglionnaire, et témoignent de l'activité intense du système immunitaire. D'autres signes cliniques comme des œdèmes (des membres ou de la face) ou des troubles endocriniens (aménorrhée, impuissance) peuvent également apparaître au cours de la première période.

➤ ***La phase neurologique ou deuxième phase.***

La plupart des signes cliniques décrits pour la première phase persistent lors de la deuxième phase, certains signes ont tendance à s'effacer tels que l'hépatosplénomégalie ou les signes cutanés. Les troubles du sommeil (insomnies nocturnes, somnolences diurnes, hypersomnie permanente (**photo 2-d**), les troubles moteurs, les troubles sensitifs (hyperesthésie, paresthésie), les troubles du tonus (hypertonie, hypotonie), les troubles de la coordination, les réflexes anormaux (réflexes ostéo-tendineux, archaïques et cutanés), les troubles neuro-endocriniens (stérilité et perte de libido, trouble de la soif) et l'altération de l'état mental (conscience ralentie, confusion mentale, désorientation, coma, agressivité, indifférence, euphorie, dépression) sont autant de signes fréquemment rencontrés et qui caractérisent l'atteinte neurologique spécifique de la deuxième période. En l'absence de traitement, l'état général du malade se dégrade et il s'achemine plus ou moins rapidement vers la cachexie sommeilleuse terminale (état grabataire) puis sombre dans le coma et meurt d'encéphalopathie.

➤ ***Formes aiguës et chroniques***

Dans le cas de la forme chronique de la THA, la première période peut durer de plusieurs mois à plusieurs années, la parasitémie fluctuante restant souvent faible. Au cours de cette période, les symptômes sont peu prononcés et le malade n'éprouve pas le besoin de consulter un médecin. L'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième période est souvent très progressive. Dans le cas de la forme aiguë rhodésienne, la première période ne dure que quelques semaines à quelques mois, les symptômes sont plus marqués, l'atteinte du système nerveux est brutale et la mort peut survenir en quelques mois. Cependant, il est de plus en plus admis que la description classique de la maladie (forme chronique à *T. b. gambiense* versus forme aiguë à *T. b. rhodesiense*) ne correspond pas exactement à ce qui est observé sur le terrain. En effet, concernant la forme gambienne, il existe une diversité de présentations cliniques. Certains auteurs ont rapporté l'existence de formes à caractère chronique prononcé (Jamonneau *et al.*, 2000a) et d'autres, au contraire, ont décrit des tableaux

cliniques plutôt caractéristiques d'une forme aiguë de la maladie (évolution rapide vers un état très altéré dès le passage en deuxième période) (Truc *et al.*, 1997).



a) Chancre d'inoculation
(Source: (OMS/TDR/Kuzoe)



b) Trypanides
(Source: IRD/CIRDES)



c) Adénopathie cervicale
(Source: IRD/CIRDES)



d) troubles du sommeil
(Source: IRD/CIRDES)

Photo 2 : Exemples de signes cliniques de la THA.

➤ *Les individus sans confirmation parasitologique : les séropositifs*

Dans les foyers de THA, en plus des individus malades (phase 1, phase 2, formes chroniques, formes aiguës), il existe des individus qui sont positifs au test sérologique, le test CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis, test sérologique utilisé pour le diagnostic sérologique de la THA ; voir chapitre 3.2.1) alors que la recherche des parasites reste négative (Garcia *et al.*, 2000). Ces individus sans confirmation parasitologique sont appelés séropositifs (SERO). La question classique qu'on se pose le plus souvent est: que représente ce phénotype SERO ? En effet le phénotype SERO est complexe en raison du statut parasitologique incertain de ces individus. Il peut s'agir : (i) de faux positifs car la

positivité du test CATT peut être due à des réactions croisées dues à l'exposition à d'autres pathogènes, notamment les trypanosomes animaux (*T. b. brucei*, *T. Congolense*) (Chappuis *et al.*, 2005); (ii) de trypanosomés présentant une parasitémie inférieure à la limite de détection des tests parasitologiques actuellement disponibles. En effet les tests parasitologiques disponibles permettent de détecter, pour les plus sensibles, les parasites seulement à une concentration de 10-50 parasite/ml de sang (Buscher *et al.*, 2009; Camara *et al.*, 2010) ; (iii) d'individus « trypanotolérant » dont le système immunitaire serait capable de contrôler l'infection, voire de l'éliminer naturellement. Plusieurs études ont en effet montré qu'une partie de ces SERO sont des porteurs asymptomatiques de parasites mais à des parasitémies très faibles, inférieures à la limite de détection des tests parasitologiques utilisés sur le terrain (Garcia *et al.*, 2006). L'utilisation des techniques de PCR pour détecter l'ADN du parasite a montré qu'une importante fraction des sujets SERO était positive (Kabiri *et al.*, 1999; Koffi *et al.*, 2006). Par ailleurs le suivi des SERO en Côte d'Ivoire a montré que certains de ces individus maintiennent dans le temps des réponses au CATT élevées sans développer la maladie (Garcia *et al.*, 2000). Finalement, l'utilisation de la trypanolyse (TL), qui est un test sérologique spécifique des infections à *T. b. gambiense* (mais qui ne peut être réalisée qu'au laboratoire) a montré que certains des SERO identifiés dans les foyers actifs de THA étaient positifs à ce test, prouvant que ces individus sont ou ont été en contact avec *T. b. gambiense* (Jamonneau *et al.*, 2010). La caractérisation génétique des parasites présents chez ces sujets SERO positifs en PCR par génotypage direct de microsatellites sur échantillons biologiques, a montré que ces individus présentent les mêmes profils génotypiques que ceux des trypanosomes rencontrés chez les malades et confirment qu'au moins une partie des SERO peuvent être infectés par *T. b. gambiense* Groupe 1 (Kabore *et al.*, 2011a). En effet, une autre étude de génétique de population récente a montré que la taille effective de la population de trypanosomes était supérieure aux prévalences de la THA observée, suggérant ainsi la présence d'un réservoir de parasites non détectés lors des prospections médicales (Koffi *et al.*, 2009). Dans tous les cas, ces SERO ne sont en général pas traités et sont ignorés par les PNLTHA, alors que ces SERO résidant en permanence dans les zones de transmission, pourraient constituer (pour certains d'entre eux) un réservoir humain de trypanosomes et favoriser le maintien de la maladie à l'état endémique, phénomène que l'on attribue souvent à l'existence d'un réservoir animal de *T. b. gambiense* (Mehlitz *et al.*, 1982; Truc *et al.*, 1991; Simo *et al.*, 2006; Njiokou *et al.*, 2010). Ces SERO pourraient être à l'origine de la réapparition de la THA dans les foyers historiques apparemment éteints. De ce fait, il paraît donc important de mieux étudier ce phénotype SERO (i) dans la perspective d'un processus

d'élimination de la THA et (ii) afin de comprendre les mécanismes naturels permettant le contrôle de l'infection chez l'homme.

3.2. Diagnostic de la THA

Deux grands types de méthodes peuvent être distingués : les méthodes indirectes et directes. Les méthodes de diagnostic indirect ou tests sérologiques recherchent des traces de passage ou de présence du parasite par la mise en évidence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques alors que les méthodes de diagnostic direct ou tests parasitologiques cherchent à mettre en évidence la présence du parasite dans les liquides biologiques (sang, lymphé et LCR). En pratique les tests sérologiques (bon marchés et simples d'application) sont utilisés préalablement pour déterminer les sujets sur lesquels porteront les tests parasitologiques (plus onéreux et moins pratiques). Ensuite, sont effectués sur les sujets confirmés porteurs de trypanosomes, le ou les tests du diagnostic de phase sur le LCR, qui conditionnent le traitement à administrer.

3.2.1. Diagnostic indirect

Parmi les méthodes sérologiques pour le dépistage de masse de la THA, le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT *T. b. gambiense*) (Magnus *et al.*, 1978), est actuellement le plus utilisé. Il répond à toutes les exigences d'un test de terrain : très simple d'emploi, bon marché et de lecture immédiate. Le réactif du test CATT est une suspension lyophilisée de trypanosomes sanguicoles fixés, stabilisés et colorés au bleu de Coomassie. Ils appartiennent à un sérotype bien défini et sélectionné : le LiTat 1.3, qui permet d'obtenir une réactivité optimale dans les différents foyers de THA. Le test ne nécessite qu'une goutte de sang, et en présence d'anticorps spécifiques, les parasites forment des agglutinats macroscopiques colorés et visibles à l'œil nu. Afin d'augmenter la spécificité du test, un CATT sur dilutions successives de plasma (CATT/pl) est effectué sur tous les individus positifs au CATT/sang. Le seuil de dilution retenue pour dire qu'un CATT/pl est positif, déterminant les individus pour lesquels les examens parasitologiques doivent être effectués, varie selon les PNLTHA, il est de 1/4 en Guinée.

3.2.2. Diagnostic direct

Etant donné le coût et la toxicité des traitements disponibles, la règle, proposée par l'OMS et qui reste de la responsabilité de chaque PNLTHA, est de traiter un malade seulement si le parasite a pu être mis en évidence dans un des liquides biologiques. La mise en évidence du parasite est donc la clé du diagnostic dans la THA. Le diagnostic parasitologique repose sur l'examen microscopique du suc ganglionnaire (**photo 3-a, 3-b**), du sang ou du LCR. L'examen est soit direct, à l'état frais, dans ce cas on recherche la présence de trypanosomes vivants, mobiles, soit en utilisant des techniques de coloration. Les faibles parasitémies qui de plus, fluctuent, surtout dans la THA à *T. b. gambiense*, imposent pratiquement toujours la mise en œuvre de méthodes de concentrations comme la Centrifugation en Tubes Capillaires (CTC) (Woo, 1970), la filtration sur colonne échangeuse d'ions (miniature Anion Exchange Centrifugation Technique, mAECT (**photo 3-c**)) (Lanham et Godfrey, 1970; Lumsden *et al.*, 1977), et le Quantitative Buffy Coat (QBC) (Bailey et Smith, 1992).

Concernant la forme gambienne, la mAECT offre les meilleurs résultats (Lumsden *et al.*, 1979; Dukes *et al.*, 1984; Buscher *et al.*, 2009) au laboratoire comme sur le terrain (sensibilité = 50 trypanosomes/ml) parmi les méthodes directes. Elle a été mise au point par (Lanham et Godfrey, 1970), miniaturisée par (Lumsden *et al.*, 1977) et adaptée au terrain par (Lumsden *et al.*, 1979). Son principe est de faire passer 350µl de sang à travers une colonne Diéthylaminoéthyle (DEAE)-cellulose (**photo 3-c**). Les éléments figurés du sang sont chargés plus négativement que les trypanosomes et sont donc absorbés sur la colonne d'échange d'ion, tandis que les trypanosomes sont élués en conservant toute leur viabilité. L'éluat (**photo 3-c**) est centrifugé à 3 000 tours/mn pendant 10 mn et examiné au microscope optique.

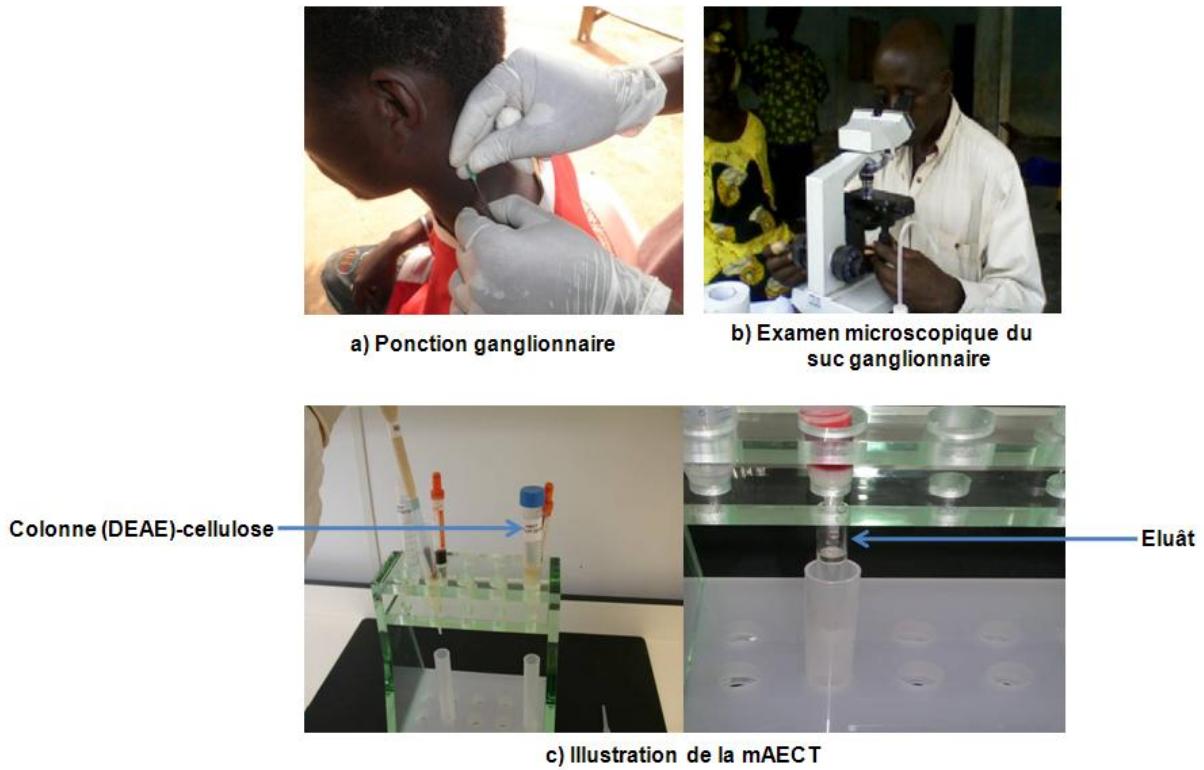


Photo 3 : Exemple de méthodes directes utilisées dans le diagnostic de la THA (source IRD/CIRDES).

3.2.3. Diagnostic de phase

Une fois le diagnostic de la THA établi (sur le sang ou la lymphé), le diagnostic de phase est indispensable car il détermine le traitement qui sera administré au patient. Il nécessite la réalisation d'une ponction lombaire (**photo 4**) pour la collecte du LCR. La recherche des trypanosomes peut se faire de façon directe par simple ou double centrifugation du LCR (Cattand *et al.*, 1988; Miezan *et al.*, 2000), ou de façon indirecte par le comptage des cellules blanches (cytorachie) qui sont des marqueurs d'inflammation du système nerveux central. Les valeurs préconisées par l'OMS (WHO, 1998) pour le diagnostic de phase sont : première phase : cytorachie ≤ 5 cellules/ μ l et absence de trypanosomes dans le LCR; deuxième phase : cytorachie > 5 cellules/ μ l avec ou sans trypanosome dans le LCR. Le seuil de la cytorachie défini par l'OMS est actuellement controversé car la présence de 5 cellules/ μ l de LCR ne traduit pas forcément la présence du parasite dans le SNC. Plusieurs auteurs proposent de passer ce seuil à 20 cellules/ μ l (Chappuis *et al.*, 2005). Ainsi en Guinée, comme en Côte d'Ivoire, le programme national a défini 3 phases indépendamment de la présence du trypanosome : la première phase (cytorachie ≤ 5), la seconde phase précoce (cytorachie

comprise entre 6 et 20) et la seconde phase avancée (cytorachie > 20). La seconde phase précoce est traitée avec la même molécule que la première période mais suivant un protocole plus long.



Photo 4 : Ponction lombaire (Source : IRD/CIRDES).

3.2.4. Les limites du Diagnostic de la THA

➤ ***Limites des tests diagnostiques utilisés sur le terrain***

Les techniques actuellement utilisées sur le terrain pour le diagnostic de la THA présentent des limitations importantes. En effet les tests sérologiques et parasitologiques manquent de sensibilité et/ou de spécificité. L'introduction du test CATT pour le dépistage de masse a été une évolution importante dans le diagnostic de la THA. En effet, le test CATT limite le nombre de personnes sur lesquels porteront les examens parasitologiques. La sensibilité du test CATT rapportée sur du sang total non dilué varie entre 87 à 98% et la valeur prédictive négative est excellente au cours du dépistage de masse de populations (Noireau *et al.*, 1987; Penchenier *et al.*, 2003; Robays *et al.*, 2004). Cependant des résultats faux négatifs peuvent se produire comme cela a été suspecté chez des malades infectés par des souches de trypanosomes n'exprimant pas le variant LiTat 1.3 (Dukes *et al.*, 1992; Enyaru *et al.*, 1998). Cela pourrait expliquer la faible sensibilité du CATT dans certaines zones endémiques comme dans les foyers d'Ethiopie et du Nigeria (Edeghere *et al.*, 1989). De plus,

malgré une spécificité de 95% rapportée (Noireau *et al.*, 1987; Van Meirvenne, 1992; Truc *et al.*, 2002; Penchenier *et al.*, 2003; Robays *et al.*, 2004), des résultats faussement positifs du CATT peuvent également survenir chez des personnes infectées par d'autres pathogènes ou exposées à l'infection par des trypanosomes animaux (Magnus *et al.*, 1978; Chappuis *et al.*, 2005).

D'autres tests ont été développés comme alternative au test CATT afin d'améliorer le diagnostic sérologique sur le terrain. Le LATEX / *T. b. gambiense* (Buscher *et al.*, 1991) est basé sur la combinaison de trois antigènes purifiés exprimant les variants LiTat 1.3, 1.5, 1.6 couplés à des particules de LATEX en suspension. Comparé au CATT, le LATEX/ *T. b. gambiense* a montré une spécificité plus élevée (96 à 99%) mais une sensibilité inférieure ou similaire au CATT (71 à 100%) (Jammoneau *et al.*, 2000b; Truc *et al.*, 2002; Penchenier *et al.*, 2003). D'autres évaluations demeurent donc nécessaires avant qu'il ne soit recommandé pour l'utilisation en routine sur le terrain. Des résultats prometteurs ont été obtenus par une méthode de détection d'anticorps par ELISA dans la salive des patients, qui présente en plus l'avantage d'un prélèvement non invasif (Lejon *et al.*, 2006), mais cette technique est encore en cours d'évaluation.

La mAECT, généralement utilisée pour le diagnostic parasitologique de la THA manque souvent de sensibilité du fait des faibles parasitémies observées dans les infections à *T. b. gambiense*. De nos jours aucun nouveau test parasitologique utilisable sur le terrain n'a été mis au point pour le diagnostic de la THA. Les seules études disponibles ont consisté à l'amélioration de la sensibilité de la mAECT. Dans ce sens une étude à laquelle j'ai participé a permis d'améliorer la sensibilité de la mAECT de 50 trypanosomes/ml (Buscher *et al.*, 2009) à 10 trypanosomes/ml (Camara *et al.*, 2010). Cette nouvelle technique appelée mAECT-bc (bc = buffy coat), consiste à ajouter une étape de concentration supplémentaire par centrifugation du tube de sang prélevé sur les malades (les trypanosomes se retrouvent au niveau de la couche leuco-plaquettaire ou buffy coat), 350µl de buffy coat sont ensuite déposés sur la colonne au lieu des 350µl de sang dans le protocole classique. Cependant, s'il a été montré que cette technique permettait de mettre en évidence le parasite chez un plus grand nombre d'individus SERO en Guinée (Camara *et al.*, 2010), la majorité demeure négative.

D'autres techniques sérologiques et parasitologiques plus spécifiques et sensibles utilisables uniquement au laboratoire ont été développées. Il s'agit de la trypanolyse pour la sérologie et du diagnostic moléculaire pour la parasitologie.

➤ *Les tests diagnostiques utilisables uniquement au laboratoire*

- *La trypanolyse*

La trypanolyse est un test hautement spécifique basé sur la détection d'anticorps dirigés contre des antigènes variables de surface spécifiques de *T. b. gambiense*. Il se réalise *ex-vivo* sur des clones de trypanosomes exprimant spécifiquement les LiTat 1.3, LiTat 1.5 et LiTat 1.6 (Van Meirvenne *et al.*, 1995). Dans une étude à laquelle j'ai participé, nous avons montré que la trypanolyse est un marqueur de contact avec *T. b. gambiense*. Ce test permet donc de distinguer parmi les individus CATT positifs, mais négatifs en parasitologie, ceux qui ont réellement été en contact avec *T. b. gambiense* (Jamonneau *et al.*, 2010).

- *Le diagnostic moléculaire*

Les techniques de biologie moléculaire qui recherchent la présence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) parasitaires, offrent des alternatives permettant d'augmenter la sensibilité ou la spécificité du diagnostic de la THA. Selon les études, la PCR (polymerase chain reaction) est plus sensible que les autres techniques utilisées dans le diagnostic de la THA (Truc *et al.*, 1999; Solano *et al.*, 2002; Jamonneau *et al.*, 2003).

Mise en évidence de l'ADN parasitaire par PCR.

Plusieurs jeux d'amorces (dont les principaux sont décrites ci-dessous) ont été développés (Deborggraeve et Buscher, 2010).

La PCR TBR1/TBR2 a été mise au point en 1989 par Moser, c'est une PCR hautement sensible dont les amorces amplifient une séquence d'ADN satellite de 177 paires de bases répétées de nombreuses fois dans le génome nucléaire sur les mini-chromosomes (Moser *et al.*, 1989). Cependant les amorces TBR1/TBR2 ne sont pas spécifiques de *T. b. gambiense* mais du sous genre *Trypanozoon* qui comprend également entre autre *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense*.

La PCR TgsGP (Radwanska *et al.*, 2002) a été développée en 2002, les amorces utilisées amplifient une séquence spécifique de la glycoprotéine de surface de *T. b. gambiense*

(TgsGP) (Berberof *et al.*, 2001). Bien que la PCR TgsGP soit une PCR spécifique de *T. b. gambiense*, elle est moins sensible que la PCR TBR1/TBR2 du fait que les amorces utilisées n'amplifient qu'une séquence unique du génome. Cependant la sensibilité de la PCR TgsGP peut être augmentée en faisant une nested PCR (Radwanska *et al.*, 2002).

La PCR 18S utilise les amorces 18S-F et 18S-R qui amplifient une séquence du gène 18S de l'ARN ribosomal des *Trypanosomatidae* (Deborggraeve *et al.*, 2006). Les amorces sont situées dans des séquences conservées chez les *Trypanosomatidae*. C'est une PCR spécifique et sensible du sous genre *Trypanozoon*.

L'utilisation de ses différentes techniques de PCR a permis de détecter l'ADN parasitaire chez une forte proportion de SERO. Cependant elles ne permettent pas de conclure définitivement sur le statut parasitologique des SERO. En dehors de la PCR TgsGP, qui est spécifique de *T. b. gambiense* mais manque de sensibilité, les autres PCRs, plus sensibles, sont spécifiques du sous genre *Trypanozoon*.

➤ **Développement de techniques de diagnostic moléculaire adaptées au terrain**

Des tests de biologie moléculaire adaptés au terrain pour l'amélioration du diagnostic de la THA sont en cours d'évaluation sous la forme :

(i) de bandelette de nitrocellulose, la NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) couplée à une technique d'oligochromatographie (OC) permet d'amplifier et de détecter l'ARN (ARN 18S) du parasite. Cette technique avec un seuil de détection de 10 parasites/ml serait une alternative sur le terrain (Mugasa *et al.*, 2009)

(ii) d'une alternative à la PCR conventionnelle en utilisant une réaction en boucle : loop mediated isothermal amplification (LAMP) (Njiru *et al.*, 2011). Cette technique prometteuse semble très sensible avec un seuil de détection de 1 trypanosome/ml, fonctionne sous des conditions ambiantes de températures et ne nécessite pas un thermocycleur couteux. Cette dernière technique n'a cependant toujours pas pu être évaluée sur le terrain en comparaison des autres tests parasitologiques standards.

3.3. Traitement de la THA

- *En première période*

Synthétisé en 1937, *la pentamidine ou lomidine* est le médicament le plus fréquemment utilisé en cure de 7 à 10 injections intramusculaires espacées de 24 à 48 heures. La dose habituelle est de 4mg/kg. Les effets secondaires les plus fréquents sont des douleurs au point d'injection, des crises douloureuses abdominales ou des malaises avec nausées. Ce médicament a aussi permis de traiter des patients au stade précoce de la deuxième période (6-20 cellules/ μ l) (Pepin et Milord, 1994; Ruiz *et al.*, 2002).

- *En deuxième période*

Le melarsoprol, dérivé arsenical trivalent, est depuis les années 50 le médicament de référence de la phase neurologique de la THA. Il est administré par voie intraveineuse directe à la posologie de 3,6 mg/kg/jour, tous les deux jours par série de 3 injections. Cette série peut être répétée une, deux ou trois fois, en respectant un intervalle de 15 jours entre chaque série et sans dépasser un total de douze injections. Les effets secondaires du melarsoprol sont très nombreux : des nécroses cutanées et des escarres si l'injection n'est pas strictement intraveineuse (les thromboses veineuses ne sont pas rares même lorsque le produit est bien administré), les malaises d'intolérance représentés par des nausées sont également fréquents. Cependant l'effet secondaire le plus redouté est l'encéphalite arsenicale qui survient chez près de 10% des patients en cours de traitement. Ces encéphalopathies sont mortelles dans 50% des cas.

Le difluoro-méthyl-ornithine (DFMO ou Eflornithine) est utilisé pour le traitement de la deuxième phase de la THA. Il est administré par voie intraveineuse à la posologie de 400 mg/kg/jour repartis en 4 perfusions de 100mg/kg toutes les 6 heures pendant 14 jours. Ce traitement est efficace et beaucoup moins toxique que le melarsoprol.

En mai 2009 l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a ajouté le *NECT* (Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy) à la liste des médicaments essentiels pour le traitement de la THA. Ce protocole thérapeutique associe le nifurtimox administré par voie orale toutes les 8 heures durant 10 jours, en raison de 15 mg/kg/jour et l'éflornithine injectée par perfusion lente 2 fois par jour durant 7 jours, à raison de 400mg/kg/jour. Le NECT est une

meilleure option thérapeutique contre la deuxième phase de la THA comparativement au melarsoprol et à l'éflornithine. Cependant le NECT est moins efficace contre la THA à *T. b. rhodesiense* (Yun *et al.*, 2010) et n'est pas utilisé.

Un autre inconvénient de tous les traitements existant contre la THA demeure la contrainte logistique. En effet le traitement contre la THA nécessite une longue hospitalisation (pendant au moins 3 semaines) ainsi que la présence d'un ou deux accompagnants pendant la durée du traitement entraînant une vulnérabilité importante de la famille concernée.

A l'issue de ce chapitre, nous voyons que la THA se caractérise par une diversité de présentations cliniques et de réponses aux tests de dépistage. Cette diversité observée résulte des interactions complexes entre l'hôte et le parasite. L'origine de cette diversité doit être recherchée à la fois chez le parasite (variabilité génétique) et chez l'hôte (susceptibilité individuelle à la maladie). Dans le chapitre suivant, nous développerons les aspects liés à la variabilité génétique des *trypanosomes* et de leurs hôtes et de l'impact de cette variabilité génétique sur la diversité de réponses et de présentations cliniques observées au cours de l'infection. Nous aborderons également dans ce chapitre, la réponse immunitaire de l'hôte dans les trypanosomoses africaines.

Chapitre 4 : Facteurs génétiques et immunologiques associés à la susceptibilité/résistance à l'infection par les trypanosomes.

4.1. Facteurs parasitaires et diversité clinique dans la THA

4.1.1. Variabilité génétique des souches et diversité de réponses à l'infection

La variabilité génétique des souches de trypanosomes pourrait être à l'origine de la diversité de réponses à l'infection observée. Si de nombreuses études ont maintenant permis de caractériser la variabilité génétique au sein de *T. b. gambiense*, peu de choses sont connues concernant l'impact de cette variabilité sur les phénotypes cliniques. La technique d'électrophorèse des isoenzymes utilisée en génétique des populations pour la caractérisation des trypanosomes a permis d'individualiser un groupe génétiquement homogène, correspondant à 80% des isolats humains d'Afrique de l'Ouest et Centrale. Ce groupe est communément appelé le "Groupe 1" de *T. b. gambiense* (Gibson et Borst, 1986). Les 20% restants ont été étiquetés par les auteurs comme "*gambiense* Groupe 2", "non *gambiense*" ou encore Groupe "bouaflé", ce Groupe étant génétiquement hétérogène (Godfrey *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 1999). Il semblerait que les malades infectés par une souche du Groupe 1 aient tendance à présenter des formes cliniques plus chroniques que ceux atteints par des souches du Groupe 2 (Truc *et al.*, 1997). La caractérisation isoenzymatique des souches de *T. b. rhodesiense* isolées durant les épidémies dans le sud-est de l'Ouganda a montré que certains types de tableau clinique pouvaient être associés à un zymodème particulier (Smith et Bailey, 1997). Les souches du zymodème B17 du groupe "busoga" semblent responsables de formes cliniques plutôt sévères à évolution rapide avec présence dans 92% des cas d'un chancre d'inoculation. A l'inverse, les souches des zymodèmes du groupe "zambezi" occasionnent des formes cliniques plus chroniques à évolution lente, avec atteinte progressive du système nerveux, et une absence fréquente de chancre d'inoculation suggérant ainsi que la sévérité de la THA à *T. b. rhodesiense* est en partie liée au génotype du parasite (MacLean *et al.*, 2004). L'approche utilisant les marqueurs microsatellites qui permet de caractériser les trypanosomes directement sur les liquides biologiques a montré l'existence d'une importante diversité génétique des souches circulant en Côte d'Ivoire et a confirmé l'existence d'infections mixtes

avec des trypanosomes du Groupe 1 de *T. b. gambiense* et d'un nouveau groupe de trypanosomes dont la présence a également été prouvée chez le porc (Truc *et al.*, 2002; Jamonneau *et al.*, 2004; Koffi *et al.*, 2007). Ces infections mixtes pourraient être responsables des formes très chroniques de la THA avec des parasitoses très faibles. Cependant, des études récentes, utilisant les marqueurs microsatellites, n'ont pas pu d'une part, mettre en évidence une corrélation entre la diversité génétique parasitaire et la diversité d'évolutions cliniques résultant de l'infection par les trypanosomes en Guinée (Kabore *et al.*, 2011b), et d'autre part, n'ont trouvé aucune différence entre les parasites génotypés chez les SERO et les malades (Kabore *et al.*, 2011a). Bien que la variabilité génétique de *T. b. gambiense* soit bien caractérisée, son impact réel sur la variabilité clinique de l'infection observée chez l'homme n'est pas connu à ce jour.

4.1.2. Facteurs parasitaires influençant la diversité de réponses à l'infection

4.1.2.1 Infection à *T. b. brucei* et diversité de réponses dans le modèle Souris

La variabilité de *T. b. brucei* et la diversité de réponses à l'infection dans des modèles expérimentaux semblent être corrélées comme en témoignent plusieurs études (Morrison *et al.*, 2009; Morrison *et al.*, 2010). En infectant des souris consanguines avec deux souches de *T. b. brucei*, Morisson et al (2009) ont montré que ces deux souches différaient de façon significative du point de vue de la pathogénie, à savoir l'anémie, la réticulocytose, la splénomégalie et l'hépatomégalie. En utilisant une approche génétique consistant à effectuer un croisement entre ces deux souches de parasites chez la glossine, ces auteurs ont identifié un premier locus sur le chromosome 3 de *T. b. brucei* appelée TbOrg1 (*T. brucei* organomegaly QTL (Quantitative Trait Loci) 1) associé à la splénomégalie et à l'hépatomégalie, et un deuxième locus sur le chromosome 2 appelée TbOrg2 associé à la splénomégalie, l'hépatomégalie et à la réticulocytose. Toujours, en utilisant ces mêmes souches, une autre étude a montré qu'elles induisaient chez les souris des réponses immunes contrastées (Morrison *et al.*, 2010). L'analyse transcriptomique, réalisée sur des cellules de rate de souris infectées, a montré que 40% des gènes différemment exprimés au cours de l'infection étaient spécifiques de l'une ou l'autre des souches parasitaires suggérant notamment

que l'immunité innée vis à vis des trypanosomes est en partie contrôlée par des facteurs génétiques d'origine parasitaire.

Bien que ces études montrent clairement que la variabilité génétique des souches de *T. b. brucei* joue un rôle important dans la diversité de réponses à l'infection chez la souris, des questions demeurent liées aux souches parasitaires utilisées. En effet ces souches de références, isolées il y a longtemps chez des hôtes différents, sont cultivées en laboratoire depuis des dizaines d'années et ne reflètent donc que de façon imparfaite l'impact de la diversité parasitaire dans un foyer donné.

4.1.2.2. Infection à *T. b. gambiense* et diversité de réponses dans le modèle souris

Bien qu'aucune étude n'ait à ce jour clairement pu mettre en évidence l'association entre la variabilité génétique des trypanosomes d'un même foyer et la diversité clinique observée chez l'homme (voir ci-dessus), plusieurs études ont montré que des souches de *T. b. gambiense* récemment isolées de patients avaient des profils infectieux très différents chez la souris aussi bien en terme de virulence (parasitémie) que de pathogénie (mortalité) et de capacité à envahir le système nerveux central (Holzmuller *et al.*, 2008; Giroud *et al.*, 2009). Ces différences de profils infectieux semblent en partie liées à la capacité des trypanosomes et/ou de leur antigènes excrétés/secrétés à induire ou non l'activation alternative des macrophages qui est favorable à leur développement (Holzmuller *et al.*, 2008). Il a par ailleurs pu être montré que des souches, présentant chez la souris des phénotypes extrêmes, étaient très différentes (bien que génétiquement semblables avec les marqueurs utilisés) du point de vue de la composition de leur secrétome (protéines récupérées dans les surnageants de culture) suggérant que ces molécules sécrétées par les trypanosomes jouent un rôle important dans l'interaction hôte-parasite chez *T. b. gambiense* par leur action modulatrice sur la réponse immune (Holzmuller *et al.*, 2008).

Comme nous venons de le voir, même si l'impact de la variabilité génétique du parasite sur la diversité clinique observée chez l'homme n'est pas encore bien caractérisé, l'existence de facteurs parasitaires de virulence/pathogénicité capables d'interférer sur la réponse immune de l'hôte est bien établie. Cependant l'importance des facteurs de l'hôte dans la diversité de réponses à l'infection doit être également considérée. En effet, un certain nombre d'arguments émanant d'études épidémiologiques (Garcia *et al.*, 2002) et d'études

dans les modèles expérimentaux murins et bovins (Kemp *et al.*, 1997; Hanotte *et al.*, 2003) où les conditions de l'infection sont parfaitement contrôlées, suggèrent l'existence d'un contrôle génétique de l'hôte à l'infection par les trypanosomes.

4.2. Variabilité « génétique » de l'hôte et diversité de réponses à l'infection

La susceptibilité génétique de l'hôte a été étudiée dans de nombreuses maladies infectieuses ou parasitaires. Cependant, les études d'épidémiologie génétique dans la THA ont été peu nombreuses et nous devons l'essentiel de nos connaissances sur les facteurs génétiques de l'hôte impliqués dans le contrôle de l'infection à des études menées chez les bovins et les souris.

4.2.1. Apport des modèles expérimentaux

4.2.1.1. Contrôle génétique des trypanosomes chez les bovins

La trypanotolérance est l'aptitude de certaines races bovines à contrôler le développement des trypanosomes, leur effet pathologique et de rester productives en milieu infesté par les glossines. Deux grands types d'approches (génétique et transcriptomique) ont été utilisés pour caractériser les gènes impliqués dans la trypanotolérance bovine.

4.2.1.1.1. Approche génétique

L'approche génétique a consisté à effectuer des croisements entre races trypanotolérantes et sensibles et à en étudier leur descendance afin d'identifier les régions chromosomiques associées à des traits phénotypiques impliqués dans la trypanotolérance. En utilisant cette approche et à l'aide de marqueurs microsatellites très polymorphes sur une population F2 de 177 individus issus du croisement entre des taurins N'Dama trypanotolérants et des zébus Boran trypanosensibles, 18 QTLs associés à 16 phénotypes spécifiques liés à l'anémie, à la parasitémie et au poids corporel ont été mis en évidence

(Hanotte *et al.*, 2003). Certains des QTLs étaient associés à un seul trait tel que la parasitémie (BTA4) ou à l'anémie (BTA2, 14, 17, 22, 25, et 27), alors que d'autres avaient des effets sur plusieurs traits (par exemple la BTA7 a été associée à la parasitémie, à l'anémie et au poids corporel). Cependant les QTLs identifiés sont composés de grands segments chromosomiques contenant plusieurs centaines de gènes, ce qui rend l'identification des gènes contrôlant les caractères trypanotolérants, difficile. Les études d'associations basées sur le déséquilibre de liaison permettront de réduire les intervalles de localisation en utilisant davantage de marqueurs microsatellites ou de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) dans des populations de bétail en condition naturelle (Thevenon *et al.*, 2007). En utilisant cette approche, deux marqueurs de la région QTL identifiée par Hanotte *et al.* (2003) sur BTA4 ont été significativement associés à l'hématocrite moyen des animaux (Dayo *et al.*, 2009). D'autres parts, deux marqueurs microsatellites sur les chromosomes BTA2 et BTA13 qui présentent une signature de sélection chez les races trypanotolérantes ont été mis en évidence par une recherche de signature de sélection (Dayo *et al.*, 2009). Ces approches devraient permettre dans le futur d'identifier les gènes de susceptibilité/tolérance à l'infection chez les bovins et servir à des programmes de sélection contrôlés pour l'obtention d'animaux productifs pouvant être élevés en zone de forte pression trypanosomienne.

4.2.1.1.2. Approche transcriptomique

Plusieurs études se basant sur des approches transcriptomiques ont aussi été utilisées pour la recherche des gènes associés à la trypanotolérance.

- ***Les approches transcriptomiques utilisant les microarrays***

L'approche microarray consiste à étudier simultanément et quantitativement l'expression de plusieurs milliers de gènes à partir d'un support solide de taille réduite. En utilisant cette approche, le profil transcriptomique des bovins trypanosensibles a été étudié (Hill *et al.*, 2005). Quatre Boran trypanosensibles ont été infectés expérimentalement par *T. congolense* et les niveaux d'expression des gènes des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été étudiés par microarray. Les gènes les plus différentiellement exprimés ont été les protéines kinases de la classe C et des molécules des sous-unités de classe I qui pourraient jouer un rôle clé dans la première ligne de défense contre les trypanosomes chez les bovins. Cette même approche a été utilisée pour étudier le profil

transcriptomique cette fois ci, chez des N'Dama trypanotolérants et des Boran trypanosensibles (O'Gorman *et al.*, 2009). Les résultats ont permis de compléter le profil transcriptomique des Boran trypanosensibles de l'étude précédente et ont aussi montré que les N'Dama trypanotolérants affichaient une réponse transcriptionnelle rapide et distincte à l'infection avec 10 fois plus de gènes différentiellement exprimés à 14 jours post-infection comparés aux Borans trypanosensibles. Les résultats ont aussi montré que la réponse chez les N'Dama trypanotolérants était caractérisée par une expression accrue de gènes impliqués dans une série de processus biologiques incluant la régulation de la production des cytokines et le chimiotactisme, l'endocytose, la motilité cellulaire, et l'activation leucocytaire qui devraient être bénéfiques pour l'hôte.

- ***Les approches transcriptomiques utilisant la technique SAGE***

La technique SAGE ou technique d'analyse sérielle de l'expression des gènes permet une analyse de la fréquence d'expression d'un ARN messager parmi des milliers de transcrits dans une cellule à un moment donné. Elle se fonde sur l'analyse séquentielle d'un grand nombre de courts fragments d'ADNc, dont chacun représente la signature d'un gène. Les ARNm sont identifiés par une étiquette ou tag de 14 à 21 bases selon la technique utilisée. En utilisant cette approche, le profil transcriptomique des races trypanotolérantes (un N'Dama et un Baoulé) et un Zébu trypanosensible infectés par *T. congolense* a été analysé (Berthier *et al.*, 2008). Cette étude a mis en évidence 318 transcrits différentiellement exprimés parmi lesquels 4 ont paru très intéressants et dont deux étaient très spécifiques des races trypanotolérantes. Le premier est un inhibiteur de protéase (aprotinine) qui est fortement surexprimé chez les bovins trypanotolérants avec une expression maximale au pic de parasitémie. Son action pourrait être d'inhiber l'action de certaines protéases parasitaires responsables de la pathogénie et de la sévérité de la maladie. Le deuxième est un facteur plaquettaire (chémokine). Ce dernier est un puissant chimioattractant pour les cellules phagocytaires induisant l'activation des neutrophiles et provoquant leur dégranulation. Il présente également la capacité d'accélérer la différenciation des monocytes/macrophages, d'accroître leurs capacités phagocytaires et de stimuler la prolifération des cellules CD4+ CD25+ (cellules T régulatrices).

4.2.1.2. Contrôle génétique des trypanosomes chez les souris

Les souris offrent un modèle expérimental intéressant pour l'étude du contrôle génétique de la résistance/susceptibilité à l'infection par divers pathogènes (Moore et Nagle, 2000). Les différentes lignées de souris consanguines montrent des réponses différentes à l'infection par les trypanosomoses (Morrison *et al.*, 1978) notamment au travers d'une aptitude différentielle à lutter contre l'anémie (Noyes *et al.*, 2009). En particulier la lignée C57BL/6J présente un degré élevé de résistance à *T. congolense* par rapport aux souris A/J et BALB/cJ (Jennings *et al.*, 1978; Morrison *et al.*, 1978). La trypanotolérance chez les souris est liée au contrôle précoce de la parasitémie (Murray et Gray, 1984), une capacité qui est associée à des gènes qui sont exprimés précocement au cours de l'infection. Ces gènes contrôlent la croissance du parasite et déterminent la rapidité à laquelle la réponse immunitaire est déclenchée. Les lignées sensibles montrent des niveaux de parasitémie élevés après infection par *T. congolense* alors que les souris résistantes montrent des niveaux faibles de parasitémie (Whitelaw *et al.*, 1980). Les différences de sensibilité à l'infection ayant été caractérisées pour différentes lignées de souris, plusieurs études génétiques ont été réalisées afin de déterminer les gènes impliqués dans la trypanotolérance. La relation entre les haplotypes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et la susceptibilité à *T. b. rhodesiense*, *T. congolense*, et *T. brucei* ont été étudiées mais aucune différence entre la résistance et les haplotypes du complexe H2 n'a été montrée, suggérant que le CMH ne joue pas un rôle majeur dans la susceptibilité des souris infectées par ces trypanosomes (Clayton, 1978; Morrison *et al.*, 1978; Levine et Mansfield, 1981).

De façon similaire à l'approche par cartographie génétique qui a consisté à rechercher des QTLs chez les bovins, des études expérimentales utilisant cette approche chez les souris ont été initiées afin d'identifier les régions chromosomiques impliquées dans la trypanotolérance dans le modèle murin (Kemp *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1997). C'est au cours d'un criblage du génome sur la descendance (F2) d'un croisement entre des lignées de souris résistantes (C57BL/6J) et sensibles (A/J et BALB/cJ) que Kemp *et al.* (1997) ont identifié trois régions chromosomiques nommées Trypanosomiasis infection response (Tir)1, Tir2, Tir3 impliquées dans le contrôle de la résistance à l'infection par *T. congolense* (Kemp *et al.*, 1997). Ces régions se trouvent respectivement sur les chromosomes 17, 5 et 1. Des études plus récentes (Iraqi *et al.*, 2000; Nganga *et al.*, 2010) ont été menées afin de réaliser une cartographie fine des loci identifiés par cette étude.

- *Cartographie fine des loci identifiés*

Les études consistant à réaliser la cartographie fine des loci Tir1, Tir2, Tir3 ont été réalisées en utilisant des souris AIL (Advanced Intercross Line) (Iraqi *et al.*, 2000). Un premier croisement a été effectué entre des souris résistantes (C57BL/6J) et sensibles (A/J et BALB/cJ). Une fois la F2 obtenue, les croisements dans les générations suivantes ont été faits de manière aléatoire (en évitant les appariements entre frères et sœurs) jusqu'à ce que les souris AIL souhaitées soient atteintes (génération 6). L'objectif était d'augmenter la proportion de recombinaison entre deux locus et de réduire l'intervalle de confiance de la région associée au phénotype. La réduction des intervalles de confiance pour les locus Tir variait de 2,5 à plus de 10 fois dans la population G6 en comparaison de ceux obtenus précédemment avec la génération F2. Ces études ont permis de subdiviser Tir3 en trois loci indépendant (Tir3a, Tir3b, Tir3c) révélant ainsi un degré de complexité qui n'était pas évident dans les études menées au niveau de la F2. Une autre étude a encore affiné ces résultats en effectuant une cartographie à haute résolution des loci Tir2 et Tir3 en utilisant une AIL F12 avec le locus Tir1 fixé pour l'allèle sensible (Nganga *et al.*, 2010). 43 gènes ont été cartographiés au sein du QTL Tir2 dont les plus intéressants ont été le Toll-Like Receptor 1 (TLR1) et le TLR6 qui sont tous deux bien connus pour être impliqués dans l'immunité innée et la réponse de l'hôte dans l'élimination des pathogènes. Pour la région Tir3 les gènes candidats les plus intéressants ont été l'interleukine 10 et son gène régulateur CYPr2 situé respectivement au sein des loci Tir3a et Tir3b, divers ligands membres de la super famille du TNF, et le TLR5.

Bien que le modèle souris ait conduit à la cartographie fine de 5 régions chromosomiques (Tir1, Tir2, Tir3a, Tir3b, Tir3c) impliquées dans la trypanotolérance chez la souris, la plupart des gènes dans ces régions restent à identifier. La combinaison de l'expression des gènes et des données QTL s'est révélée être un outil puissant pour la recherche des gènes candidats qui sous-tendent les phénotypes complexes de la trypanotolérance (De Buhr *et al.*, 2006). Cette approche a été appliquée à des souris et a permis d'identifier une délétion de résidu d'acide aspartique dans un domaine fonctionnel du gène Daxx (un enhancer de l'apoptose cellulaire) dans le QTL Tir1 (Fisher *et al.*, 2007).

4.3. Génétique humaine et THA

4.3.1. Arguments indirects en faveur d'une composante génétique chez l'Homme

Dans le domaine de la THA, un certain nombre d'arguments indirects, issus d'observations de terrain, sont en faveur de l'existence d'une composante génétique contrôlant la susceptibilité individuelle au développement de la maladie. Tout d'abord, des différences de susceptibilité à la THA ont été décrites entre différentes ethnies vivant dans un même foyer. En Afrique Centrale une différence de tolérance à la THA entre les populations Bantous et Pygmées est depuis longtemps suspectée (Authié *et al.*, 1991). Ces différences semblent être en partie liées à une différence d'activité trypanolytique du sérum humain entre ces deux groupes ethniques (Authié *et al.*, 1991). Des différences ethniques ont aussi été observées dans le foyer de Sinfra en Côte d'Ivoire où les allogènes installés récemment avaient un risque accru de développer la THA en comparaison des sujets autochtones (Garcia *et al.*, 2002). Un autre indice qui suggère l'existence de facteurs génétiques est l'observation d'une agrégation familiale des cas. Concernant *T. b. rhodesiense*, il a ainsi été montré que la présence d'un antécédent familial de THA était un facteur de risque significatif pour un sujet vivant en zone d'endémie (Okia *et al.*, 1994). Des concentrations familiales de cas de THA à *T. b. gambiense* ont également été mises en évidence en RDC (Khonde *et al.*, 1997) et en Guinée où nous avons également observé que, malgré la faible prévalence des malades dans certains foyers, ces malades se regroupent dans certaines grandes généalogies. Les raisons de ces concentrations familiales de cas de THA sont cependant souvent difficiles à interpréter car elles peuvent également être causées par le partage d'un environnement à risque par les membres d'une même famille. Des méthodes de l'épidémiologie génétique, telle que l'analyse de ségrégation, qui permet d'étudier la ségrégation d'un trait phénotypique (ici, la susceptibilité à la THA) dans de grandes généalogies tout en prenant en compte l'effet d'éventuels facteurs de risques environnementaux ou de l'hôte lui même (âge, sexe) sont maintenant nécessaires pour progresser dans ce domaine. Dans le cas de la THA, maladie de faible prévalence, mortelle, au traitement risqué, qui affecte essentiellement des populations rurales, difficilement accessibles, ces études sont très difficiles à mener, et à notre connaissance aucune étude, à ce jour, n'a été publiée sur la THA contrairement à de nombreuses autres maladies infectieuses comme la bilharziose, la leishmaniose, le paludisme,

la tuberculose ou la lèpre (Dessein *et al.*, 1999; Peacock *et al.*, 2001; Barbier *et al.*, 2008; Abel et Casanova, 2010; Lazaro *et al.*, 2010).

4.3.2. Association génétique et cytokines

A notre connaissance, seules deux études d'association génétique (Courtin *et al.*, 2006a; Courtin *et al.*, 2007) basée sur l'approche gène candidat et dont le principe général consiste à comparer la fréquence d'un polymorphisme génétique chez les individus atteints et chez des individus sains, ont été réalisées en Côte d'Ivoire dans le foyer de Sinfra et en RDC dans le foyer de Bandundu. Ces études se sont focalisées sur l'analyse des polymorphismes des gènes de certaines cytokines dont l'importance dans le contrôle de l'infection avait été établie chez le bovin ou la souris. Ces études ont montré d'une part, une association significative entre des polymorphismes des gènes *IL6* et *IL10* et une diminution du risque de développement de la THA, et d'autre part, une association significative entre les polymorphismes des gènes codant l' $IL1\alpha$ et le $TNF\alpha$ et un risque accru de développer la maladie. D'un point de vue statistique cependant, les associations génétiques observées ne sont pas fortement significatives. Ces résultats suggèrent (i) que la variabilité génétique à ces loci ne joue pas un rôle majeur dans le contrôle du processus infectieux ou (ii) qu'il existe une hétérogénéité dans les phénotypes cliniques utilisés qui aurait réduit la puissance statistique de l'analyse (Bucheton *et al.*, 2011). A ce propos, il convient de noter que les auteurs dans leur étude ont regardé le statut malade (infecté) versus non malade (non infecté) et n'ont pas fait de distinction entre les différentes phases de la maladie. Nous avons vu plus haut que dans le cas des infections à *T. b. gambiense*, une importante hétérogénéité caractérise notamment les malades en première phase (pouvant durer de quelques mois à plusieurs années en fonction des individus avec des cas où une résolution spontanée de l'infection est même suspectée). Afin d'augmenter la puissance des analyses d'association génétique il paraît d'abord important, dans un premier temps, de bien caractériser les critères qui permettent d'identifier les individus pouvant être considérés comme trypanotolérants de ceux qui sont susceptibles à l'infection. Aucune étude par exemple n'a à ce jour inclus ces individus séropositifs que l'on suspecte d'être des porteurs asymptomatiques de parasites.

En récapitulatif des parties 4.2 et 4.3, nous pouvons affirmer que plusieurs arguments sont en faveur de l'existence d'une composante héréditaire influençant la susceptibilité

individuelle à la THA. Les modèles expérimentaux murins et bovins, au cours desquels l'hôte, l'agent pathogène et les circonstances mêmes de l'infection peuvent être parfaitement contrôlés, ont permis d'étudier les principaux mécanismes de résistance/susceptibilité à l'infection par les trypanosomes au travers d'approches globales (génétiques et/ou transcriptomiques) menées sur l'ensemble du génome. Au contraire, beaucoup moins d'études sont disponibles chez l'homme et sont toutes basées sur une approche gènes candidats. La **figure 9** récapitule l'ensemble des résultats obtenus chez l'homme la souris et le bovin. Sur cette figure on peut constater que certaines des associations génétiques mises en évidence chez l'homme sont localisées dans des régions chromosomiques correspondant à des régions de synténie chez la souris et le bovin comprenant des QTLs impliqués dans la trypanotolérance (e.g. *IL10/Tir3b/BTA16; TNFa/Tir1/BTA13*). A l'inverse, de nombreux loci (e.g. *IL6, IL1a, Tir2, Tir3a, Tir3b* et la majorité des QTLs bovins) semblent spécifiques des différents modèles où ils ont été mis en évidence. Il apparaît donc bien que si des mécanismes de contrôle de l'infection semblent communs entre l'homme, la souris et le bovin, il existe également une composante génétique spécifique à chaque espèce (Courtin *et al.*, 2008). A ce sujet, on peut noter que l'homme, le bovin et la souris ne sont pas sensibles aux mêmes espèces de trypanosomes. Ceci illustre bien que certaines interactions hôte-parasite ou mécanismes immunitaires diffèrent entre les espèces de mammifères. Il est donc maintenant important de mettre également en place chez l'homme, des stratégies globales portant sur l'ensemble du génome (sans faire d'hypothèses préalables sur les gènes impliqués) afin d'identifier les facteurs génétiques spécifiques à l'infection humaine.

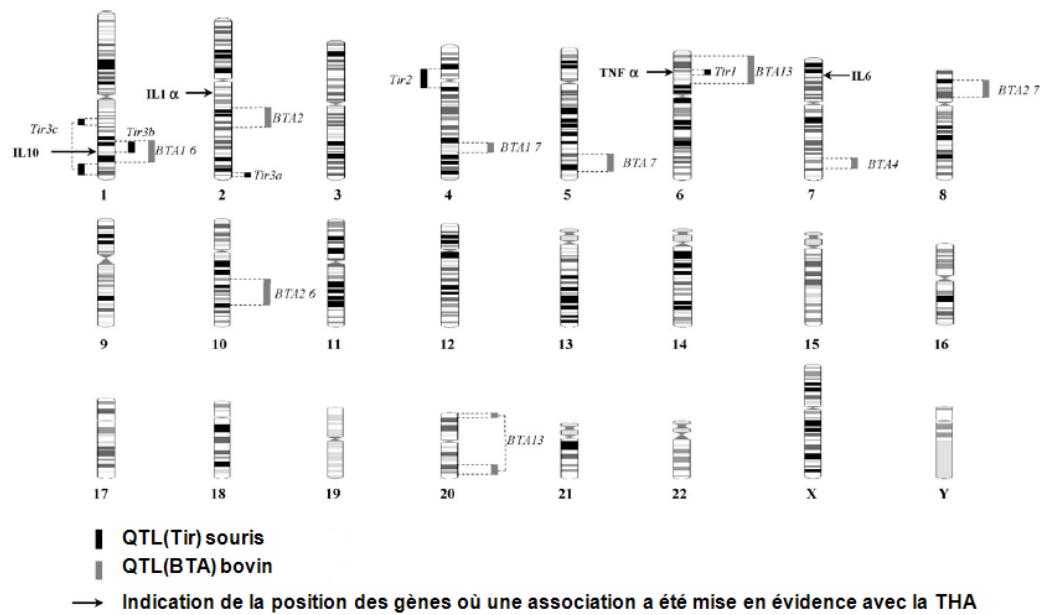


Figure 9 : Chromosomes humains et synténie avec les QTLS bovins et souris en regard de la résistance/susceptibilité à l'infection par les trypanosomes (Courtin *et al.*, 2008).

4.4. La réponse immunitaire de l'hôte dans les trypanosomoses africaines

4.4.1. Les études immunologiques chez la souris

Les parasites extracellulaires sont continuellement exposés au système immunitaire de l'hôte. La capacité de l'hôte à contrôler la parasitose dans les trypanosomoses africaines implique au moins quatre mécanismes qui sont connus : (i) la lyse par le complément et ou par des anticorps, (ii) la phagocytose médiée par les anticorps, (iii) l'immunité innée due au TLF présent dans le sérum humain et (iv) la libération des dérivés toxiques de l'oxygène (ROI = reactive oxygen intermediates) ou des dérivés de l'azote (RNI= reactive nitrogen intermediates) par les macrophages (Mansfield et Paulnock, 2005). La plupart des études connues sur la réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre les trypanosomes africains a été réalisée expérimentalement chez la souris. La première raison est que dans ces modèles expérimentaux on peut contrôler l'environnement, l'hôte, le parasite et qu'il est possible de

suivre l'évolution de la réponse immunitaire au cours de l'infection, ce qui est évidemment impossible chez l'Homme. La deuxième raison est que les différentes lignées de souris, affichent différents degrés de susceptibilité à l'infection, fournissant ainsi des modèles importants pour analyser les mécanismes de l'hôte impliqués dans le contrôle du processus infectieux (Tabel *et al.*, 2000). Cependant une grande variété de systèmes expérimentaux (différentes lignées de souris et différentes souches ou espèces de trypanosomes) a été utilisée et a donné des résultats parfois contradictoires concernant les facteurs immunologiques qui influencent la résistance aux trypanosomes africains. Toutefois, le tableau général est que la réponse de l'hôte nécessite la contribution de deux types de réponses, à savoir la réponse spécifique B anticorps dirigée contre les VSG et la réponse cellulaire faisant, notamment, intervenir une activation du système phagocytaire macrophages/monocytes pour contrôler l'infection. Les réponses cytokiniques de type Th1 (INF- γ , TNF α) conduisant à l'activation des macrophages et à la production du NO (oxyde nitrique) trypanotoxique (Magez *et al.*, 2006), sont observées pendant la phase précoce de l'infection à la fois chez les souris sensibles et résistantes. Cependant chez les souris résistantes, le profil cytokinique passe à une réponse de type 2 (IL-4, IL-10) (Baetselier *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003; Namangala *et al.*, 2009) pendant les stades tardifs/chroniques de l'infection limitant ainsi les réponses inflammatoires exagérées qui peuvent conduire à des lésions tissulaires et à une mortalité précoce (**figure 10**). Au contraire chez les souris sensibles, la mortalité précoce est causée par une hyper activation des macrophages associée avec une production excessive d'INF- γ , un syndrome inflammatoire systémique (Baetselier *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2006). Bien que le mécanisme régulant la réponse immunitaire de l'hôte ne soit pas totalement compris, des études récentes ont montré un rôle important des cellules NK (Natural Killers) T CD8 $^{+}$ qui ont le potentiel de contrôler les parasites via les macrophages dépendants de la production du NO et des cellules T régulatrices (Tregs) qui régulent négativement et progressivement les cellules T NK au cours des infections (Tabel *et al.*, 2008; Wei et Tabel, 2008).

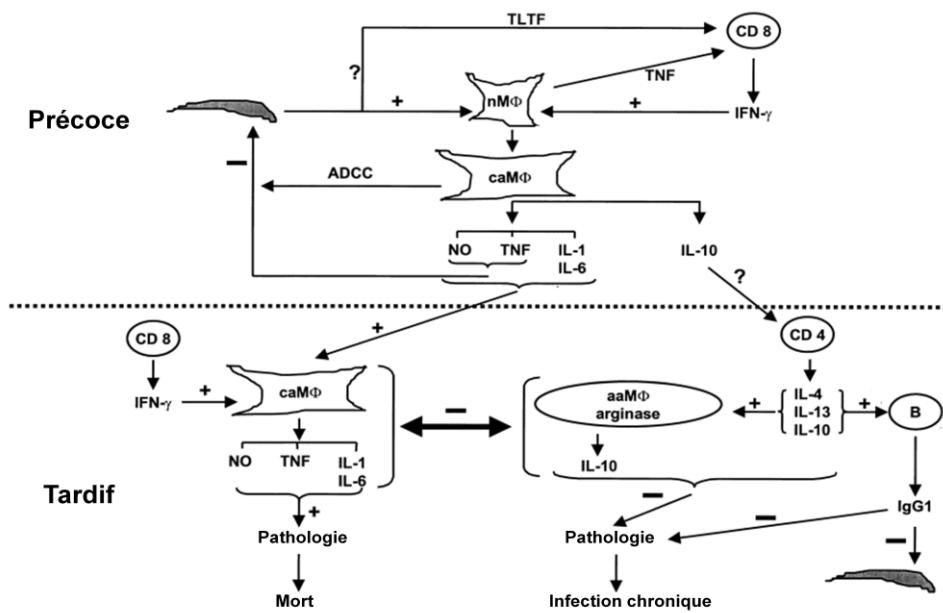


Figure 10 : Interaction hôte-parasite, modèle d'activation classique (caMΦ) et alternative des macrophages (aaMΦ) durant l'infection par les trypanosomes africains (Baetselier *et al.*, 2001).

Les cellules de la lignée macrophagique constituent la première ligne de défense contre les maladies infectieuses et modulent en aval les mécanismes ayant un impact sur le développement de l'immunité acquise. Comme indiqué précédemment, l'activation des macrophages est l'une des caractéristiques de l'infection par les trypanosomes africains. Cependant plusieurs études montrent que les macrophages sont aussi des cellules qui sont ciblées par les trypanosomes pour interférer avec la réponse de l'hôte afin d'établir une infection. De plus, les trypanosomes africains du fait de leur revêtement antigénique dont l'antigène majeur est la VSG échappent à la réponse immunitaire par le phénomène de la variation antigénique. Egalement, des molécules du parasite, telle que les VSG solubles ou des séquences d'ADN parasitaire libre non méthylé (CpG DNA) peuvent être impliqués dans la modulation de l'activation des macrophages via les voies de signalisation du TLR (Toll-like receptor) (Mansfield et Paulnock, 2005). Un autre mécanisme commun par lequel différents parasites échappent à la toxicité du NO produit par les macrophages est l'activation de l'arginase (Vincendeau *et al.*, 2003) qui conduit à un appauvrissement de la L-arginine (substrat de la NO synthase résultant de niveaux faibles de NO) et une production accrue de polyamines (nécessaire pour la croissance et la différenciation du parasite) (figure 11). En

effet, au cours des infections dues aux trypanosomes africains, des études ont montré une augmentation de l'arginase dans les premiers jours suivant l'inoculation des parasites. Cette induction est beaucoup plus importante chez les macrophages des souris trypanosensibles (Balb/C) en comparaison des souris trypanotolérantes (C57BL/6) (Duleu *et al.*, 2004). L'induction de l'arginase représente donc un mécanisme d'échappement des trypanosomes africains (Gobert *et al.*, 2000). Elle entraîne une diminution de la L-arginine circulante et les concentrations en L-arginine disponible pour NOSII (NO synthase inducible de type II) sont insuffisantes pour assurer une production suffisante de NO. *In vitro*, l'addition d'un inhibiteur de l'arginase restaure l'activité trypanocide des macrophages des souris infectées. Il semble, que cette induction de l'arginase macrophagique soit en partie au moins contrôlée par des antigènes secrétés/excrétés par les trypanosomes (Holzmüller *et al.*, 2008).

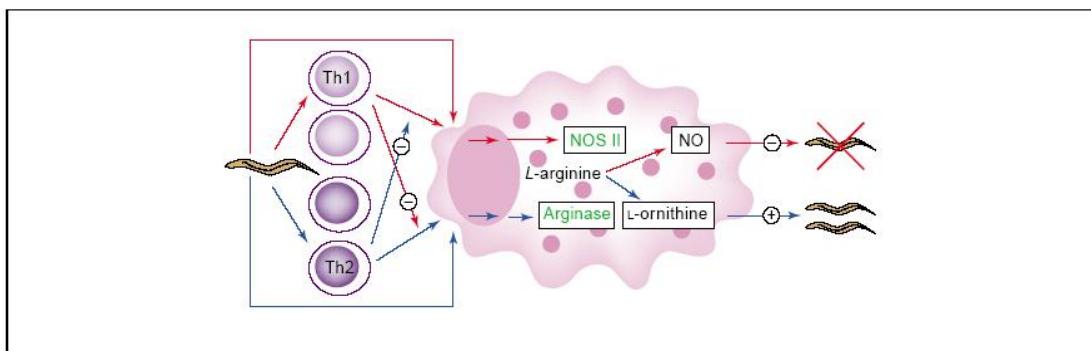


Figure 11 : Equilibre entre l'oxyde nitrique synthétase et l'arginase, et l'effet des macrophages sur les trypanosomes (Vincendeau *et al.*, 2003).

Les flèches bleues indiquent les mécanismes favorables à la croissance parasitaire via l'induction de l'arginase macrophagique. Les flèches rouges indiquent les mécanismes permettant le contrôle de la croissance parasitaire via l'induction de la NO synthase inducible (NOSII) et la production de dérivés cytotoxiques. Les signes (-) sur le côté gauche de la figure indiquent les effets inhibiteurs des cytokines de type Th1 sur l'induction de l'arginase et des cytokines de type Th2 sur l'induction de la NOSII.

4.4.2. Les études immunologiques chez l'Homme

Contrairement aux nombreuses études menées chez la souris, peu d'études ont été menées chez l'homme. Bien que les souris fournissent de bons modèles pour les études immunologiques, il faut garder à l'esprit qu'il y a des différences dans l'immunologie et la physiologie de la souris et de l'Homme (Mestas et Hughes, 2004), par exemple l'absence du TLF chez la souris, Ainsi les observations faites chez la souris ne peuvent pas être directement extrapolées au processus infectieux survenant au cours de la THA. Cela est particulièrement vrai pour la THA à *T. b. gambiense*. Les souris sont très sensibles à *T. congolense*, *T. b. brucei* et à *T. b. rhodesiense*, alors que les infections avec des isolats de terrain de *T. b. gambiense* requièrent l'utilisation de souris immuno-déficientes ou de souris Balb/c immunodéprimées par l'injection de cyclophosphamide (Giroud *et al.*, 2009).

A ce jour et pour des raisons principalement éthiques, la plupart des études immunologiques chez l'homme a porté sur la comparaison des niveaux de cytokines dans le sang et dans le LCR chez des patients atteints de la THA à différents stades de la maladie. Dans le sérum, les niveaux de cytokines étaient très peu corrélés avec les stades de la maladie. Cependant, les concentrations d'IL-8 et dans une moindre mesure d'IL-6 étaient légèrement supérieures (Lejon *et al.*, 2002; Courtioux *et al.*, 2006) chez les malades en première période, par rapport aux malades en deuxième phase précoce ou avancée. En revanche, les niveaux d'IL-10 étaient supérieurs chez les malades en deuxième phase avancée (mais la différence n'était pas significative). Dans le LCR cependant, des différences plus importantes ont été observées. En effet, l'IL-6, IL-8, IL-10 et IL-1 β sont significativement plus élevées dans le LCR des malades en deuxième phase avancée (Lejon *et al.*, 2002; Courtioux *et al.*, 2006). Ces cytokines observées dans le LCR, comprennent à la fois des cytokines inflammatoires qui résultent de la méningo-encéphalite généralisée survenant chez les malades en deuxième phase avancée et aussi des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 qui est produite certainement dans le but de contrôler la réaction inflammatoire excessive dans ce compartiment. Contrairement à *T. b. rhodesiense* dans lequel les concentrations plasmatiques d'IFN- γ étaient élevées durant les premières phases de l'infection et diminuaient dans les phases tardives (MacLean *et al.*, 2001), aucune variation du niveau de l'IFN- γ n'a été observée dans les infections à *T. b. gambiense*.

Une déficience majeure dans l'étude des cytokines dans la THA est le fait que toutes les études ont porté sur des patients atteints de la maladie, c'est-à-dire la réponse des individus

sensibles. Il est donc impossible de déduire à partir de ces données quel type de réponses pourraient être protecteur. Comme décrit précédemment, plusieurs études montrent l'existence d'individus trypanotolérants chez l'homme. Les outils permettant leur caractérisation étant disponibles (Trypanolyse et PCR), il paraît donc important maintenant de bien caractériser la réponse immune chez ces individus afin d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires du contrôle de l'infection à *T. b. gambiense* chez l'homme. A notre connaissance, une seule étude a inclus des individus SERO (n=9) (Courtin *et al.*, 2006b). Bien que les effectifs étaient trop petits pour tirer des résultats concluants, cette étude a mis en évidence que la réponse observée chez ces individus était très différente de celle observée à la fois chez les malades et les contrôles endémiques.

Chapitre 5 : Problématique

La THA, maladie potentiellement mortelle, a pendant longtemps été considérée comme fatale dans 100% des cas, alors que des observations de terrain et plusieurs études ont montré que ce n'est pas toujours le cas (Checchi *et al.*, 2008; Sternberg et Maclean, 2010; Bucheton *et al.*, 2011). Au contraire, l'infection par *T. b. gambiense* en Afrique de l'Ouest et Centrale se caractérise, comme nous l'avons vu dans la partie introductive, par une importante diversité clinique de réponses à l'infection. En particulier, de nombreuses observations épidémiologiques indiquent l'existence d'individus asymptomatiques dont certains sont capables de contrôler l'infection à bas bruit sur de longues périodes, des guérisons spontanées étant même suspectées dans certains cas. Ces observations ne sont pas sans rappeler le phénomène de trypanotolérance décrit de façon extensive chez les bovins et pour certaines lignées consanguines de souris. A l'inverse, très peu d'études se sont attachées à caractériser ce phénotype chez l'homme, en partie du fait du manque de sensibilité et de spécificité des outils diagnostiques utilisés sur le terrain. Le rôle potentiel de ces individus dans le cycle de vie de *T. b. gambiense* ainsi que les mécanismes immunologiques et moléculaires mis en jeux pour contrôler l'infection, restent aujourd'hui encore inconnus. Une limitation importante pour l'étude de la trypanotolérance humaine est que le statut des individus SERO est très certainement hétérogène, comprenant à la fois (i) des sujets présentant une fausse réactivité au CATT, (ii) des individus dans les toutes premières phases de l'infection et qui vont développer la maladie par la suite et (iii) des individus trypanotolérants, dont certains seront capables de contrôler l'infection sur le long terme. Cependant, l'utilisation d'outils plus sensibles comme la PCR, plus spécifiques comme le test de trypanolyse, et surtout le suivi dans le temps de ces individus, offrent la possibilité de résoudre cette complexité et d'identifier en zone d'endémie ces individus trypanotolérants. Une meilleure caractérisation de ce phénotype chez l'homme, des molécules et des voies métaboliques impliquées est importante car elle est en mesure d'ouvrir de nouvelles perspectives à au moins deux niveaux : (i) l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou vaccinales, et (ii) l'optimisation des stratégies pour une lutte plus durable en ciblant mieux les individus à risque de transmettre l'infection.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse a été d'étudier les mécanismes immunologiques et moléculaires qui caractérisent la trypanotolérance humaine.

Pour atteindre cet objectif, une première étape de ce travail a été de caractériser, dans une zone d'endémie, la diversité de réponses à l'infection et de mettre en évidence des

marqueurs biologiques permettant d'identifier les individus trypanotolérants. Cette étude a été menée en Guinée, le pays le plus touché par la THA en Afrique de l'ouest, où nous avons pu constituer, à partir de prospections médicales menées sur le terrain en collaboration avec le PNLTHA, des cohortes de patients atteints de THA et d'individus SERO. Les échantillons biologiques prélevés de ces individus (ADN sanguins et plasmas) ont été testés au CIRDES à l'aide d'outils sérologiques (test de trypanolyse) et moléculaires (PCR TBR1/2) qui permettent une caractérisation plus fine du statut parasitologique que les méthodes diagnostiques utilisées sur le terrain (CATT et mAECT-bc). Les individus constitutifs ces cohortes ont ensuite été suivis pendant au moins deux ans afin de caractériser l'évolution de leur statut sérologique et parasitologique dans le temps.

La diversité clinique caractérisée, la deuxième étape de ce travail a été d'analyser la réponse de l'hôte développée vis à vis des trypanosomes dans ces différentes catégories d'individus, afin d'identifier des marqueurs immunologiques ou moléculaires qui leurs seraient propres. Notre échantillonnage nous permettait par ailleurs une analyse à deux niveaux : (i) diagnostic, en comparant les patients atteints de THA (phase 1 et phase 2), les individus SERO et des contrôles endémiques, et (ii) pronostique en analysant les résultats en fonction du devenir de l'infection dans le temps chez les SERO. La caractérisation de la réponse vis à vis de l'infection s'est faite par deux approches. La première a consisté à doser les cytokines plasmatiques qui sont le reflet de la nature de la réponse immune (TH1, TH2, pro-inflammatoire) mise en jeux. La deuxième a consisté à quantifier l'expression de certains gènes dans le compartiment sanguin. Pour ce dernier volet, nous avons choisi de nous intéresser en particulier au gène *APOL1*. En effet, *APOL1* est une protéine majeure dans l'interaction de l'homme avec les trypanosomes. Elle le protège contre l'infection par les trypanosomes animaux. Par ailleurs, il a été montré récemment que certains polymorphismes de ce gène, vraisemblablement sélectionnés en Afrique et situés dans le domaine d'interaction avec la protéine SRA, pourraient protéger contre *T. b. rhodesiense* mais non *T. b. gambiense* (Genovese *et al.*, 2010). Contrairement à *T. b. rhodesiense*, chez qui la résistance au sérum humain est dépendante de l'expression du gène SRA, les mécanismes de résistance chez *T. b. gambiense* semblent liés à une réduction de l'absorption d'*APOL1* par les trypanosomes due à une faible expression du récepteur parasitaire correspondant (Kieft *et al.*, 2010). Au vu de ces résultats, nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle le statut trypanotolérant chez l'homme pourrait être lié à une plus forte expression du gène *APOL1* chez ces individus.

Deuxième partie : Méthodologie

Chapitre 1 : Zones d'études et prospections médicales

Durant nos travaux de thèse, nous avons participé aux activités de prospections médicales menées par l'équipe IRD/CIRDES, centre collaborateur de l'OMS, en collaboration avec l'IPR Côte d'Ivoire et le PNLTHA de Guinée. Durant les prospections médicales, les objectifs visés, étaient de constituer une banque d'échantillons biologiques et de données épidémiologiques sur la THA en Afrique de l'Ouest (Guinée) qui allait nous permettre d'une part de répondre aux questions que nous nous sommes posées dans le cadre de cette thèse, et d'autre part servir pour les autres études de notre équipe et de ses partenaires. Les activités de terrain ont débuté en novembre 2007. Au total, j'ai participé à 5 prospections médicales (Novembre 2007, Mars 2008, Mai 2008, Avril 2009, Mai 2010) et 6 activités de suivi des sujets trypanosomés et SERO identifiés lors de l'ensemble de ces activités de surveillance médicale (Mars 2008, octobre 2008, Février 2009, Avril 2010, mars 2011, mai 2011). Les activités de terrain dans le cadre de notre thèse se sont déroulées dans 3 foyers distincts de la Guinée (Forécariah, Dubréka et Boffa (**figure 12**)).



Figure 12 : Carte de la Guinée et localisation des zones d'études.

1.1. Présentation des zones d'études

La République de Guinée est située dans la partie occidentale du continent africain (**figure 12**) et couvre une superficie de 245 857 km². Elle est subdivisée en quatre zones ou «régions naturelles» : la zone côtière ou la Basse-Guinée (ou Guinée maritime), la Moyenne-Guinée abritant le Fouta-Djalon montagneux, la Haute-Guinée, et la Guinée forestière. Les foyers de Forécariah, Dubréka et Boffa se localisent dans la Basse-Guinée. Située dans la partie Ouest du pays, la Basse-Guinée est large de 150 km et s'étale le long de l'océan atlantique sur environ 300km. Elle couvre près de 44 000 km² et regroupe 36% de la population du pays, soit 2,5 millions d'habitants. La population est composée en majorité de Soussous, sédentaires, regroupés dans de petits villages de 300 à 2000 habitants, dispersés le long du littoral. Son climat est influencé par la mousson, alizé qui apporte une abondante précipitation sur la côte. La pluviométrie moyenne est partout supérieure à 1 800 mm/an atteignant 3 000 mm/an à Conakry. Les températures sont comprises entre 21 et 27°C tout au long de l'année. La région est arrosée par de nombreux cours d'eau qui drainent sur la côte de larges plaines propices pour la riziculture. La proximité de l'océan atlantique favorise la pêche artisanale et l'aménagement de grands ports commerciaux et miniers, en plus de nombreux débarcadères tout au long de la côte. Les activités quotidiennes sont essentiellement liées à la culture du riz (**photo 5-a**), à la pêche (**photo 5-b**), à l'exploitation du sel (**photo 5-c**) et à la coupe de bois (**photo 5-d**). L'environnement est constitué de mangroves (**photo 5-e**) de forêts reliques et de bas-fonds souvent cultivés. Ces endroits humides, aérés et ombragés abritant de fortes densités de mouches tsé-tsé sont les principaux lieux d'activité des pêcheurs, des bûcherons, des extracteurs de sel, des cultivateurs constituant ainsi des biotopes favorables au contact homme-vecteur (glossine) et donc de transmission potentielle de la THA.



a) Rizière



b) Pêche



c) Extraction de sel



d) Coupe de bois



e) Chenal de mangrove

Photo 5 : Différents faciès favorables à la transmission de la THA en zone de mangrove (source IRD/CIRDES).

1.1.1. Le foyer de Forécariah

La préfecture de Forécariah est située, d'une part entre 12°34' et 13°34' de longitude Ouest, et d'autre part entre 9°2' et 9°45' de latitude Nord. Elle est dans l'extrême Sud Ouest de

la Guinée (délimitée au Sud par la frontière avec la Sierra Leone) à 100 km de la capitale Conakry et fait partie de la Guinée maritime d'une part et de la région administrative de Kindia d'autre part. Son climat est de type tropical sub guinéen et la pluviométrie annuelle varie entre 3 000 à 4 000 mm³ d'eau et la température moyenne est 25°C. Parmi les 10 sous-préfectures, Benty est une presqu'île, Kaback et Kakossa des îles. L'une des spécialités de la préfecture de Forécariah tient à l'abondance dans sa partie occidentale, de mangrove due à sa bordure océanique riche en bras de mer. Ce sont des zones de vastes plaines et bas-fonds rizi-cultivables par excellence. La population est principalement composée d'autochtones Soussous dont les activités principales sont l'agriculture (principalement la riziculture), la pêche, l'élevage et le commerce.

Le foyer de Forécariah, bien que reconnu comme foyer historique, peu d'informations étaient disponibles sur la THA avant le début de notre thèse, mais plusieurs cas avaient été dépistés activement par le PNLTHA/Guinée en 2004 lors d'une prospection médicale. Des cas dépistés passivement au centre de traitement de Dubréka provenaient aussi de cette zone. Les prospections médicales réalisées par notre équipe ont permis de confirmer le caractère endémique dans le foyer de Forécariah.

1.1.2. Le foyer de Dubréka

La préfecture de Dubréka est située au Nord-Ouest de la Guinée maritime à 50 km de la capitale Conakry (13°31'N, 9°46'W). Elle est bordée à l'Est par les préfectures de Coyah et de Kindia, à l'Ouest par la préfecture de Boffa, au Nord par celle de Fria et au Sud par l'océan Atlantique. La pluviométrie annuelle varie entre 2 000 à 4 000 mm³ d'eau et la température moyenne est de 26°C. Le peuplement est dominé par les Soussou et constitué par une minorité de Peul. Il existe également quelques peuplements de Ballantes et de Temne respectivement originaires de Guinée-Bissau et de Sierra Leone.

Le foyer de Dubréka représente encore aujourd'hui, le foyer le plus actif de Guinée. (Camara *et al.*, 2005). Plusieurs prospections médicales menées de 1997 à 2010 par le PNLTHA de Guinée en collaboration avec l'équipe IRD/CIRDES de Bobo-Dioulasso et l'IPR de Bouaké ont permis de dépister et traiter des centaines de trypanosomés et identifier des centaines de séropositifs. Son espace végétatif favorise la transmission et la diffusion de la maladie dans toute la zone de mangrove, notamment au niveau des estuaires et des chaines de mangroves où les populations pratiquent de nombreuses activités de subsistance (riziculture,

extraction de sel, pêche, coupe du bois, etc.) qui impliquent des déplacements quotidiens ou saisonniers des populations.

1.1.3. Le foyer de Boffa

La préfecture de Boffa est située dans la zone de la Guinée maritime, à 150 km au Nord-Ouest de Conakry (10°10'N, 14°02'W). La pluviométrie annuelle varie entre 2 000 à 3 000 mm³ d'eau. Comme à Forécariah et à Dubréka, la population est composée majoritairement de Soussou et l'essentiel des activités est dédiée à la pêche, au bois et à l'exploitation du sel pendant la saison sèche et à la culture du riz pendant la saison des pluies.

Le foyer de Boffa est encore aujourd'hui l'un des foyers les plus actifs de la Guinée comme celui de Dubréka. Les récentes prospections médicales menées par le PNLTHA de Guinée en collaboration avec notre équipe ont permis de dépister plusieurs dizaines de trypanosomés et identifier des séropositifs. Son environnement favorise aussi la transmission et la diffusion de la maladie dans toute la zone de mangrove.

1.2. Dépistage et inclusion des sujets

Le dépistage et l'inclusion des sujets ont été réalisés grâce aux activités de prospections médicales menées par le PNLTHA/Guinée en collaboration avec l'IRD/CIRDES de Bobo-Dioulasso et l'IPR Côte d'Ivoire.

1.2.1. Préparation de la prospection médicale

Avant la prospection médicale, une cartographie et un recensement exhaustif de la population de nos zones d'études famille par famille ont été réalisés. Un numéro individuel de recensement a été attribué à toute personne recensée. Ces étapes permettent d'avoir une idée précise du nombre de personnes qui peuplent nos zones d'études et de leur répartition, d'identifier des centres de regroupement (centres de prospection) et de définir le programme de prospection (tel jour dans tel village). Elles permettent aussi, lors de la prospection médicale, d'avoir une idée très précise sur la part et la localisation de la population présente, de rechercher et sensibiliser les absents pour les convaincre d'accepter le dépistage et de connaître à l'issue de la prospection la part de la population testée et sa distribution. Lors de ces étapes préliminaires à la prospection médicale active, la population est aussi sensibilisée

afin de la convaincre de l'intérêt du dépistage de la THA et qu'il concerne tous les individus vivants dans la zone. Les étapes de sensibilisation sont extrêmement importantes auprès de ces populations qui vivent dans des zones rurales parfois très reculées.

1.2.2. Prospection médicale

Le dépistage des trypanosomés a été effectué de façon classique, selon les procédures habituellement utilisées par le PNLTHA/Guinée (**figure 13**). Le jour de la prospection médicale, 70 μ l de sang sont prélevés dans un tube hématocrite sur l'ensemble de la population présente dans le but de réaliser un test sérologique, le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (Magnus *et al.*, 1978) sur sang total (CATT/sg (**photo 6-a**)). Les individus positifs à ce test (agglutination visible, signe d'une réaction antigènes / anticorps recherchés) font l'objet d'un prélèvement de sang au pli du coude (10ml de sang sur tube Vacutainer® hépariné) pour effectuer un CATT sur dilutions successives de plasma (CATT/pl (**photo 6-b**)) plus spécifique que le CATT/sg. On note alors la dernière dilution qui donne un résultat positif (présence d'une agglutination). Les tests parasitologiques : mini-Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) (Lumsden *et al.*, 1979) et la recherche microscopique des trypanosomes dans le suc ganglionnaire (étalé à l'état frais entre lame et lamelle) prélevé en cas de présence d'adénopathie cervicale, sont effectués pour tous les sujets CATT/pl \geq 1/8. Les sujets positifs aux tests parasitologiques sont confirmés trypanosomés, les individus positifs au CATT/pl (CATT/pl \geq 1/8) mais négatifs en parasitologie sont qualifiés de séropositifs (SERO). Le diagnostic de phase est alors effectué sur les trypanosomés pour le choix du traitement à administrer. Il a été fait par ponction lombaire et la recherche des trypanosomes a été faite de façon directe par simple centrifugation modifiée du LCR (Cattand *et al.*, 1988; Miezan *et al.*, 2000) ou de façon indirecte par comptage de cellules (Cytorachie). Les trypanosomés ont été classés en 3 catégories pour le traitement selon les recommandations du PNLTHA/Guinée.

- (i) Les trypanosomés en phase 1 : cytorachie \leq 5 cellules et absence de trypanosomes dans le LCR, ont été traités à la pentamidine par 7 injections intramusculaires tous les jours pendant 7 jours consécutifs à la dose de 4mg/kg.
- (ii) Les trypanosomés en phase 2 précoce : cytorachie \leq 5 cellules et présence de trypanosomes ou cytorachie comprise entre 6 et 20 cellules dans le LCR, ont été aussi traités à

la pentamidine par 10 injections intramusculaires espacées de 48 heures à la dose de 4mg/kg/jour.

(iii) Les trypanosomés en phase 2 avancée : cytorachie \geq 20 cellules dans le LCR, ont été traités à l'arsobal (melarsoprol) par voie intraveineuse selon un schéma long de 3 séries de 4 jours espacées de 10 jours chacune (1/3 de la dose au 1^{er} jour, 2/3 de la dose au 2^{ème} jour et une dose complète le 3^{ème} et le quatrième jour).

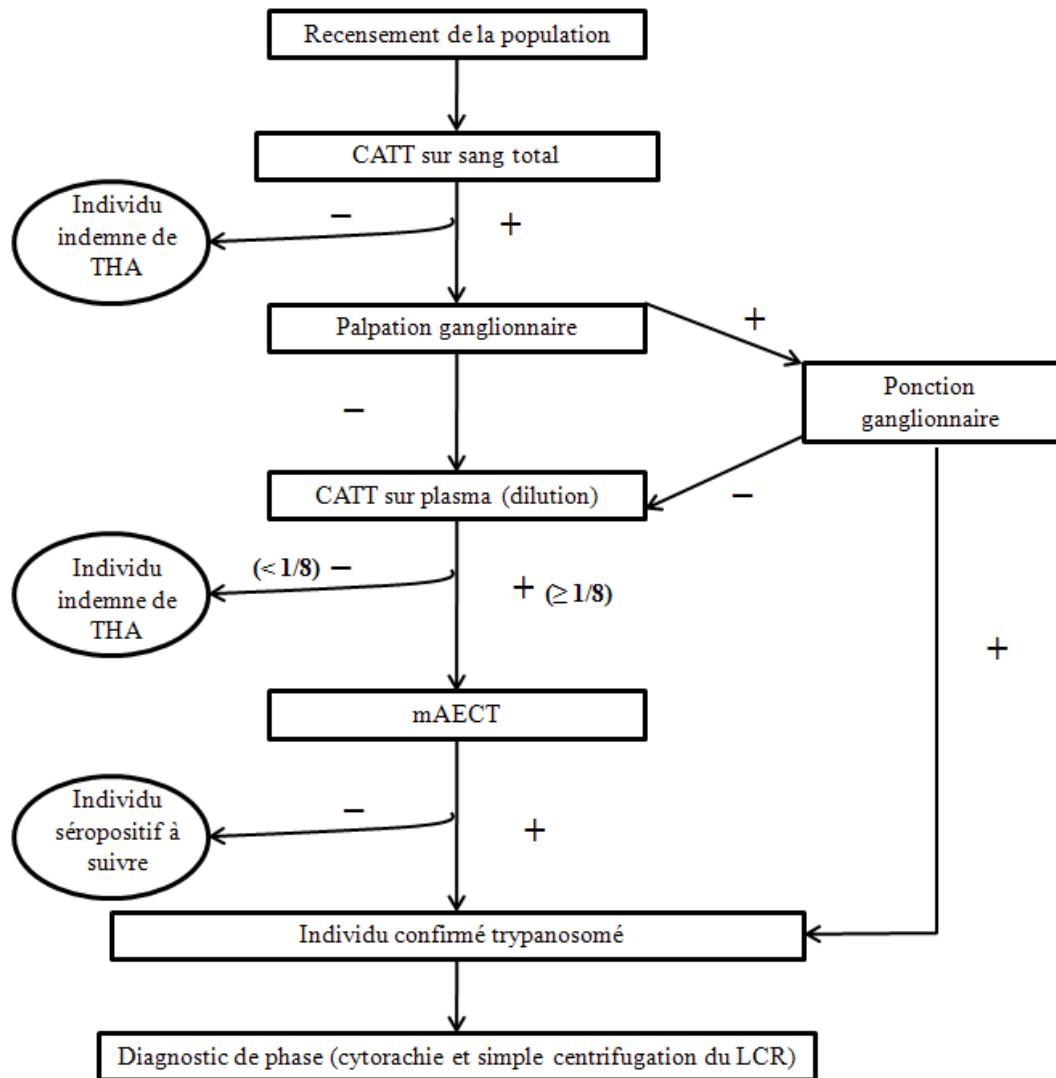
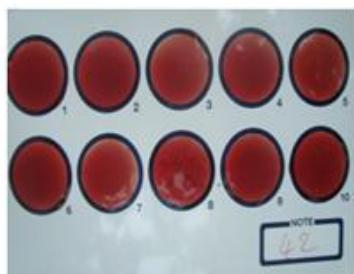
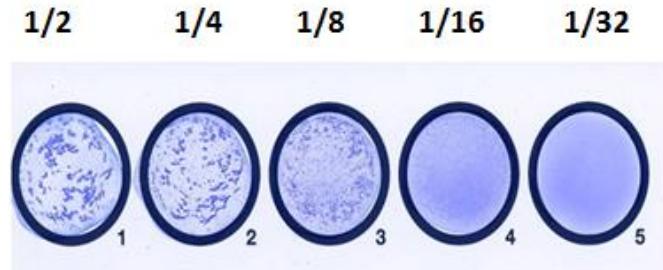


Figure 13 : Stratégie classique de dépistage de masse de la Trypanosomose Humaine Africaine.



a) CATT réalisé sur le sang



b) CATT réalisé sur dilutions successives du plasma

Photo 6 : CATT sang et CATT plasma (source IRD/CIRDES).

Sur la **photo 6-a**, le cercle 8 montre une agglutination qui signifie un test CATT/sg positif. Sur la **photo 6-b**, Les cercles 1 à 5 correspondent au CATT plasma effectué sur dilutions successives du plasma (1 = dilution 1/2, 2 = dilution 1/4 ; 3 = 1/8, 4 = 1/16 et 5 = 1/32) d'un sujet précédemment positif au CATT/sg. On voit que la dernière dilution montrant une agglutination est la dilution 1/16 (cercle 4), le résultat est noté CATT/pl = 1/16.

1.2.3. Inclusion des sujets

Nous avons inclus 3 types de sujets :

- Des trypanosomés (T^+) : sujet ayant un CATT/sg positif, un CATT/pl $\geq 1/8$ et un test parasitologique positif.
- Des séropositifs (SERO) : sujet ayant un CATT/sg positif, un CATT/pl $\geq 1/8$ sans confirmation parasitologique.
- Des sujets sains ayant un CATT/sg négatif et un CATT/pl négatif.

De manière générale et pour tous les sujets inclus, nous avons échantillonné 1ml de plasma, 1ml de buffy coat, 5 μ l de suc ganglionnaire (uniquement pour les trypanosomés et les séropositifs ayant des adénopathies cervicales), 1ml de LCR (pour les trypanosomés uniquement), 1ml de sang, et 1 tube PAXGen (utilisés pour la préservation des ARNs sanguins). Tous les échantillons ont été immédiatement conservés à -20°C (congélateur de véhicule) jusqu'à leur arrivée au CIRDES de Bobo-Dioulasso où ils ont été stockés à -80°C pour les analyses de laboratoire. Pour tous les sujets inclus, un questionnaire épidémiologique et clinique a été rempli (**voir annexe 1**). Les lieux d'habitation de tous ces sujets ont également été géo-référencés.

1.2.4. Suivi des trypanosomés et des séropositifs

Les activités de suivi ont consisté à suivre les trypanosomés après traitement et les SERO sans confirmation parasitologique. Au cours de ces activités, nous avons visité chaque trypanosomé et SERO inclus dans cette étude à domicile, les tests sérologiques et parasitologiques ont été répétés chez tous les trypanosomés et les SERO. Une ponction lombaire a été de nouveau réalisée chez tous les trypanosomés au cours de leur suivi jusqu'à un retour à la normale de la cytorachie. L'intérêt du suivi était multiple ; (i) au niveau des trypanosomés, le suivi nous permettait de vérifier l'efficacité des différents schéma de traitement utilisés et de repérer d'éventuels cas de rechutes; (ii) au niveau des SERO, il nous permettait de classer les SERO en trois groupes à savoir les SERO qui deviennent trypanosomés, les SERO qui maintiennent des titres CATT plasma élevés et les SERO qui se négativent au titre CATT/pl ; (iii) de manière plus générale lors du suivi, nous avons par ailleurs eu l'occasion de tester les personnes absentes lors des prospections précédentes, les personnes de l'entourage des sujets suivis et toute personne se présentant spontanément à l'équipe de suivi. Ces activités de dépistage actif menées pendant le suivi ont été très efficaces car elles nous ont permis de réaliser un criblage de la population la plus à risque (celle présente dans l'entourage des trypanosomés ou d'éventuels porteurs asymptomatiques de parasites). Le même protocole d'échantillonnage que celui appliqué lors du diagnostic initial (prospection médicale) a été utilisé lors du suivi.

Considérations éthiques :

Tous les individus inclus dans cette étude ont été informés du protocole dans leur langue et ont signé un consentement éclairé. Tous les trypanosomés dépistés ont été traités selon les recommandations du PNLTHA/ Guinée. Un accord a été obtenu du comité éthique de l'IRD (CCDE IRD) et de l'OMS (N°RPC222 du WJO ERC) pour la phase d'échantillonnage dans le cadre des prospections médicales. Les sujets de l'étude, sérologiquement positifs sans confirmation parasitologique (pour lesquels il n'y a pas d'indication thérapeutique et qui ne sont pas traités) ont bénéficié dans le cadre de cette étude d'un suivi longitudinal et ont été traités si une infection de THA était détectée.

1.3. Diagnostic parasitologique : amélioration de la sensibilité de la mAECT

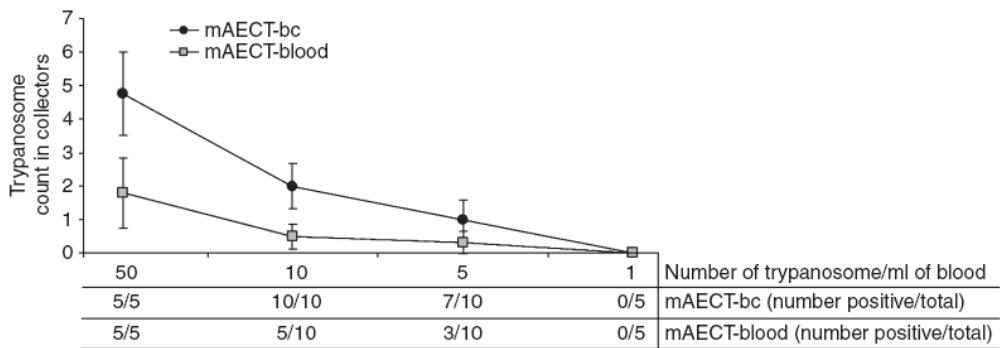
Cette étude a fait l'objet d'une publication dans « Tropical Medicine and International Health » (voir annexe 3)

Lors des activités de dépistage, nous avons remarqué que la plupart des mAECT sur sang effectuées dans les foyers de mangrove guinéenne étaient négatives. Ceci est en contraste avec ce qui est observé dans les foyers voisins de la Côte d'Ivoire et indique que la THA en Guinée se caractérise par de faibles parasitémies. Effectivement, en Guinée, les trypanosomés étaient jusqu'alors en majorité dépistés grâce à l'examen du suc ganglionnaire (Camara *et al.*, 2005). Dans le protocole classique de la mAECT (Buscher *et al.*, 2009), les trypanosomes (contenus dans 350µl de sang) sont séparés des éléments figurés du sang par chromatographie échangeuse d'anion sur cellulose DEAE (diethylaminoethyl cellulose). Les trypanosomes sont élués dans un collecteur et concentrés par centrifugation à 1 500g. La pointe du collecteur est ensuite lue au microscope. Une étude, à laquelle j'ai participé, a été menée dans le foyer de Dubréka dont le but était d'augmenter la sensibilité de la mAECT. Dans cette étude, nous avons ajouté une étape supplémentaire de concentration des parasites par centrifugation du sang prélevé sur tube Vacutainer® hépariné. Pour ce faire, 350µl de buffy coat (bc, couche concentrée de leucocytes) sont alors utilisés au lieu des 350µl de sang dans le protocole classique de la mAECT. Ce protocole a d'abord été testé expérimentalement au CIRDES sur des dilutions en série de trypanosomes et a ensuite été évalué sur le terrain lors d'une prospection médicale sur 57 trypanosomés diagnostiqués. Tous les tests ont été réalisés avec 5ml de sang prélevé sur tube Vacutainer® hépariné. Le tube est centrifugé 5mn à 1 500g, on prélève 350µl de bc à l'aide d'une pipette munie d'un cône préalablement coupé avec un ciseau à 5 mm de l'extrémité du cône. Les 350µl de bc prélevés sont ensuite traités sur la colonne mAECT selon le protocole classique.

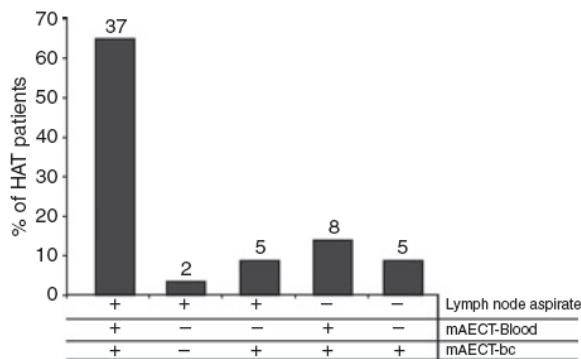
L'évaluation expérimentale de la mAECT-bc a montré que le nombre moyen de trypanosomes récupéré dans le collecteur de la mAECT-bc était significativement plus élevé que celui récupéré dans le collecteur de la mAECT-sang à toutes les concentrations de parasites testées (50,10 et 5 trypanosomes/ml (**figure 14-a**)), sauf pour la concentration de 1 trypanosome/ml où les deux tests étaient négatifs. Le seuil de sensibilité de la mAECT-sang étant de 50 trypanosomes/ml, tous les collecteurs des mAECT-sang étaient effectivement

positifs à 50 trypanosomes/ml, alors que 50% (5 collecteurs sur 10) et 30% (3 collecteurs sur 10) étaient positifs à 10 et 5 trypanosomes/ml. Cependant tous les collecteurs des mAECT-bc étaient encore positifs (10 collecteurs sur 10) à 10 trypanosomes/ml et 70% (7 collecteurs sur 10) à 5 trypanosomes/ml. Ainsi, l'utilisation du bc améliore la sensibilité du test mAECT d'au moins cinq fois et a permis de détecter de façon consistante des parasites dans le sang à une concentration de 10 trypanosomes/ml.

La mAECT-bc a ensuite été évaluée sur le terrain lors d'une prospection médicale dans le foyer de Dubréka. Au total, 57 trypanosomés ont été dépistés par au moins un des tests parasitologiques utilisés dans le diagnostic (examen du suc ganglionnaire, mAECT-sang ou mAECT-bc), dont 37 trypanosomés (64,9%) étaient positifs à tous les tests, 2 (3,5%) étaient positifs seulement à l'examen microscopique du suc ganglionnaire et 5 (8,7%) étaient positifs seulement à la mAECT-bc (**figure 14-b**). De manière générale, plus de trypanosomés étaient positifs à la mAECT-bc (96,5%), que l'examen microscopique du suc ganglionnaire (77,2%) et de la mAECT-sang (78,9%) et 10 patients négatifs à la mAECT-sang étaient positifs à la mAECT-bc. Par ailleurs, comme précédemment observé, le nombre de parasites par collecteur était significativement plus élevé lorsque le bc était utilisé à la place du sang.



a) Évaluation expérimentale de la mAECT-bc et de la mAECT-sang



b) Répartition des malades en fonction des résultats des tests parasitologiques

Figure 14 : Evaluation expérimentale et sur le terrain de la technique de filtration sur mini-colonne échangeuse d'anions (mAECT-bc).

a) La comparaison de la mAECT-bc et de la mAECT-sang ont été réalisées sur des dilutions en série de *T. b. gambiense* à partir d'une souche isolée en Guinée et produite sur des souris Balbc. La concentration des parasites testée était de 50 trypanosomes/ml (n=5), 10 trypanosomes/ml (n=10), 5 trypanosomes/ml (n=10), et 1 trypanosome/ml (n=5). Le graphique représente le nombre moyen des parasites comptés dans les collecteurs pour chaque concentration de parasite. La déviation standard de la moyenne est également indiquée. Les proportions des collecteurs positifs (avec au moins un trypanosome vu) sont indiquées dans le tableau sous le graphique. b) L'histogramme représente le pourcentage de trypanosomés positifs en fonction des trois tests parasitologiques effectués. Pour les sujets ayant un CATT/pl $\geq 1/8$, l'examen microscopique du suc ganglionnaire a été réalisé lorsque les ganglions lymphatiques étaient présents et 5 ml de sang ont été prélevés sur un tube hépariné. 350 μ l du sang ou de bc ont servi à la réalisation de la mAECT. Les résultats sont présentés pour tous les trypanosomés positifs à moins un des tests parasitologiques (n = 57).

1.4. Résultats des prospections médicales dans les 3 foyers

Les prospections médicales et les activités de suivi réalisées dans le cadre de cette thèse se sont déroulées de 2007 à 2011. Dans le foyer de Forécariah, nous avons dépisté 31 trypanosomés soit une prévalence de 0,24% et identifié 31 SERO soit une séroprévalence de 0,24% (**tableau I-a, (figure 15-a)**). Dans le foyer de Dubréka, 100 trypanosomés (prévalence = 1,7%) et 56 SERO (séroprévalence = 0,96% (**tableau I-b, figure 15-b**)) ont été dépistés. Dans le foyer de Boffa, nous avons dépisté 56 trypanosomés (prévalence = 0,55%) et 46 SERO (séroprévalence = 0,45% (**tableau I-c, figure 15-c**)).

Tableau I : Bilan des prospections médicales menées dans les 3 foyers de 2007 à 2011

a- Forécariah

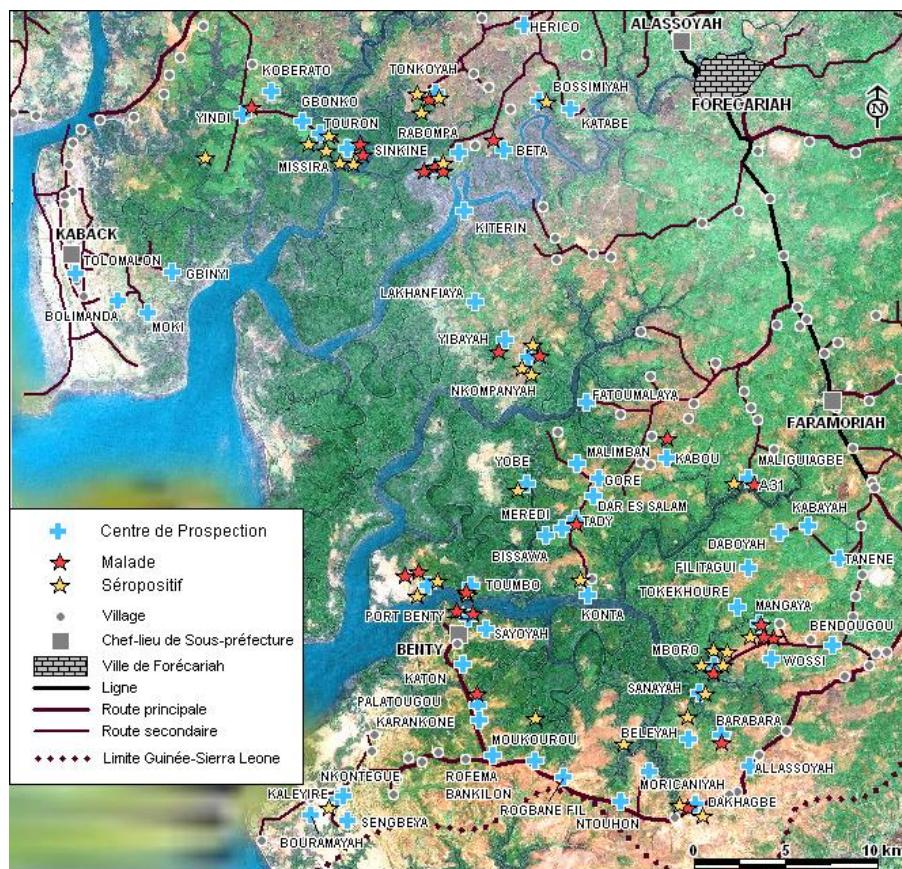
Période	Activité de Terrain	Trypanosomés	SERO	Villages visités
Novembre 2007	Prospection médicale	13	16	30
Mars 2008	Prospection médicale	5	11	29
	Suivi	1	3	-
Octobre 2008	Prospection médicale	2	0	7
	Suivi	4	1	-
Avril 2010	Prospection médicale + suivi	6	0	13
	Total	31	31	79
	Prévalence	0,24%	0,24%	

b- Dubréka

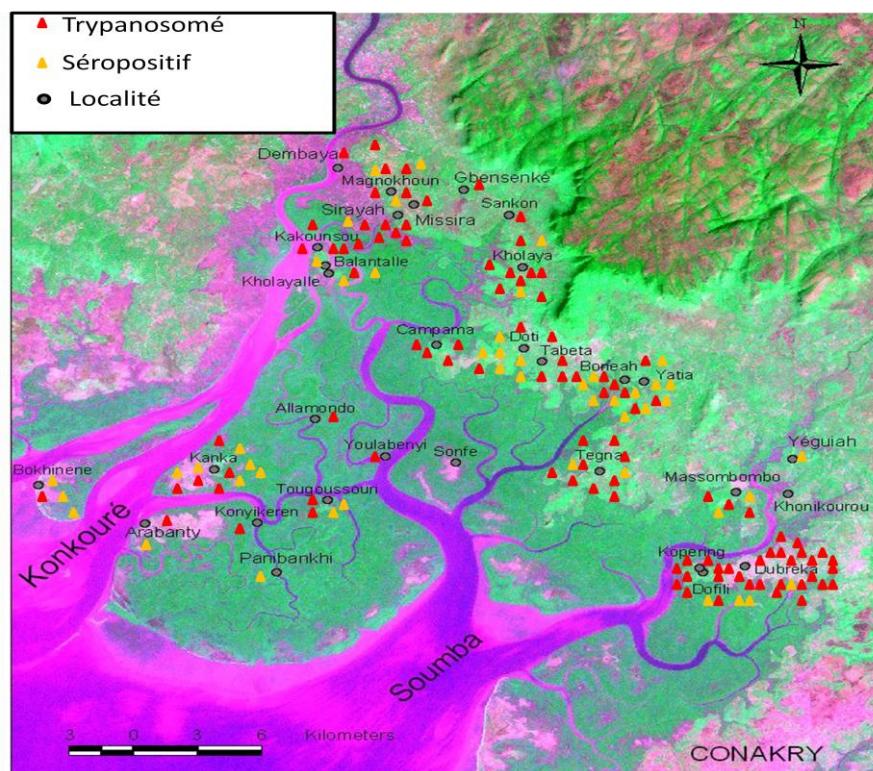
Période	Activité de Terrain	Trypanosomés	SERO	Villages visités
Mai 2008	Prospection médicale	29	8	12
Février 09	Suivi	8	5	-
Avril 2009	Prospection médicale	50	38	63
Mars 2011	Prospection médicale + suivi	13	5	33
	Total	100	56	108
	prévalence	1,7%	0,96%	

c- Boffa

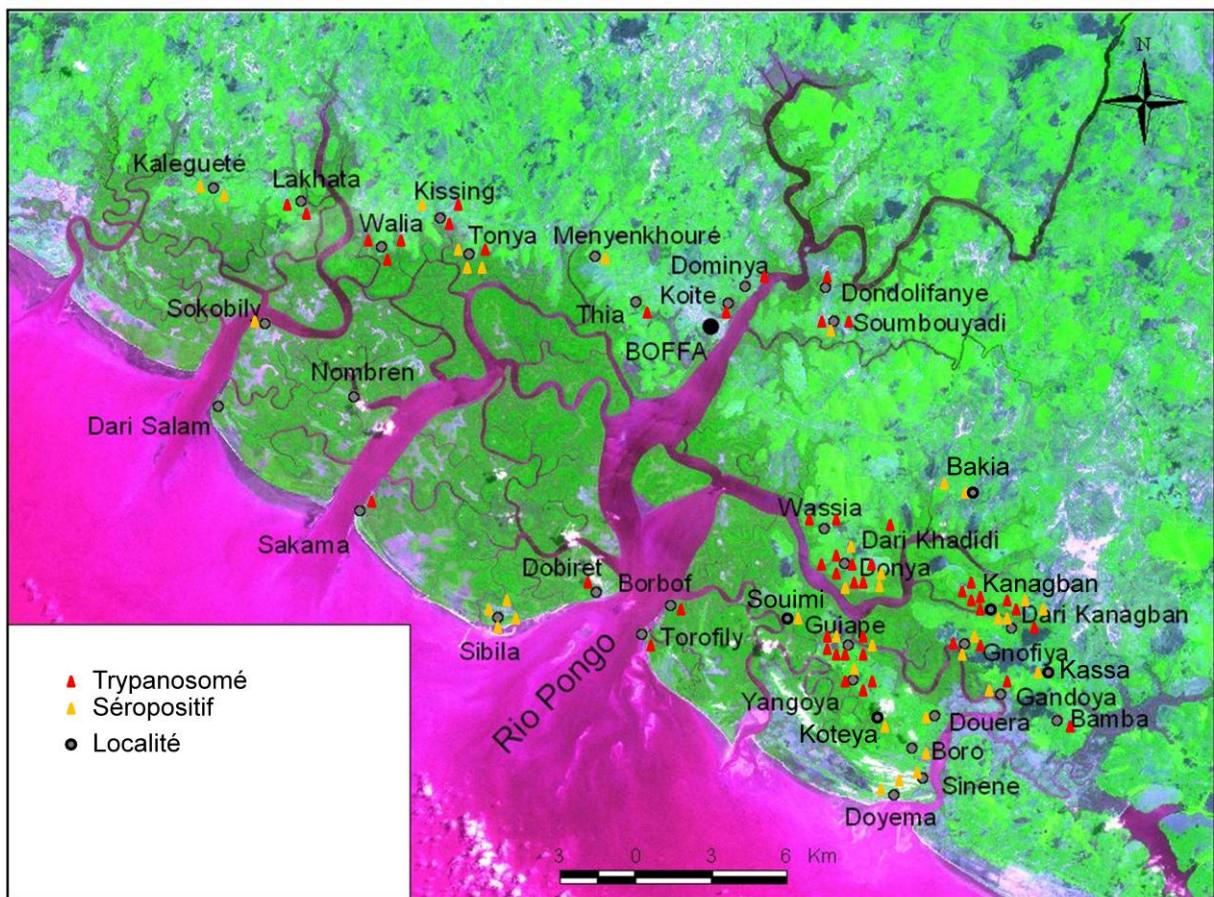
Période	Activité de Terrain	Trypanosomés	SERO	Village visité
Mai 2008	Prospection médicale	10	9	11
Fev 2009	suivi	4	2	-
Mai 2010	Prospection médicale	30	28	65
Mai 2011	Prospection médicale + suivi	12	7	27
	Total	56	46	103
	Prévalence	0,55%	0,45%	



a) Carte de répartition des trypanosomés et des SERO dans le foyer de Forécariah



b) Carte de répartition des trypanosomés et des SERO dans le foyer de Dubréka



c) Carte de répartition des trypanosomés et des SERO dans le foyer de Boffa

Figure 15 : Cartes de répartition des trypanosomés et des SERO dans les zones d'études.

Chapitre 2 : Activités de laboratoire

2.1. Méthodologie pour la définition des phénotypes de l'étude

Dans le cadre de notre thèse, nous avons effectué en laboratoire des tests supplémentaires sur tous les individus échantillonnés. Ces tests étaient la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Penchenier *et al.*, 1996; Penchenier *et al.*, 2000; Solano *et al.*, 2002; Koffi *et al.*, 2006) et la Trypanolyse (Van Meirvenne *et al.*, 1995; Jamonneau *et al.*, 2010). Les résultats de la Trypanolyse et de la PCR, associés aux suivis de cohortes, m'ont permis de caractériser de façon précise la diversité de réponses à l'infection et de caractériser l'évolution du statut SERO dans le temps. Les résultats de cette étude menée dans le foyer de Forécariah sont présentés dans la 3^{ème} partie et font l'objet d'un article joint en annexe (voir annexe 3).

2.1.1. PCR diagnostique TBR1/TBR2

L'extraction d'ADN s'est faite à partir des échantillons de sang prélevés sur le terrain en utilisant le kit commercial DNeasy® telle que décrite dans Koffi *et al.* (2006). La PCR a été réalisée selon la méthode décrite par Penchenier *et al.*, (1996 ; 2000). Les amores utilisées, TBR1/TBR2 amplifient une séquence d'ADN satellite de 177 paires de bases répétées de nombreuses fois dans le génome nucléaire sur les mini-chromosomes (Moser *et al.*, 1989). Cependant les amores TBR1/TBR2 ne sont pas spécifiques de *T. b. gambiense* mais du sous genre *Trypanozoon*. Leur séquence est : 5'-GAATATTAAACAATGCGCAG-3' pour TBR 1 et 5'-CCATTATTAGCTTGTC-3' pour TBR 2.



Photo 7 : Révélation d'une PCR sur gel d'agarose (source : IRD/CIRDES).

1 à 9 correspondent à des échantillons de trypanosomés positifs en PCR (présence de la bande à 177 paires de base). 10 et 11 sont respectivement des témoins négatifs d'extraction et de PCR attestant qu'il n'y a pas eu de contamination pendant l'extraction et lors de la préparation du MIX PCR. PM = poids moléculaire, T+ = témoin positif.

2.1.2. Trypanolyse

La Trypanolyse (TL) est un test basé sur la détection d'anticorps spécifiques d'antigènes variables de surface de *T. b. gambiense*. Par rapport au CATT et à la PCR connus pour croiser avec d'autres espèces de trypanosomes animaux (Truc *et al.*, 2002; Koffi *et al.*, 2006), la Trypanolyse est un test beaucoup plus sensible et spécifique de *T. b. gambiense* (Van Meirvenne *et al.*, 1995). Le test de Trypanolyse est une technique qui utilise des trypanosomes vivants exprimant 3 types de variants antigéniques, les plus fréquemment exprimés sont le LiTat 1.3, LiTat 1.5, et le LiTat 1.6. Comme contrôle de Trypanolyse non-spécifique dans le plasma testé, on utilise une souche de sérum résistant de *T. b. rhodesiense* ETAT 1.2R. Pour la réalisation du test, 25 µl du sérum à tester sont mélangés avec 25 µl du sérum de cobaye (source de complément). On ajoute 50 µl de suspension de trypanosomes vivants (10^7 trypanosomes/ml) exprimant ces variants antigéniques connus. Après 90 mn d'incubation, la suspension est observée au microscope (10x 25). Le principe est basé sur la capacité du complément à se fixer sur le complexe antigène-anticorps et provoquer la lyse cellulaire par clivage successif de ces composants. Le test est dit positif lorsque l'on a un pourcentage de lyse de plus de 50% pour au moins un des trois variants. Dans une étude à laquelle j'ai participé (Jamonneau *et al.*, 2010) nous avons montré que la Trypanolyse est un marqueur de transmission active de la THA. En effet le pourcentage des SERO positifs à la Trypanolyse (SERO TL⁺) était corrélé avec la prévalence de la THA (**figure 16**). Il était élevé dans les foyers actifs de THA (Dubreka et Boffa) où 15/17 (88, 2 %) des SERO étaient TL⁺, et faibles dans les zones à faibles prévalences (18/30, 60% et 7/24 29,2% respectivement à Forécariah et à Bonon). Tous les SERO identifiés dans les zones où la THA est absente étaient négatifs au test de la Trypanolyse. La Trypanolyse représente un outil (i) au niveau individuel, pour identifier parmi les sujets CATT positifs non parasitologiquement confirmé, ceux qui ont réellement été en contact avec *T. b. gambiense* et devraient être suivis, (ii) au niveau de la population pour identifier les zones prioritaires d'intervention, et (iii) dans un contexte d'élimination, pour identifier les zones exemptes de THA et qui ne nécessitent plus de surveillance active. La Trypanolyse est maintenant adoptée par les PNLTHA d'Afrique de l'Ouest (Togo, Bénin, Burkina, Sierra Léone, Côte d'Ivoire et Guinée). Des échantillons de sang sont collectés sur papier filtre lors des activités de prospections médicales et acheminés au CIRDES où le test de Trypanolyse est réalisé. En cas de positivité au test, le PNLTHA suit la personne et effectue un dépistage actif dans son entourage immédiat (famille, village).

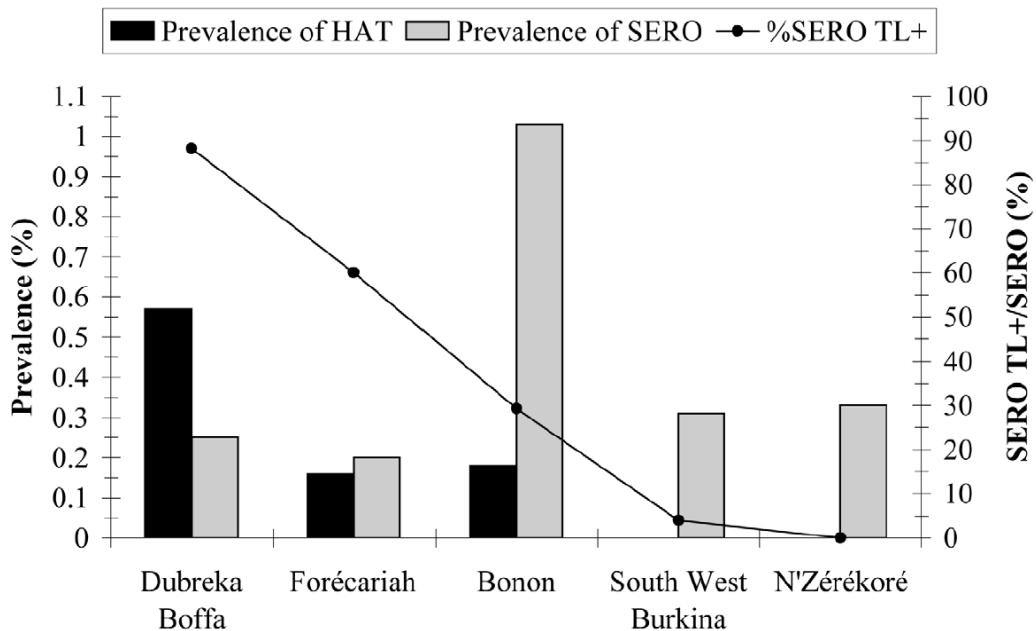


Figure 16 : La Trypanolyse est un marqueur de la transmission active de la Trypanosomose Humaine Africaine.

Le Sud-ouest du Burkina= Folonzo, Loropéni et Batié. L'axe y à gauche représente la prévalence de la THA et des SERO. L'axe y à droite représente le pourcentage d'individus SERO qui sont positifs au test de la Trypanolyse.

2.2. Méthodologie pour le dosage des cytokines

2.2.1. Dosage des cytokines par Cytométrie en flux : utilisation de la technique Cytometric Bead Array (CBA)

2.2.1.1. Principe

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise des particules isolées (molécules, cellules, bactéries...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Un cytomètre en flux (FACS) est constitué d'une composante fluidique, d'une composante optique, et d'une composante électronique qui sont gérées au moyen d'une interface informatique (**figure 17**). Le système fluidique permet d'entrainer la suspension cellulaire à l'intérieur de la chambre d'analyse, dans laquelle les particules traversent une à une le faisceau laser. La chambre d'analyse comprend :

- Une source lumineuse excitatrice : un laser (à ions argon ou hélium-néon) qui produit une lumière monochromatique (488 ou 633nm, respectivement) unidirectionnelle et stable.
- Un ensemble de miroirs dichroïques qui permettent d'analyser les rayonnements émis par les cellules.

Après excitation des particules par le laser, les signaux émis sont séparés par des fibres optiques et sont collectés par des photo-multiplicateurs (PMT) (**figure 17**). Ainsi, la lumière diffractée mesurée en face du rayon laser (angle $<10^\circ$) permet d'évaluer la taille de ces particules (Forward Scatter Height, FSC). La lumière diffractée mesurée à 90° (Size Scatter Height, SSC) donne une mesure de la granulosité et de la complexité de la particule. Cet ensemble de capteur spécifique permet ensuite la mesure de la fluorescence naturelle (auto-fluorescence) ou induite (utilisation de fluorochromes). Les fluorochromes ont la capacité d'absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée puis la remettre à une longueur d'onde différente après excitation. Le nombre de détecteurs permettant d'analyser les différentes plages de longueur d'ondes, peuvent varier selon le cytomètre. Généralement, un cytomètre possède 4 lentilles permettant de recueillir 4 plages de longueurs d'ondes différentes : le vert de 500 à 550 nm (détecteur FL1), le jaune de 550 à 600 (détecteur FL2), l'orange et le rouge de 560 à 670 nm (détecteur FL3), et le rouge uniquement de 640 à 700 (détecteur FL4) (**figure 17**). L'ensemble de ces signaux est ensuite amplifié, numérisé, traité et stocké par un ordinateur. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations cellulaires, permettant d'évaluer leurs propriétés.

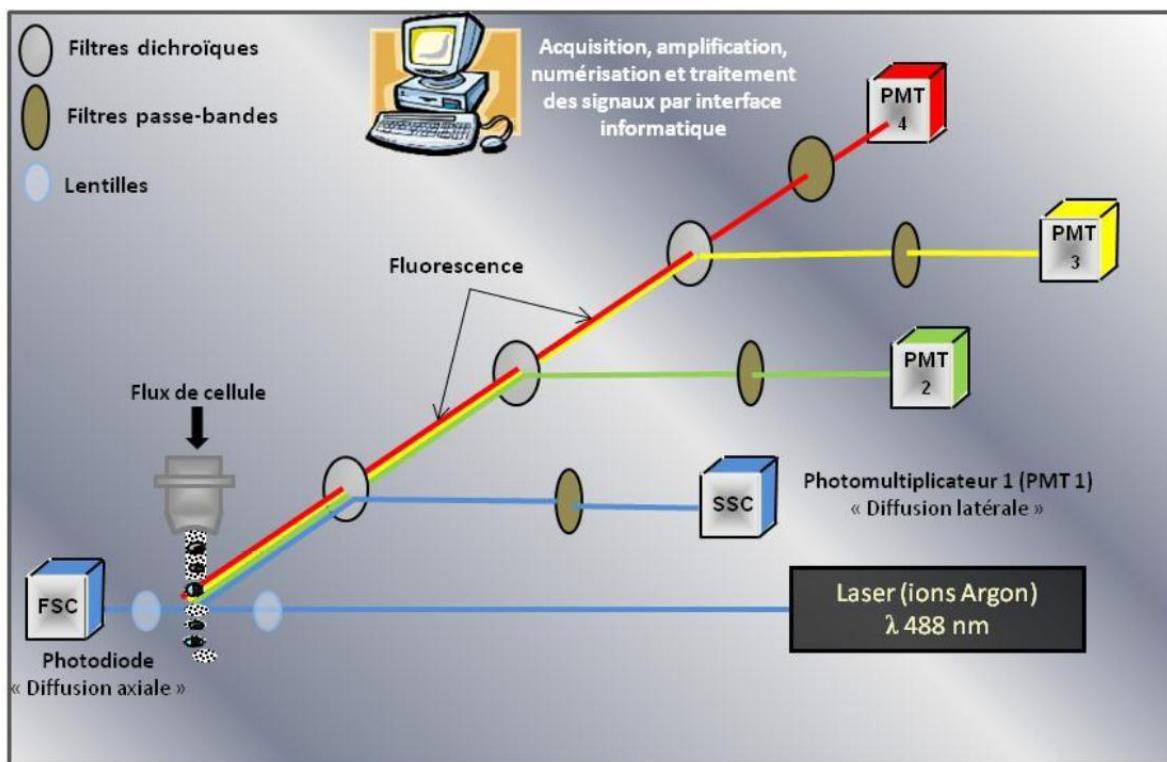


Figure 17 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux

L'une des applications de la cytométrie en flux est le CBA, développé par la société BD Biosciences, qui grâce à des cytomètres équipés d'une source d'excitation lumineuse émettant à 488 nm permet de doser simultanément six cytokines définies dans un faible volume d'échantillons (25-50 μl). Cette technique utilise six types de microbilles de tailles homogènes qui sont distinguées en fonction de leurs différences d'intensités de fluorescence rouge et qui portent chacune des anticorps de capture dirigés contre les 6 cytokines. Après incubation avec l'échantillon, les cytokines présentes, qui se sont fixées à l'anticorps de capture, sont détectées avec des anticorps différents de révélation, dirigés contre les 6 cytokines et couplés à de la phycoérythrine (PE) (figure 18). Les concentrations de cytokines dans les échantillons sont quantifiées grâce à un standard constitué des cytokines humaines recombinantes étudiées et d'équations faisant la relation entre les fluorescences mesurées et les concentrations en cytokines.

En utilisant cette technique nous avons dosé dans le plasma 10 cytokines (IL-6, IL-8, IL-4, IL-2, IL-5, IL-1 β , IL-12, IL-10, TNF- α et IFN- γ) en utilisant le BDTM CBA Human Th1/Th2 kit et le BDTM CBA Human Inflammation kit. Pour le LCR, nous avons utilisé uniquement le BDTM CBA Human Inflammation pour doser 6 cytokines (IL-8, IL-1 β , IL-6,

IL-10, IL-12 et TNF- α). Le principe du dosage et le mode opératoire sont les mêmes pour les deux kits.

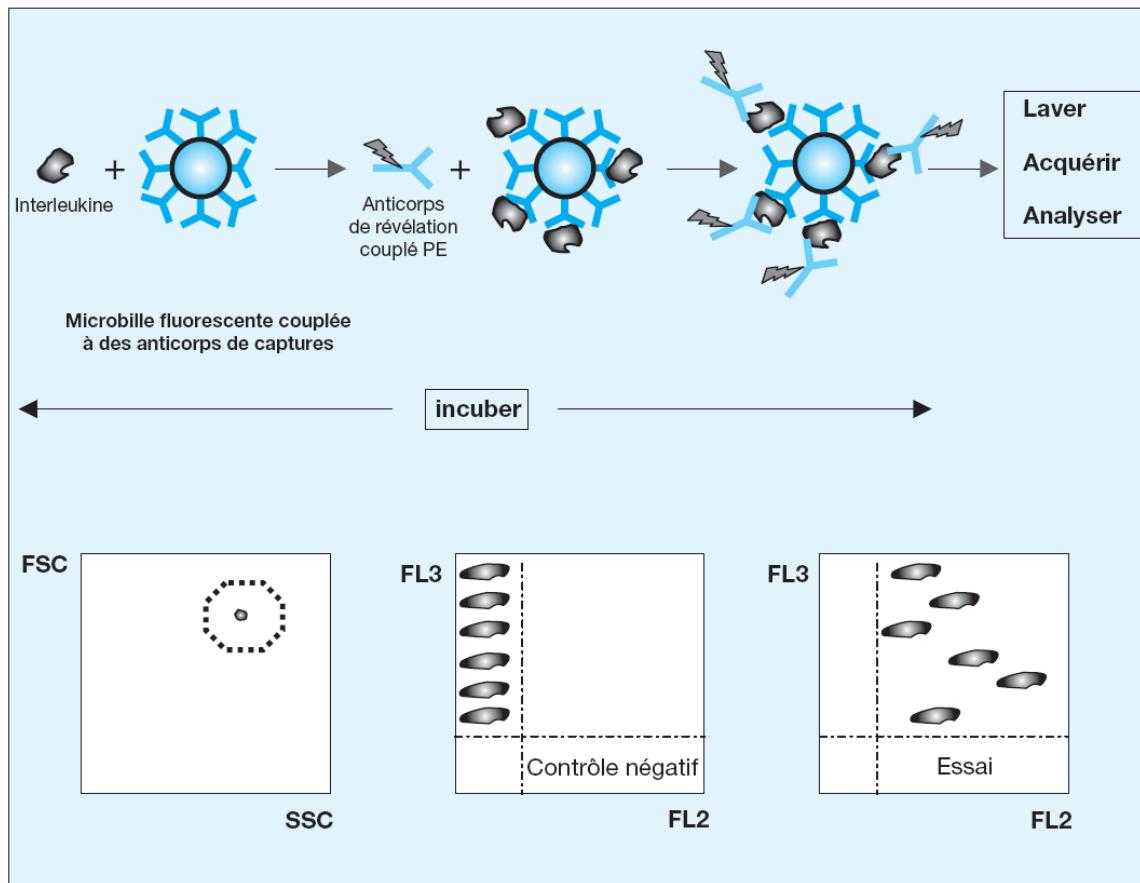


Figure 18 : Analyse multiplexée d'interleukines par cytométrie en flux (Lizard *et al.*, 2004).

Exemple du système CBA. Les microbilles homogènes en taille (forward scatter : FSC) et en diffraction à 90° (side scatter : SSC) se distinguent en fonction de leur fluorescence rouge (FL3). Dans le contrôle négatif, les six populations de microbilles identifiées selon FL3, ne génèrent aucune fluorescence en FL2. Dans l'essai en fonction de la quantité d'interleukines présentes, la fluorescence des microbilles en FL2 est plus ou moins importante.

2.2.1.2. Mode opératoire du CBA

Chaque BDTM CBA kit contient des billes de capture spécifiques (une fiole de billes par cytokine), un réactif de détection (mélange d'anticorps spécifiques pour chaque cytokine et couplé à la PE), un tampon d'essai (assay diluent), un tampon de lavage (Wash Buffer), un tampon de saturation des billes pour les expériences sur le plasma ou sérum (Serum Enhancement Buffer), des réactifs de réglage pour le FACS (Instrument Setup Beads) et un mélange défini de cytokines standards. Le mode opératoire est décrit ci-dessous.

Après avoir vortexé et mélangé 10µl/essai de chaque fiole de billes de capture des cytokines, le mélange de billes est centrifugé à 200g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite soigneusement aspiré et éliminé. Le mélange de billes de capture est remis en suspension dans du tampon de saturation (volume égal à la quantité retirée de surnageant), vortexé, puis mis à incuber pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Des tubes sont préparés et annotés pour chaque dilution du standard, le contrôle négatif et les échantillons à analyser. 50 µl de mélange de billes et 50 µl de réactif de détection PE sont ensuite distribués dans ces tubes. Après reconstitution et dilution en série de 2 en 2 des standards, 50µl de chaque dilution de standard sont mis dans les tubes annotés correspondant. Dans le tube « contrôle négatif » est ajouté 50µl de tampon d'essai. Dans les tubes réservés pour les échantillons, 50µl de chaque échantillon (plasma ou LCR) sont ajoutés. Tous les tubes sont ensuite agités doucement et incubés à l'obscurité pendant 3 heures à température ambiante. Après l'incubation, 1ml de tampon de lavage (Wash Buffer) est ajouté dans chaque tube et on centrifuge le tout à 200g pendant 5 minutes. Après centrifugation, le surnageant est éliminé délicatement par aspiration et on ajoute de nouveaux 300µl de tampon de lavage (Wash buffer) dans chaque tube pour resuspendre le culot de billes. Les tubes sont conservés à l'obscurité jusqu'au moment de l'analyse qui doit être réalisée le jour même de l'expérience. L'analyse des tubes et l'acquisition de données ont été réalisées en utilisant un FACSCanto (cytomètre en flux) équipé du logiciel BD FACSDiva et d'un laser 488 nm capable de détecter et distinguer des émissions de fluorescence à 576 et 670. Puis, les données enregistrées lors de l'acquisition sur le FACS ont été analysées avec le logiciel BD FCAP pour la détermination de la concentration de chaque cytokine.

2.3. Méthodologie pour la quantification de l'expression du gène *APOL1*

2.3.1. Extraction d'ARN

Pour chaque individu inclu, un prélèvement sanguin a été effectué directement dans des tubes PAXgene Blood RNA lors des prospections médicales. Les ARNs totaux ont été ensuite extraits à l'aide des kits PAXgene Blood RNA (PreAnalytix) selon le protocole du kit PAXgene.

2.3.2. Vérification de la quantité et de la qualité des ARNs extraits

Les ARNs totaux extraits ont été quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm en utilisant le Nanodrop ND-1000 (**Photo 8**).



Photo 8 : Nanodrop ND 1000 (source IRD/CIRDES).

Afin de vérifier la qualité des ARNs extraits, nous avons procédé à une migration sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'Ethidium. Les deux bandes ARNs ribosomaux (18S et 28S) doivent être présentes (**photo 9**). Si les ARNs migrent sous la forme d'une trainée (smear) et que les deux bandes ne sont pas visibles, l'échantillon d'ARN a sans doute subi une dégradation majeure.

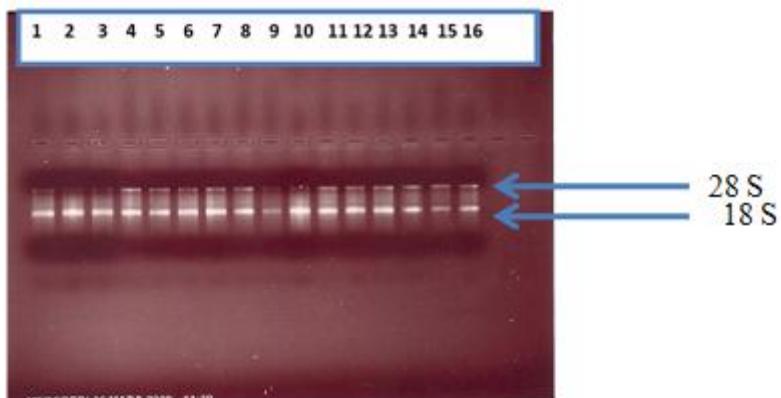


Photo 9 : Migration des ARNs extraits sur gel d'agarose (1%) (source IRD/CIRDES).

De 1 à 16 sont des ARNs extraits à partir du sang. La présence des deux bandes d'ARNs ribosomaux, 18S et 28S est synonyme que nos ARNs n'ont pas subi de dégradation.

2.3.3. Rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaires (ADNc)

La réaction de rétrotranscription de l'ARN est basée sur le fait qu'une enzyme la Reverse Transcriptase, est capable de recopier un brin d'ARN messager (ARNm) matriciel en un brin d'ADNc. Des amores de séquences aléatoires sont utilisées pour l'amorçage de la réaction. Il s'agit d'oligonucléotides correspondant à l'enchaînement de toutes les combinaisons possibles des 4 bases : Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine. Ces amores se

fixent au hasard sur les ARNm et la Reverse Transcriptase les utilise pour la synthèse de l'ADNc. A sa température optimale d'activité (en général à 37 ou 42°C), l'enzyme rallonge les amorces dans le sens 5'- 3' en y incorporant les désoxyribonucléotide triPhosphates (dNTPs) présents dans le milieu réactionnel selon la loi de complémentarité des bases.

Nous avons réalisé la synthèse des ADNc en utilisant le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription » selon le protocole décrit dans le kit. L'enzyme utilisée a été le MultiScribeTM reverse Transcriptase. A la fin de la synthèse, les ADNc ont été dilués pour obtenir une concentration finale de 10ng/μl nécessaire pour la PCR quantitative en temps réel. Les ADNc ont été conservé à -20°C.

2.3.4. Real Time Quantitative-PCR (RTQ-PCR)

La RTQ-PCR permet de mesurer en temps réel l'amplification d'une séquence d'ADNc connue, dont la détection est réalisée à l'aide d'un fluorochrome. Nous avons utilisé comme fluorochrome le Syber Green I. Agent intercalant très stable, le Syber Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin, condition indispensable à sa fluorescence (**figure 19**). Lorsqu'il est excité dans ces conditions par un rayonnement lumineux possédant une longueur d'onde d'environ 470-490 nm, il peut alors émettre un signal fluorescent spécifique à une longueur d'onde d'environ 510-530 nm. La mesure de l'intensité du signal émis par le Syber Green I à la fin de chaque étape d'elongation permet ainsi le suivi cycle par cycle de la réaction de PCR. La RTQ-PCR utilisant le Syber Green I est simple, très sensible mais de spécificité essentiellement conditionnée par le choix des amorces. Le syber Green I marque toutes les molécules d'ADN double brin, qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt. De ce fait, tous les produits de PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorces éventuellement formés vont également engendrer un signal de fluorescence. Ce défaut de spécificité constitue la limite majeure des systèmes de détection utilisant un agent intercalant.

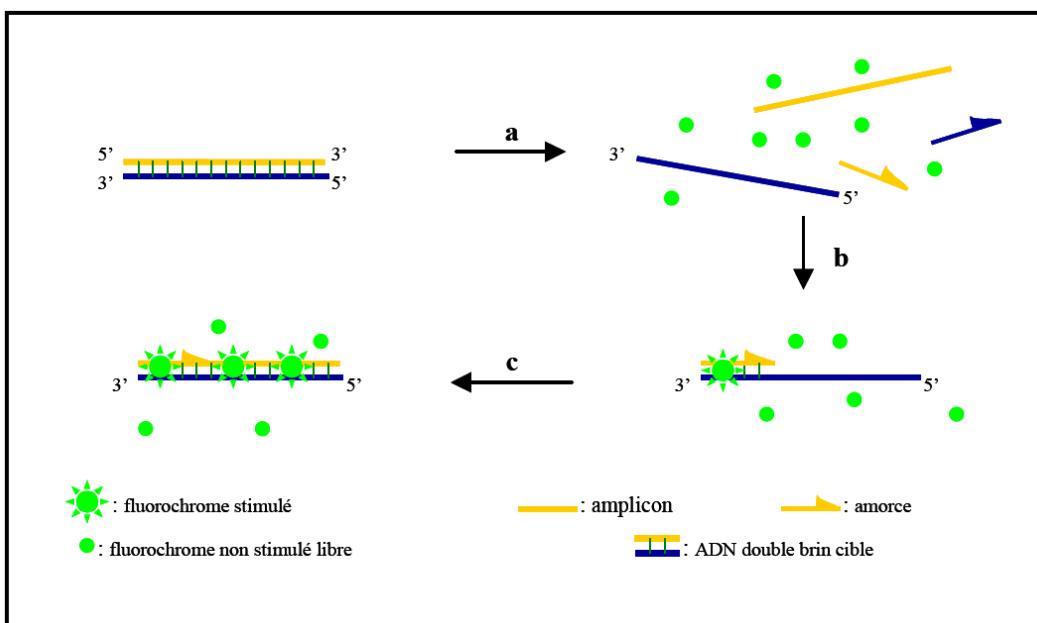


Figure 19 : Présentation des différentes étapes d'une réaction de RTQ-PCR utilisant le Syber Green I comme système de détection des amplicons (Poitras et Houde, 2002)

(a) Durant la dénaturation, le Syber Green I exhibe peu de fluorescence. (b) A la température d'appariement quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

2.3.4.1. Principe de la RTQ-PCR

Le principe de quantification est basé sur la cinétique d'apparition du signal fluorescent. L'intensité du signal fluorescent mesurée, qui augmente au cours de chaque cycle d'amplification, est ainsi directement proportionnelle à la quantité d'amplicons présents dans le milieu. Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe d'amplification, de caractériser les différentes phases de la cinétique de PCR et de mesurer la quantité d'amplicons générés en un point donné de la réaction (**figure 20**). Au cours des premiers cycles de la réaction de la RTQ-PCR, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base (« baseline ») de la courbe d'amplification. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des amplicons entraîne une variation mesurable de l'intensité de la fluorescence émise. Le point de départ de la phase exponentielle d'amplification, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelé Cycle seuil optique. Plus précisément, il représente le nombre de cycles de PCR nécessaire avant que l'intensité de la fluorescence émise par le reporter ne dépasse une valeur seuil (ou seuil de détection optique) significativement différente du bruit de fond

(« background »). Selon l'algorithme utilisé pour son calcul, le cycle seuil optique est symbolisé par les lettres Ct (« threshold cycle) ou Cp (« crossinf point »). C'est un point remarquable de la cinétique d'amplification car c'est celui qui permet de calculer le nombre de molécules d'acide nucléique cible initialement présentes dans le milieu réactionnel avant l'amplification.

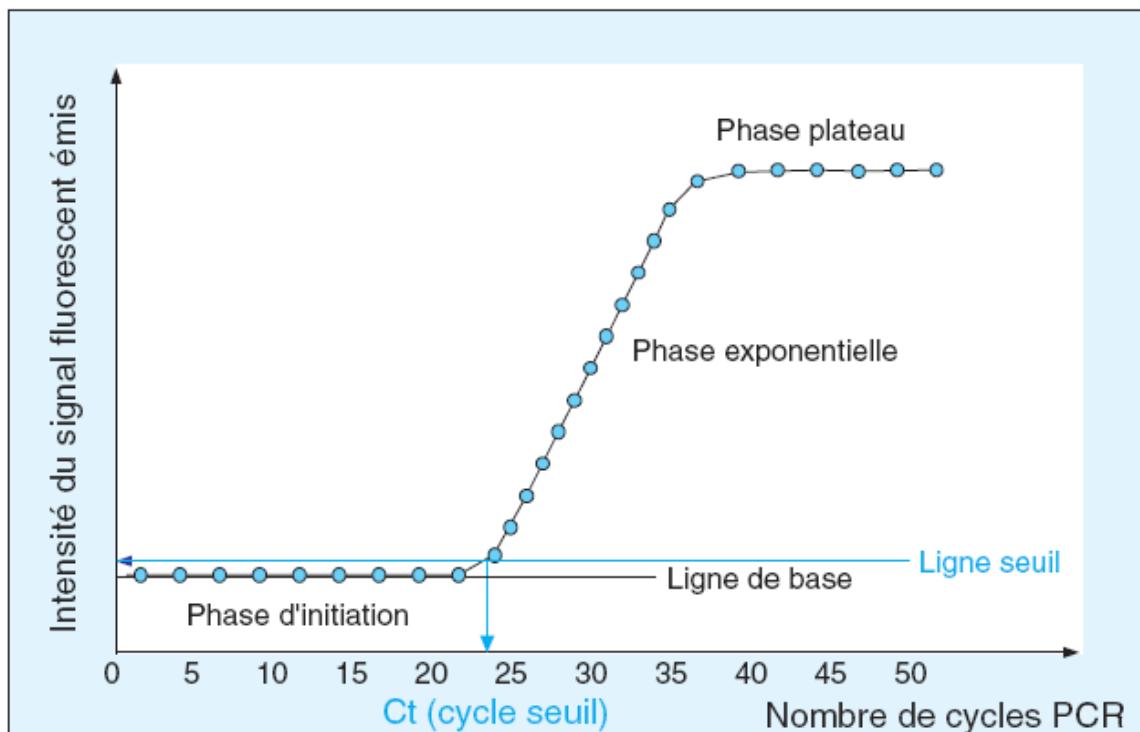


Figure 20 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (Tse et Capeau, 2003)

La cinétique de la réaction PCR met en jeu trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau. Elle est construite à partir de plusieurs points d'amplification. Un point d'amplification est un point présentant pour coordonnées le nombre de cycles PCR versus l'intensité de fluorescence émise. La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil correspond au seuil de détection optique au delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil Ct qui est le point de départ de la phase exponentielle et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon.

2.3.4.2. Choix du contrôle endogène (gène ubiquitaire) et design des amorces

➤ ***Choix du gène ubiquitaire***

Le choix de gène ubiquitaire est une étape cruciale lorsque l'on souhaite quantifier l'expression d'un gène par RTQ-PCR. Le gène ubiquitaire doit satisfaire aux conditions suivantes :

- (i) Etre un gène endogène existant à l'état d'une seule copie et d'expression constante,
- (ii) Etre amplifié par PCR avec une efficacité similaire de celle du gène cible, quelle que soit la nature de l'échantillon étudié.

Nous avons choisi la G3PDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase) comme gène ubiquitaire car la G3PDH est le gène ubiquitaire le plus largement utilisé comme normalisateur.

➤ ***Design des amorces***

Une condition primordiale de la fiabilité des résultats en PCR quantitative est l'utilisation d'un couple d'amorces présentant une efficacité proche de 100%. Un tel couple d'amorces est un couple dont le comportement permet une amplification strictement exponentielle de la séquence cible, au moins pendant les premières phases de la PCR. Les critères retenus pour le choix de nos amorces ont été :

- (i) La probabilité de formation de structures secondaires et de dimères a été évitée afin de limiter la perte de rendement de la PCR due au repliement et ou à la dimérisation des amorces, particulièrement entre les extrémités 3'.
- (ii) Les couples retenus doivent générer un ampliat unique qui est notre séquence cible.

Nous avons utilisé la banque du National Center for Biological Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pour la recherche de la séquence du mRNA de l'APOL1 et de la G3PDH. Les amorces ont été dérivées à cheval entre deux exons afin d'éviter que des contaminations par l'ADN génomique n'interfèrent. Une PCR classique a été réalisée afin de s'assurer de la spécificité de nos couples d'amorces et la concentration optimale de chaque amorce a ensuite été déterminée en utilisant différentes concentrations (de 150 à 900 nM,

Tableau II). Les concentrations des couples d'amorces retenues sont celles qui donnent le plus faible Ct. Ainsi, les concentrations retenues sont : GAPDH, amorce sens = 900 nM GAPDH, amorce anti-sens = 900 nM (**figure 21**), APOL1, amorce sens = 600 nM, APOL1, amorce anti-sens = 600 nM (**figure 22**).

Tableau II : Concentrations utilisées pour la détermination des concentrations optimales de nos amorces.

Amorces couples \	Amorces	Sens (nM)	Anti-sens (nM)
1		150	150
2		150	300
3		150	600
4		150	900
5		300	150
6		300	300
7		300	600
8		300	900
9		600	150
10		600	300
11		600	600
12		600	900
13		900	150
14		900	300
15		900	600
16		900	900

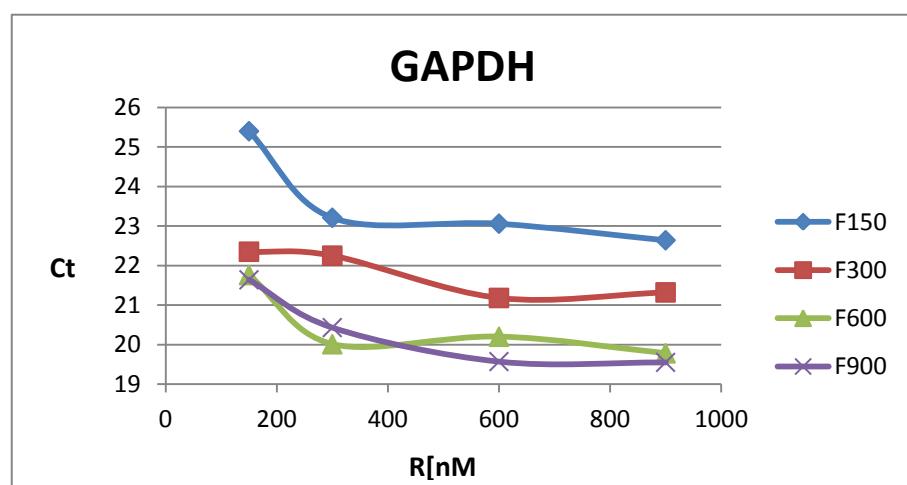


Figure 21 : Concentration des amorces (sens et anti-sens) du GAPDH en fonction du ct.

Les concentrations donnant les plus faibles Ct sont : GAPDH sens= 900nM et GAPDH anti-sens= 900nM

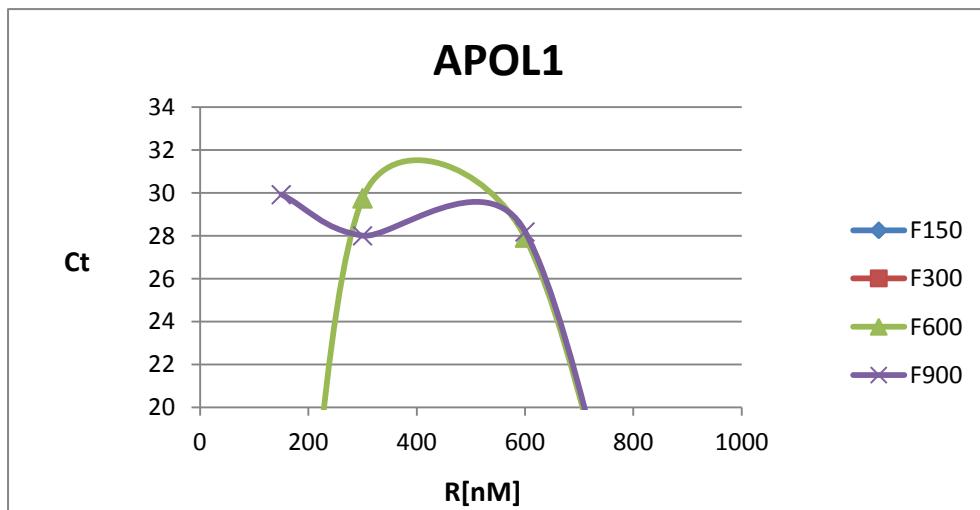


Figure 22 : Concentration des amorces (sens et anti-sens) d'APOL1 en fonction du ct

Les concentrations donnant les plus faibles Ct sont : APOL1 sens= 600nM et G anti-sens= 600nM

2.3.4.3. Détermination de l'efficacité des réactions d'amplifications

La quantité d'amplicons synthétisée dépend d'un facteur primordial qui est l'efficacité d'amplification (E) définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cibles se dupliquant à chaque cycle d'amplification. L'efficacité d'amplification est comprise entre 0 (aucune amplification ne s'est produite) et 100% (après chaque cycle de PCR, chaque molécule d'ADN a généré 2 amplicons). L'introduction de ce facteur essentiel qui est l'efficacité d'amplification, dans le calcul du nombre d'amplicons générés après n cycles de PCR conduit à l'équation suivante : $N = N_0(1 + E)^n$, ou convertie sous forme logarithmique : $\log N = \log N_0 + n \log(1 + E)$.

La représentation graphique des variations du logarithme du nombre N molécules amplifiées $\log N$ en fonction du nombre de cycles d'amplification (n) est une droite (courbe standard) dont la pente k est $\log(1 + E)$ et l'ordonnée à l'origine le nombre initial de molécules(N_0). Il est alors possible de calculer E selon la formule $E = [10^{(\frac{1}{pente})}] - 1$. Cette efficacité doit être comprise entre 85 et 110% pour une quantification fiable.

Pour la détermination de l'efficacité de nos gènes (APOL1 et G3PDH), nous avons donc réalisé pour chaque gène, des amplifications en utilisant comme matrice une série de dilutions de nos ADNc (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc....). L'efficacité est alors déterminée en calculant la pente de la droite reliant chacun des points de la dilution. L'efficacité d'APOL1 et du

GAPDH ont été calculés avec le logiciel Mxpro Mx 3005p (stragen). Elle a été de 86% pour APOL1 et 93% pour le GAPDH (**Tableau III**).

Tableau III : Amorces utilisées pour la RTQ-PCR

Gènes	Amorces 5' 3'	Taille des fragments*	TM°C	Efficacité %
APOL1	S : CTGCATCTGGATGAGTGC A-s : AGATACTGCTCTGGGTCC	164	58	86
G3PDH	S : AGATCATCAGCAATGCCTC A-s : GACTGTGGTCATGAGTCCTTC	101	58	93

* Taille en paires de bases (pb). S = sens, A-s = Anti-sens, TM = température d'hybridation

2.3.4.4. Méthode de quantification

Nous avons choisi d'utiliser la méthode de quantification relative qui permet d'exprimer un taux relatif à un contrôle endogène et à un individu de référence appelé calibreur.

- Le contrôle endogène (Ec) correspond à un gène exprimé de façon constante dans les cellules qui a été la G3PDH dans notre étude.
- Le calibreur (Ca) est le gène d'un individu respectant les exigences d'efficacité de PCR qui permet d'exprimer les différences de taux comme un multiple du sien.

La différence est exprimée en $2^{-\Delta\Delta C_t}$ selon la formule suivante

$$\Delta C_t_{gène cible} = C_t_{gène cible} - C_t_{calibreur gène cible}$$

$$\Delta C_t_{gène endogène} = C_t_{gène endogène} - C_t_{calibreur gène endogène}$$

$$\frac{\Delta C_t_{gène cible}}{\Delta C_t_{gène endogène}} = \frac{(1+E)^{-\Delta C_t_{cible}}}{(1+E)^{-\Delta C_t_{endogène}}}$$

Chapitre 3 : Analyses statistiques

3.1. Analyse statistique pour les études épidémiologiques dans le foyer de Forécariah.

La prévalence de la THA et la séroprévalence dans les différents groupes d'âge ont été comparées au moyen du test de Chi2. Le test exact de Fisher a été utilisé pour les autres analyses telles que la distribution des signes cliniques, le taux de positivité de la PCR et l'évolution des titres CATT/pl au cours du temps entre les différents statuts. La valeur P = 0,05 a été retenue comme seuil de significativité.

3.2. Analyse statistique pour l'étude immunologique

La comparaison univariée des concentrations de cytokines entre les différents groupes de l'étude a été réalisée par le test non paramétrique de Wilcoxon/Kruskal-Wallis (somme des rangs). L'association des cytokines avec le statut (HAT versus SERO TL⁺) et le risque de développer la THA chez les SERO TL⁺ ont été déterminés par régression logistique multivariée. Les covariables incluses dans ces analyses ont été l'âge, le sexe et les cytokines. Pour chacune des analyses, les cytokines ont été recodées en deux classes de taille égale en utilisant la valeur médiane comme valeur seuil. Les covariables les plus significatives (p<0,1) ont été introduites une à une jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'amélioration significative de la vraisemblance du modèle. L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur des données de cytokines normalisées en utilisant un modèle linéaire. L'existence de cluster a été testé en utilisant le package mclust du logiciel R. Les valeurs p<0,05 ont été considérées comme significatives. Le logiciel JMP (5) a été utilisé pour les analyses univariées et pour la régression logistique. Le logiciel R a été d'une part utilisé pour la construction des box-plots et d'autre part pour l'ACP.

3.2. Analyse statistique pour la quantification de *APOL1*

Les niveaux moyens d'expression d'*APOL1* sont donnés en fold change \pm écartype. La méthode du 2^{-ΔΔCT} (Livak et Schmittgen, 2001) a été utilisée pour déterminer le taux d'expression relative du gène *APOL1* de chacun des individus par rapport à l'individu

présentant la plus faible expression (calibrateur). Les corrélations entre les niveaux d'expression d'*APOL1* et les autres variables (foyer, âge, sexe, densité parasitaire, statut THA) ont été analysées de façon univariée ou multivariée par régression linéaire (méthode des moindres carrés) avec le logiciel JMP 7.0. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Troisième partie : Résultats

I. Etude épidémiologique dans le foyer de Forécariah

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Microbes and Infection* (voir annexe 3).

I.1. Répartition géographique et prévalence de la THA dans la zone d'étude

Au total 12 867 personnes ont été vues lors de cette étude soit par les campagnes de dépistages actifs ou durant les activités de suivi des sujets de l'étude à leur domicile (**Tableau IV**). Selon le recensement de la population effectuée avant les prospections médicales, la proportion de la population vue variait entre 70 et 80% dans les 79 villages ou hameaux qui ont été visités lors de cette étude. Un total de 27 individus a été initialement confirmé trypanosomés. En plus, 31 SERO ont été identifiés. Parmi ces SERO, 4 ont été confirmés trypanosomés durant leur suivi (appelés SERO TL⁺/T⁺). Quatorze trypanosomés ont été diagnostiqués en deuxième phase avancée, 12 en phase deux précoce et 5 en phase 1. Considérant au total 31 trypanosomés dépistés durant l'étude (27 T⁺ + 4 SERO TL⁺/T⁺), la prévalence globale de la THA était de 2,4 pour 1000 habitants, indiquant un profil de faible endémicité de la THA dans le Foyer de Forécariah mais avec une prévalence pouvant atteindre 1% dans certains villages. La plupart des villages visités se situent dans la partie continentale de la zone de mangrove qui est considérée comme étant un lieu de contact important avec les mouches tsé-tsé. Toutefois, les trypanosomés et les SERO semblent se regrouper dans des zones géographiquement limitées (**figure 23-a**) et la prévalence (**figure 23-b**) de la maladie était 8,6 fois plus élevée (5,27 %) dans la population active (16-49 ans) par rapport au groupe d'âge 0-15 ans (0,61%, p<0,0001). La prévalence de la maladie était également supérieure dans le groupe d'âge 16-49 ans par rapport aux sujets âgés (≥ 50 ans) bien que la différence n'était pas significative. Une distribution similaire en fonction de l'âge a également été observée chez les SERO. Aucune différence significative n'a été observée entre les femmes et les hommes par rapport à la THA ou au statut SERO.

Tableau IV : Résultats des prospections médicales et des activités de suivi

Période	Activité de Terrain	Population Vue	T+	SERO	Village visité
Novembre 2007	Prospection médicale ¹	7 586	13	16	30
Mars 2008	Prospection médicale suivi ²	3 763	5	11	29
		104	1	3	-
Octobre 2008	Prospection médicale suivi	571	2	0	7
	SERO TL ⁺ /T ⁺ ³	294	3	1	-
			1		
Avril 2010	Prospection médicale suivi	357	3	0	13
	SERO TL ⁺ /T ⁺	192	0	0	-
			3		
Total		12 867	31	31	79

Le tableau indique le nombre de personnes testées au CATT, le nombre de malade (positifs en parasitologie), le nombre de sujets séropositifs (titre CATT/pl $\geq 1/8$ mais négatifs aux tests parasitologiques, appelé SERO) et le nombre de villages visités dans le foyer de Forécariah.

¹ Individus testés lors du dépistage classique de masse

² Individus absents lors des précédentes prospections médicales, mais testés au cours des activités de suivi

³ Sujets séropositifs qui ont développés la THA au cours de leur suivi.

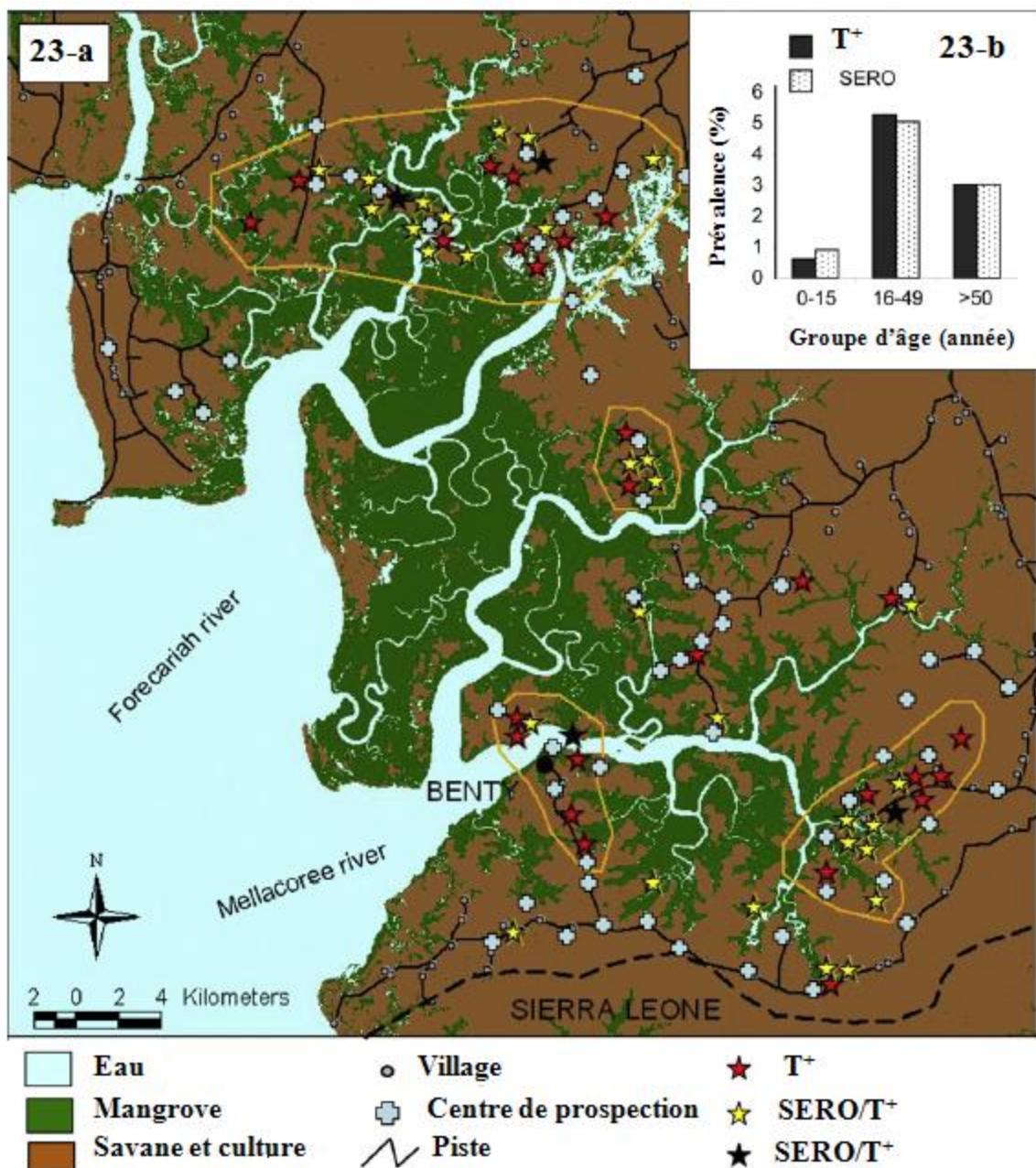


Figure 23 : Répartition géographique des trypanosomés et des SERO dans le foyer de Forécariah.

23-a : Carte de la zone d'étude indiquant le type de végétation, les centres de prospections, la répartition géographique des trypanosomés, des sujets séropositifs ($\text{CATT/pl} \geq 1/8$; SERO) et des SERO devenus trypanosomés au cours de leur suivi (SERO TL^+/T^+). Les clusters incluant trypanosomés et SERO sont indiqués par des cercles. **23-b** : Prévalence des trypanosomés et des séropositifs selon les différents groupes d'âge.

I.2. Caractéristiques diagnostiques dans le foyer de Forécariah

Une caractéristique frappante de la THA à Forécariah est que seulement 7 des 31 (22%) trypanosomés dépistés dans cette étude étaient positifs à la mAECT (**tableau V**) alors que l'ADN parasitaire a été détecté par PCR dans le sang de 84% d'entre eux. Au contraire, tous les trypanosomés sauf un avaient des ganglions cervicaux et les trypanosomes ont été mis en évidence par microscopie dans le suc ganglionnaire de 60, 83 et 93% des trypanosomés en phase 1, phase 2 précoce et phase 2 avancée respectivement. Une prédominance des trypanosomés affichant une atteinte neurologique du système nerveux central a été observée : 84% des trypanosomés ont été diagnostiqués en deuxième phase et les trypanosomes ont été mis en évidence dans le LCR par microscopie dans 2 (17%) et 9 (64%) des trypanosomés en phase 2 précoce et en phase 2 avancée respectivement. La PCR effectuée sur le LCR était positive dans 1 (20%), 8 (66%) et 13 (93%) des patients en phase 1, phase 2 précoce et phase 2 avancée respectivement. La moitié des sujets (31/62) avaient des titres CATT $\geq 1/8$ mais aucun trypanosome n'a été détecté par microscopie lors de leur diagnostic initial. Parmi ces 31 SERO, 12 étaient négatifs au test de la Trypanolyse. Cependant, comme les 31 trypanosomés, les 19 SERO restants ont été positifs au test de la Trypanolyse indiquant un contact avec *T. b. gambiense*.

L'analyse des signes cliniques chez les trypanosomés, les SERO positifs ou négatifs au test de la Trypanolyse et les contrôles CATT négatifs sont présentées dans la **figure 24**. Tous les symptômes enregistrés à l'exception de la fièvre étaient significativement plus souvent rapportés chez les trypanosomés par rapport aux contrôles. Cela a été particulièrement vrai pour les troubles neurologiques en relation avec le fait que la majorité des trypanosomés étaient en deuxième phase. Fièvre, maux de tête récurrents et dans une moindre mesure l'asthénie n'apparaissent pas comme de bons marqueurs de la THA dans ce foyer car la plupart des contrôles se plaignent de ces symptômes non spécifiques. Aucune différence significative n'a été observée entre les contrôles et les SERO par rapport aux signes cliniques enregistrés, à l'exception de la présence d'adénopathies cervicales qui étaient plus élevées chez les SERO TL⁺ (42,1%) par rapport aux contrôles (5,1%, p= 0,001).

Tableau V : Spécificités du diagnostic à Forécariah.

Phase	N	A l'inclusion						Après traitement		
		Trypanosome détecté dans		PCR positive dans		Cytorachie [intervalle]	N	Trypanosomes dans le LCR	Cytorachie [intervalle]	
		Ganglion lymphatique	Ganglion lymphatique	Sang	LCR					
I	5	4 (80%)	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	3.6 [2-5]	3	0 (0%)
II-précoce	12	12 (100%)	10 (83%)	3 (25%)	2 (17%)	11 (92%)	8 (66%)	10 [0-20]	9	0 (0%)
II-avancée	14	14 (100%)	13 (93%)	2 (14%)	9 (64%)	11 (79%)	13 (93%)	115.7 [21-371]	13	0 (0%)
Total	31	30 (97%)	26 (84%)	7 (22%)	11 (35%)	26 (84%)	22 (71%)		25	0 (0%)

Le tableau indique le nombre et le pourcentage des trypanosomés présentant des ganglions lymphatiques ainsi que les résultats des tests parasitologiques réalisés (au moment du diagnostic ou lors du suivi après traitement) par examen direct du suc ganglionnaire, du sang (mAECT^a) et du LCR. Les résultats de la PCR TBR1/TBR2 réalisée sur l'ADN extrait du sang ou du LCR sont également indiqués ainsi que la moyenne de la cytorachie. Ces résultats sont donnés pour les patients dans les différentes phases de la maladie : I= malade en phase 1 (cytorachie \leq 5 cellules dans le LCR), II-précoce = phase 2 précoce (cytorachie comprise entre 6 et 20 cellules dans le LCR et/ou présence de trypanosome dans le LCR). II avancé = phase 2 avancée (cytorachie >20 cellules dans le LCR). Les résultats après traitement sont donnés pour le dernier contrôle effectué sur le LCR (entre 7 et 26 mois après traitement en fonction des individus).

^a miniature Anion Exchange Centrifugation Technique, ^b Liquide Céphalo-Rachidien, ^c La cytorachie de la phase 2 précoce est comprise entre 0 et 20 parce qu'un malade avait des trypanosomes dans le LCR mais une cytorachie = 0. Il a été considéré comme un malade en phase 2 précoce et a été traité par conséquent.

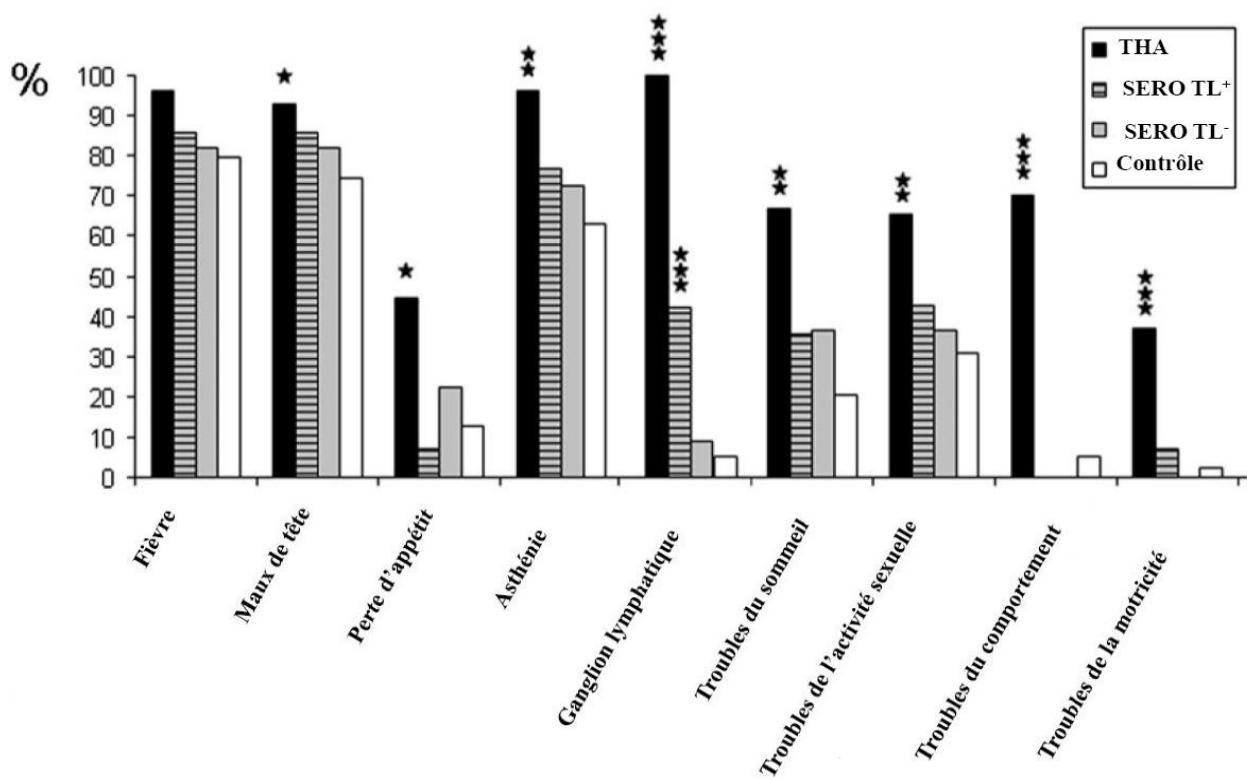


Figure 24 : Distribution des signes cliniques en fonction du statut de la THA.

L'histogramme représente la prévalence des différents signes cliniques enregistrés en fonction des statuts : trypanosomés (n=27), SERO TL⁺ (n=19), SERO TL⁻ (n=12) et contrôles (n=39). Les différences significatives par rapport au contrôle sont indiquées par une étoile (3 étoiles quand $p \leq 0,0001$, 2 étoiles lorsque $p \leq 0,001$ et une étoile quand $\leq 0,05$).

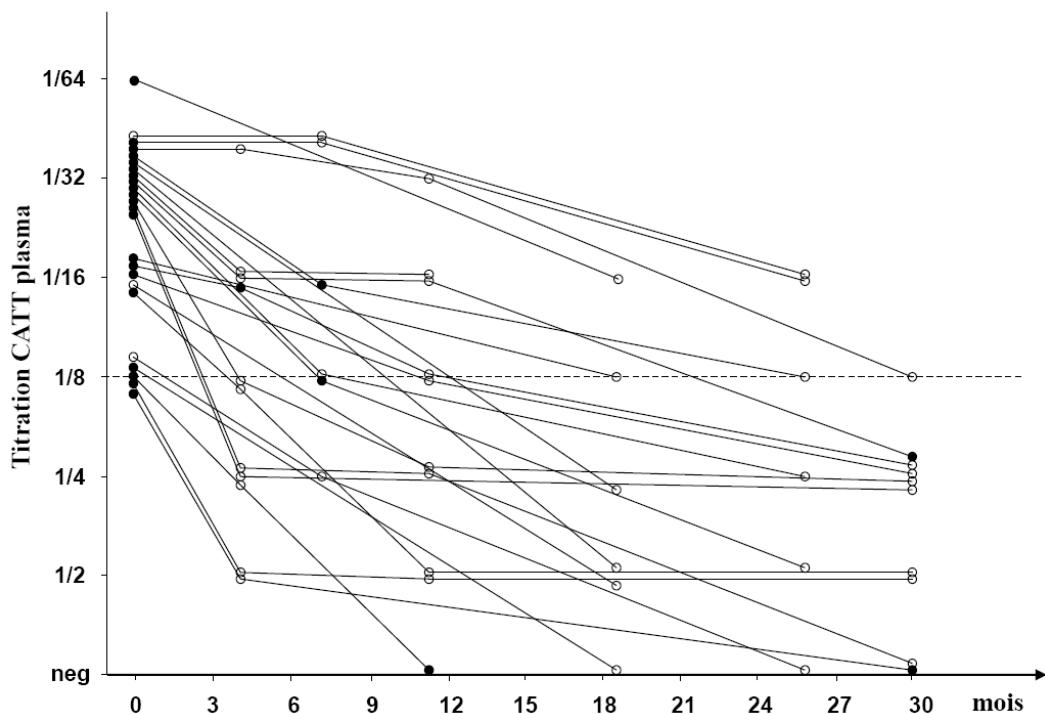
I.3. Evolution temporelle du statut des trypanosomés et des SERO au cours de leur suivi

Un aspect important de ce travail a été le suivi des sujets de l'étude afin de mieux caractériser le statut des SERO et des trypanosomés après traitement. Parmi les 27 trypanosomés dépistés durant les prospections médicales, 3 n'ont pas été suivis (car dépistés au cours du dernier suivi en Avril 2010), 5 ont été vus une fois, 11 ont été vus deux fois et 8 ont été vus trois fois. La plus courte et la plus longue période de suivi étaient de 11 mois (deux individus) et de 30 mois (dix individus) respectivement, en fonction de la disponibilité des sujets de l'étude au moment de la visite et de leur date de diagnostic. Pour les 31 SERO,

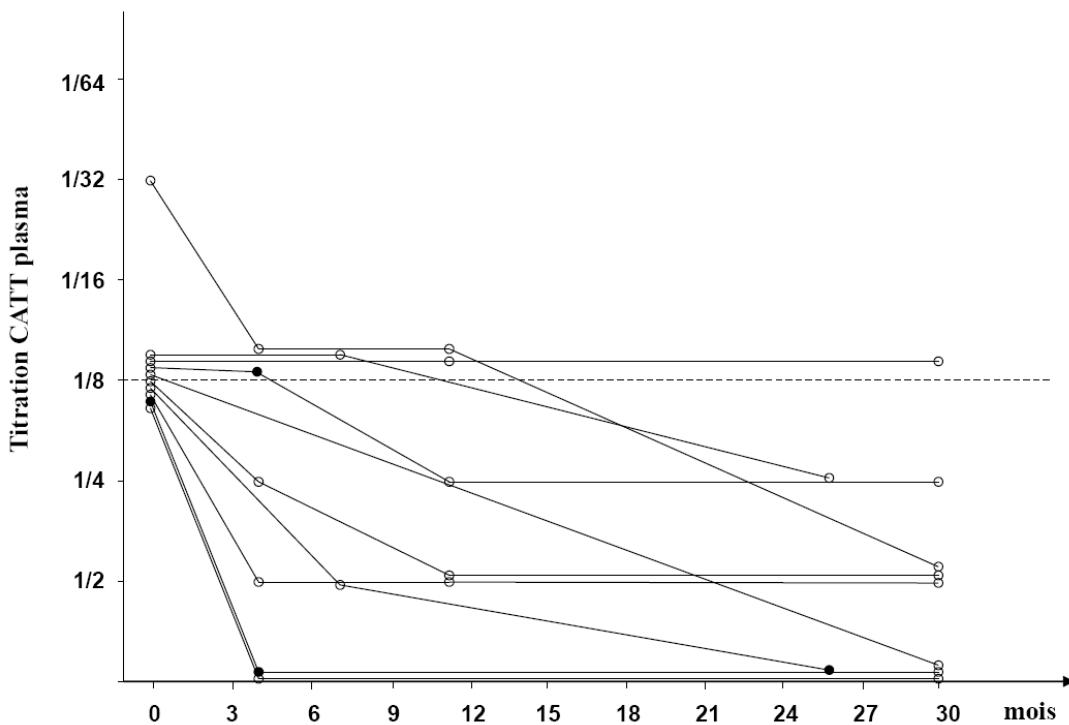
sept, 14 et sept ont reçu une, deux et trois visites de suivi, respectivement, dont 12 ont été suivis pendant une période maximale de 30 mois. Un a été perdu de vu, un a refusé le suivi, et un est décédé avant son premier suivi. Le traitement a été efficace chez tous les trypanosomés comme l'atteste la normalisation de la cytorachie au cours du suivi (**tableau V**). Tous les trypanosomés qui ont été suivis dans le cadre de cette étude avaient des cytorachies < 5 cellules six mois après traitement à l'exception d'un malade en phase 2 précoce dont sa cytorachie a augmenté à 67 cellules durant le premier suivi (7 mois) malgré une amélioration de son état clinique. Sa cytorachie est redevenue négative après 26 mois. Chez les trypanosomés nous avons observé une diminution générale des titres CATT/pl après traitement, avec 70,8% des sujets qui avaient des titres CATT <1/8 lors de leur suivi (**figure 25-a**). Tous les trypanosomés ont été positifs à la Trypanolyse (au moins à un variant LiTat) et sont restés positifs tout au long de leur suivi. Tous les trypanosomés testés à la PCR TBR1/TBR2 sont devenus négatifs après 11 mois et sont restés négatifs jusqu'à la fin du suivi à l'exception de deux trypanosomés chez lesquels la PCR TBR1/TBR2 est redevenue positive après 30 mois. Tous les SERO TL⁻ (**figure 25-b**) sauf un sont devenus négatif au CATT/pl (CATT<1/8) lors de leur suivi (90%) et la positivité à la PCR TBR1/TBR2 a été observée au moins une fois chez quatre de ces sujets (25%). A l'opposé tous les SERO TL⁺ (**figure 25-c**) sauf un, ont maintenu des titres CATT/pl élevés $\geq 1/8$ au cours de leur suivi (94,1%) et la positivité à la PCR TBR1/TBR2 a été observée au moins une fois dans la moitié de ces sujets (52,6%). Le maintien des titres CATT/pl élevés ($\geq 1/8$) est fortement associé au groupe des SERO TL⁺ par rapport au groupe des SERO TL⁻ ($p<0,0001$) ou des trypanosomés après traitement ($p<0,0001$). La proportion des SERO TL⁺ positif au moins une fois à la PCR TBR1/TBR2 n'a pas été significativement différente par rapport aux SERO TL⁻ ($p=0,15$). Cependant ceci est probablement lié à la taille de l'échantillonnage utilisée pour la comparaison ($n=31$). Cependant, dans l'ensemble, la positivité de la PCR était significativement plus élevée ($p=0,022$) dans les échantillons sanguins prélevés chez les SERO TL⁺ (18/51) par rapport aux échantillons sanguins prélevés chez les SERO TL⁻ (4/33) ou chez des trypanosomés après traitement (5/49 ; $p = 0,003$). Comme chez les trypanosomés, le statut TL est resté stable au fil du temps chez les SERO (c'est-à-dire que les SERO négatifs ou positifs à la TL ont gardé leur statut sur toute la période de suivi). De façon importante quatre SERO ont développé la maladie (c'est-à-dire que le parasite a été mis en évidence chez ces sujets) au cours de leur suivi : un a été confirmé malade pendant son premier suivi (7mois), deux pendant leur second suivi (26 mois) et un pendant son troisième suivi (30 mois). Un a été diagnostiqué en phase 1 et 3 en phase 2 précoce. Les quatre SERO ayant

développé la THA faisaient partie du groupe des SERO TL⁺, ils avaient des ganglions cervicaux palpables depuis leur inclusion et 3 d'entre eux étaient positifs à la PCR TBR1/TBR2 réalisée sur le suc ganglionnaire avant leur diagnostic.

a- Malades



b- SERO TL négatifs



c- SERO TL positifs

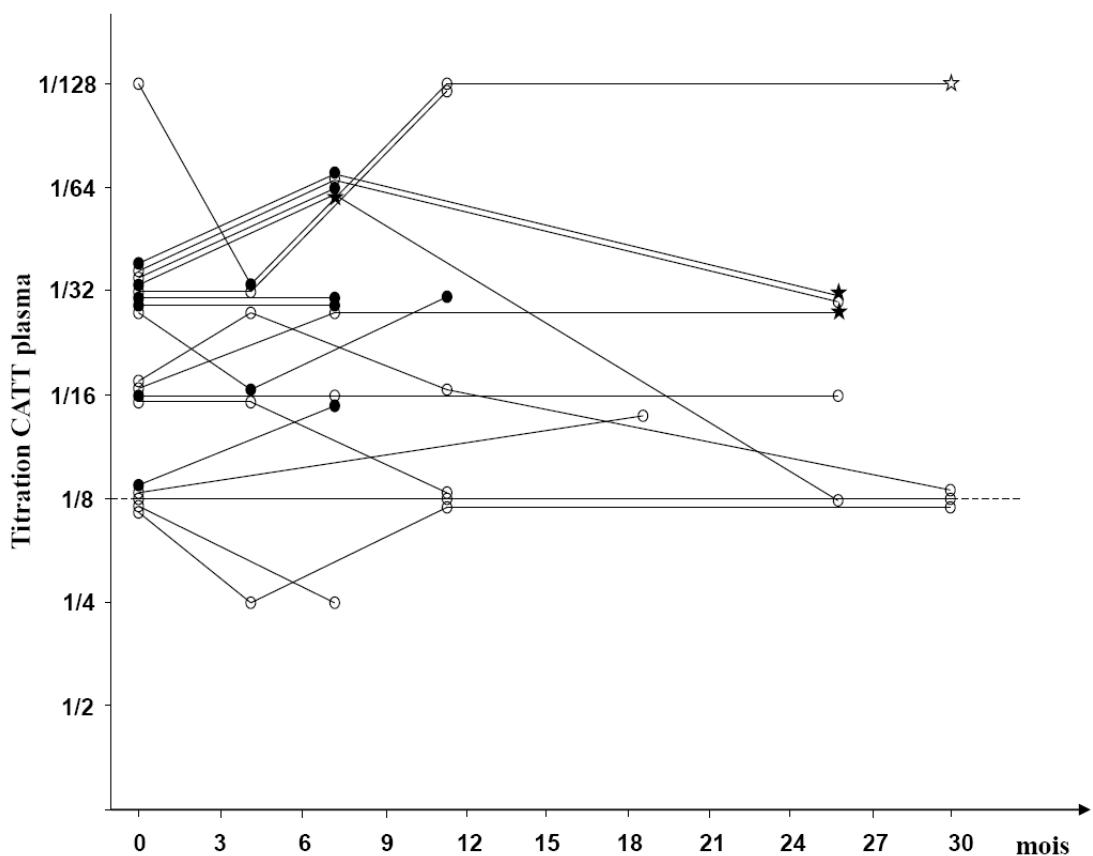
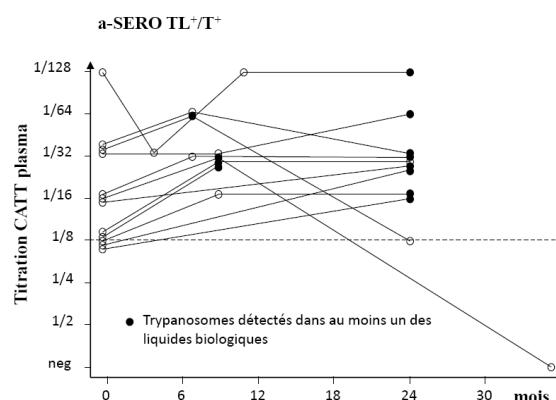


Figure 25 : Suivi des sujets de l'étude dans le foyer de Forécariah.

La progression des titres CATT est présentée pour les trypanosomés au moment de leur diagnostic et après traitement (25-a), pour les SERO TL⁻ (25-b), et les sujets SERO TL⁺ (25-c). Les cercles pleins indiquent la positivité de la PCR TBR1/TBR2, les étoiles noires indiquent les SERO TL⁺ devenus trypanosomés au cours de leur suivi

II. Caractérisation du statut SERO TL+ sur l'ensemble des foyers du littoral guinéen.

Dans le foyer de Dubréka et de Boffa, nous avons mené la même étude que celle décrite précédemment dans le foyer de Forécariah. Nous avons suivi pendant deux ans des trypanosomés, des SERO provenant de ces deux foyers. Des résultats similaires ont été retrouvés, chez les trypanosomés après traitement et chez les SERO TL⁻ pour lesquels nous avons également observé une décroissance des titres CATT plasma au cours de leur suivi. Cependant chez les SERO TL⁺, nous avons mis en évidence un troisième groupe de SERO TL⁺ qui n'existe pas dans l'étude menée à Forécariah : il s'agit de SERO TL⁺ qui affichent une décroissance des titres CATT plasma, individus chez lesquels on peut donc soupçonner une « élimination » spontanée de l'infection. Rappelons que dans l'étude menée dans le foyer de Forécariah, les SERO TL⁺ se répartissaient en deux groupes : (i) les SERO TL⁺ qui développent la THA au cours de leur suivi appelées SERO TL^{+/T⁺} et (ii) les SERO TL⁺ qui maintiennent des titres CATT plasma élevés dans le temps sans développer la maladie. La mise en évidence de ce troisième groupe de SERO TL⁺ témoigne d'une hétérogénéité encore plus importante au sein du phénotype SERO TL⁺ ; certains d'entre eux seraient potentiellement des individus trypanotolérants. L'évolution du statut sérologique et parasitologique dans le temps de ces 3 groupes SERO TL⁺ est représentée dans la figure 26.



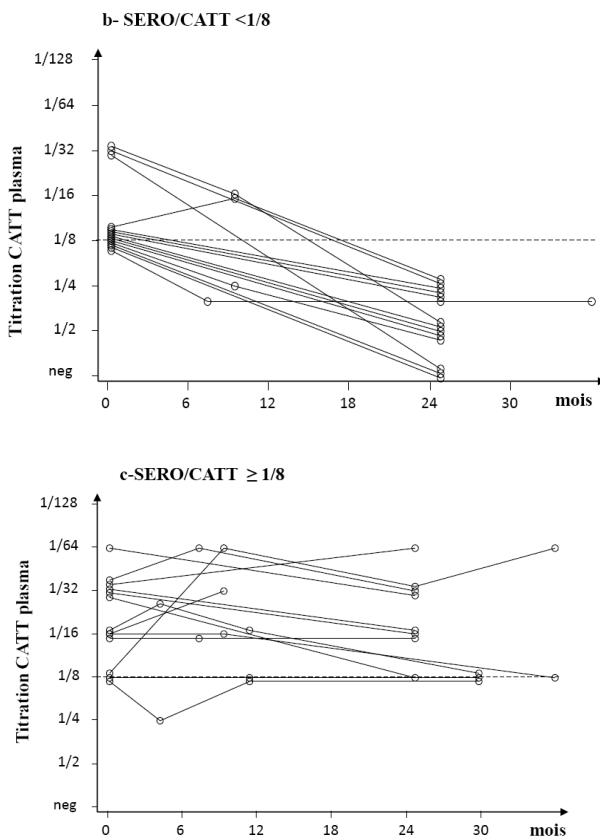


Figure 26 : Evolution du statut sérologique et parasitologique des SERO TL⁺

La figure 26-a représente les SERO TL⁺ ayant développé la THA au cours de leur suivi (SERO TL⁺/T⁺). La figure 26-b, les SERO TL⁺ ayant montré une décroissance de leur titre CATT (SERO/CATT <1/8) et la figure 26-c les SERO TL⁺ ayant maintenu des titres CATT élevés (SERO/CATT $\geq 1/8$). Les ronds noirs indiquent la mise en évidence des trypanosomes dans un liquide biologique.

En conclusion sur les études épidémiologiques, le foyer de Dubréka enregistre la prévalence la plus élevée (1,7%) suivi du foyer de Boffa (0,55%), la prévalence la plus faible étant observée dans le foyer de Forécariah (0,24%) (figure 27). Bien que le foyer de Dubréka ait une prévalence supérieure à celle de Forécariah, ces deux foyers présentent des similitudes quand à la proportion des différentes phases de la maladie (tableau VI). En effet, dans ces deux foyers, nous observons un pourcentage faible des trypanosomés en première phase (16% à Forécariah et 9% à Dubréka). Une première hypothèse pour expliquer cela est que le niveau de transmission est devenu faible dans ces deux foyers. Dans ce contexte, les individus infectés récemment sont rares et il s'agit dans la plupart des cas d'infections anciennes qui sont dépistées dans le deuxième stade de la maladie lors des prospections menées dans ces foyers. Une autre hypothèse est que les souches circulant dans ces foyers sont particulièrement

virulentes et induisent une évolution rapide de l'infection vers les stades neurologiques. Contrairement à ces deux foyers, nous avons observé dans le foyer de Boffa une proportion élevée de malades en première phase (36%). Cette situation suggère que la transmission est plus active (et peut-être plus récente) indiquant un potentiel début de situation épidémique dans ce foyer. Alternativement, les souches circulant dans ce foyer pourraient être moins pathogènes, caractérisées par de longues périodes lymphatico-sanguines ou bien cela pourrait être lié à l'existence de facteurs génétiques de l'hôte permettant à certains trypanosomés de contrôler l'infection sans évoluer en deuxième phase avancée. Des études de génétique des populations menées sur les trypanosomes du sang, du suc ganglionnaire et du LCR dans ces différents foyers ont effectivement montré l'existence de différences génétiques entre les souches de ces trois foyers. Cependant l'essentiel de la structuration génétique observée semblait lier à des différentiations géographiques et temporelles et aucune structuration en fonction du liquide biologique ou de la phase du patient n'ont pu être mise en évidence (Kabore *et al.*, 2011b). A ce sujet, on peut noter également que les génotypes parasitaires mis en évidence chez les individus SERO étaient similaires à ceux trouvés chez les trypanosomés (Kabore *et al.*, 2011b). Les prochaines études transcriptomiques et de génétiques humaines que nous envisageons (voir perspectives de la thèse) nous apporterons davantage d'éléments de réponses sur ces questions.

De manière générale, la prévalence des SERO est corrélée à la prévalence de la maladie. Il est important de noter que dans chacun des foyers le nombre d'individus SERO est similaire à celui des trypanosomés (**figure 27**). Nous présentons dans cette thèse des arguments qui suggèrent fortement qu'au moins une partie de ces individus (ceux qui ont développé la THA au cours de leur suivi et ceux qui maintiennent de fortes réponses sérologiques dans le temps) sont des porteurs asymptomatiques de parasites. Ces résultats illustrent bien l'importance, pour les programmes nationaux de lutte, de mieux prendre en compte ces individus, dans la perspective d'un contrôle durable de cette endémie parasitaire. A l'instar de ce qui est observé pour les trypanosomés, la distribution des différents phénotypes SERO semble également très différente en fonction des foyers étudiés (**tableau VI**). Dans le foyer de Dubréka, près de la moitié des SERO TL⁺ se négativent au CATT au cours de leur suivi. Cette catégorie d'individus est quasiment absente dans le foyer de Forécariah (observé chez seulement un individu), où la majorité des individus SERO TL⁺ (69%) maintiennent des réponses sérologiques fortes dans le temps. Les raisons de ces différences sont encore inconnues et certainement sont multiples, faisant intervenir à la fois,

des paramètres épidémiologiques comme l'intensité de la transmission ou des différences d'interactions dans la relation hôte-parasite. Comme nous l'avons vu dans l'étude épidémiologique dans le foyer de Forécariah, la transmission ne semble pas très élevée dans ce foyer et est localisée à certains micro-foyers. Dans ce contexte, où la probabilité d'être piqué par une glossine infectée est faible (avec donc peu d'infections récentes) il est logique que la proportion d'individus SERO TL⁺ maintenant une réponse sérologique élevée dans le temps soit plus importante car la majorité des individus SERO TL⁺ présentant une décroissance des titres anticorps dans le temps se sont déjà négativés au cours des prospections médicales.

Afin de mieux comprendre les bases biologiques responsables de l'hétérogénéité clinique observée à la fois chez les trypanosomés et au sein des SERO TL⁺, nous avons caractérisé, grâce au dosage de cytokines dans les plasmas et LCRs collectés au moment du dépistage, la nature de la réponse immune développée vis à vis de l'infection chez (i) les trypanosomés dans les différentes phases de la maladie et (ii) les individus SERO TL⁺ en fonction de l'évolution de leur statut sérologique et parasitologique. Les résultats sont présentés ci-dessous.

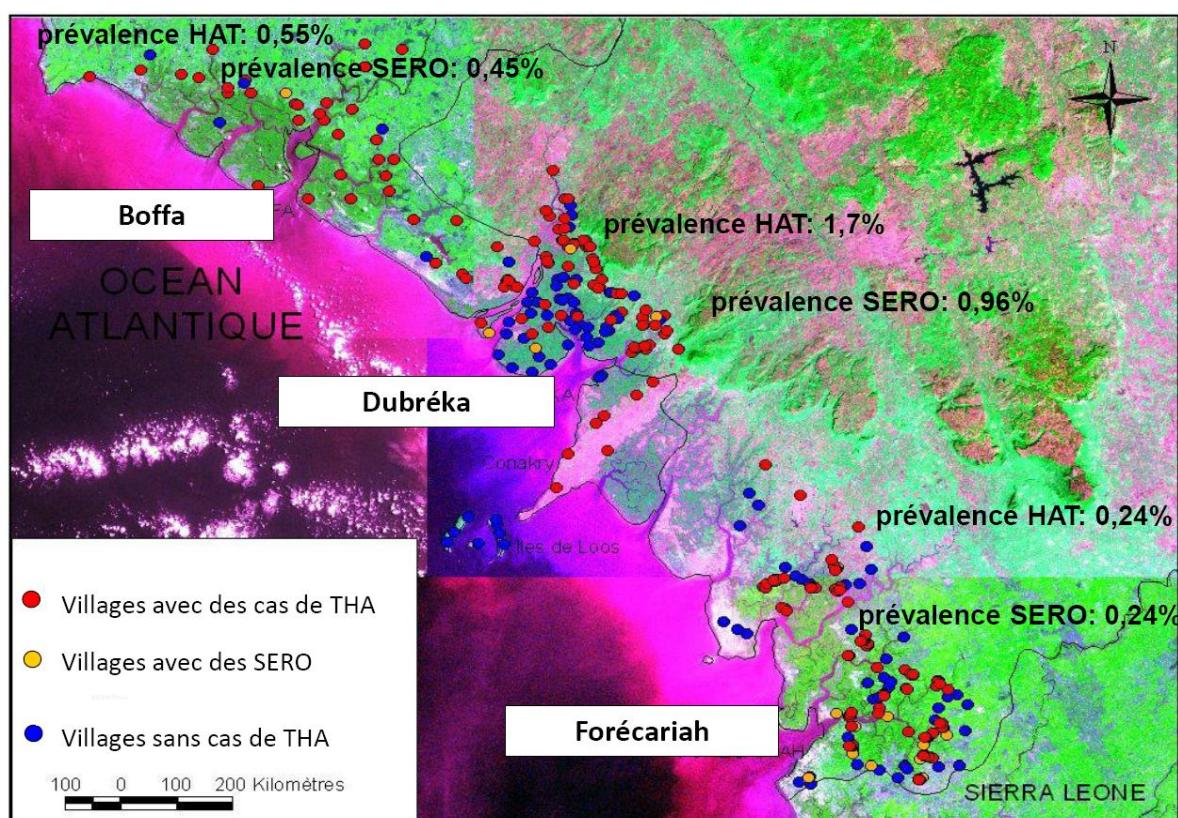


Figure 27 : Prévalence de la THA et séroprévalence sur l'ensemble des foyers du littoral guinéen.

Tableau VI : Pourcentage des différents phénotypes caractérisés

Statut	Forécariah	Dubréka	Boffa
HAT P1	5 (16%)	9 (9%)	20 (36%)
HAP P2p	12 (39%)	32 (32%)	20 (35%)
HAT P2a	14 (45%)	59 (59%)	16 (29%)
Total	31	100	59
SERO TL ⁺ /T ⁺	4 (25%)	7 (28%)	1
SERO TL ⁺ /CATT <1/8	1 (6%)	12 (48%)	2
SERO TL ⁺ /CATT $\geq 1/8$	11 (69%)	6 (24%)	2
Total	16	25	5

Le tableau donne un récapitulatif des différentes phases phase de la THA dans les 3 foyers et les proportions des 3 groupes de SERO TL⁺. Nous n'avons considéré que les SERO TL⁺ ayant un suivi de 2 ans. Dans le foyer de Boffa les proportions dans 3 groupes de SERO TL⁺ n'ont pas été calculées car les effectifs étaient très faibles.

III. Etude immunologique : déterminants immunologiques du contrôle de l'infection à *Trypanosoma brucei gambiense* chez l'homme

Cette étude s'est déroulée sur le littoral guinéen dans trois foyers actifs de THA (Dubreka, Boffa et Forécariah). Trois groupes ont été définis pour l'analyse immunologique basée sur le dosage des cytokines :

- Trypanosomés (T^+ , n= 52), CATT titre plasma $\geq 1/8$ et un test parasitologique positif, TL⁺ dont 10, 19 et 23 ont été respectivement classés en fonction de la cytorachie du LCR en phase 1 (P1, 0-5 cellules / μ l), en phase 2 précoce (P2p, 6-20 cellules / μ l) et en phase 2 avancée (P2a, > 20 cellules / μ l)
- SERO TL⁺ (n= 60), CATT titre plasma $\geq 1/8$, tests parasitologiques négatifs, TL⁺
- Contrôles endémiques (n= 40), CATT plasma négatifs, tests parasitologiques négatifs, TL⁻

Tous les trypanosomés ont été suivis après le traitement afin d'identifier d'éventuels cas d'échecs thérapeutiques. Nous avons échantillonné 1 ml de LCR lors de leur premier suivi post-thérapeutique réalisé en moyenne 8 mois après traitement. Parmi les 60 SERO TL⁺, 40 ont pu être suivis pendant au moins 2 ans et ont été inclus dans l'analyse de la valeur pronostique des niveaux de cytokines à l'inclusion sur l'évolution du statut sérologique et parasitologique.

III.1. Profil cytokinique dans le LCR et dans le plasma chez les individus trypanosomés dans les différentes phases de la maladie.

Dans le LCR, aucune différence significative n'a été observée entre les niveaux de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-12p70 chez les individus trypanosomés dans les différentes phases de la maladie. Par contre les trypanosomés en P2a se caractérisent par des concentrations significativement plus élevées d'IL-10 ($p=0.0003$), d'IL-8 ($p=0.0015$) et d'IL-6 ($p=0.0126$) en comparaison des concentrations observées dans le LCR des trypanosomés en P1 ou P2p. Après traitement, les concentrations d'IL-10 (**figure 28-a**), d'IL-8 (**figure 28-b**) et IL-6 (**figure 28-c**) chez les trypanosomés en P2a retrouvent des niveaux comparables à ceux observés dans les phases précoce de la maladie.

A l'inverse, aucune différence significative n'a été observée pour les cytokines dosées dans le plasma chez les trypanosomés en P1, P2p ou P2a (**figure 29**). Seule une tendance ($p=0,16$) à un accroissement des concentrations d'IL-1 β chez les trypanosomés en P2a a été observée. Aux vues de ces résultats, nous avons regroupé tous les trypanosomés en un seul groupe (groupe des trypanosomés) pour la suite des analyses.

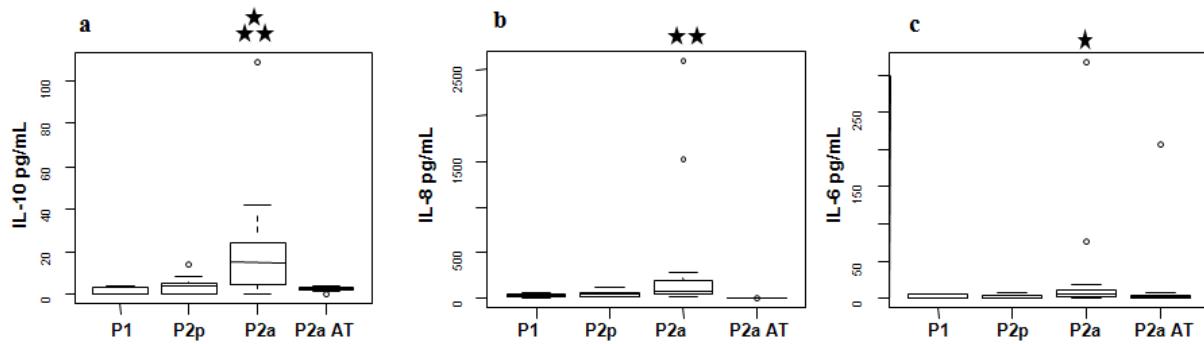


Figure 28 : Profil des cytokines IL-10, IL-8 et IL-6 dans le LCR en fonction des phases de la THA

Les Box-plot représentent les valeurs de l'IL-10 (a), de l'IL-8 (c) et de l'IL-6 (c) mesurées dans le LCR à l'inclusion, chez les trypanosomés en fonction des phases de la THA. Seules les cytokines présentant des différences significatives sont représentées. Les p values sont représentées par les étoiles (trois étoiles : $P < 0,001$; deux étoiles : p compris entre 0,01 et 0,001; une étoile : p compris entre 0,05 et 0,01). P1 : trypanosomés en phase 1, P2p : trypanosomés en phase 2 précoce, P2a : trypanosomés en phase 2 avancée, P2a AT : trypanosomés en phase 2 avancée après traitement.

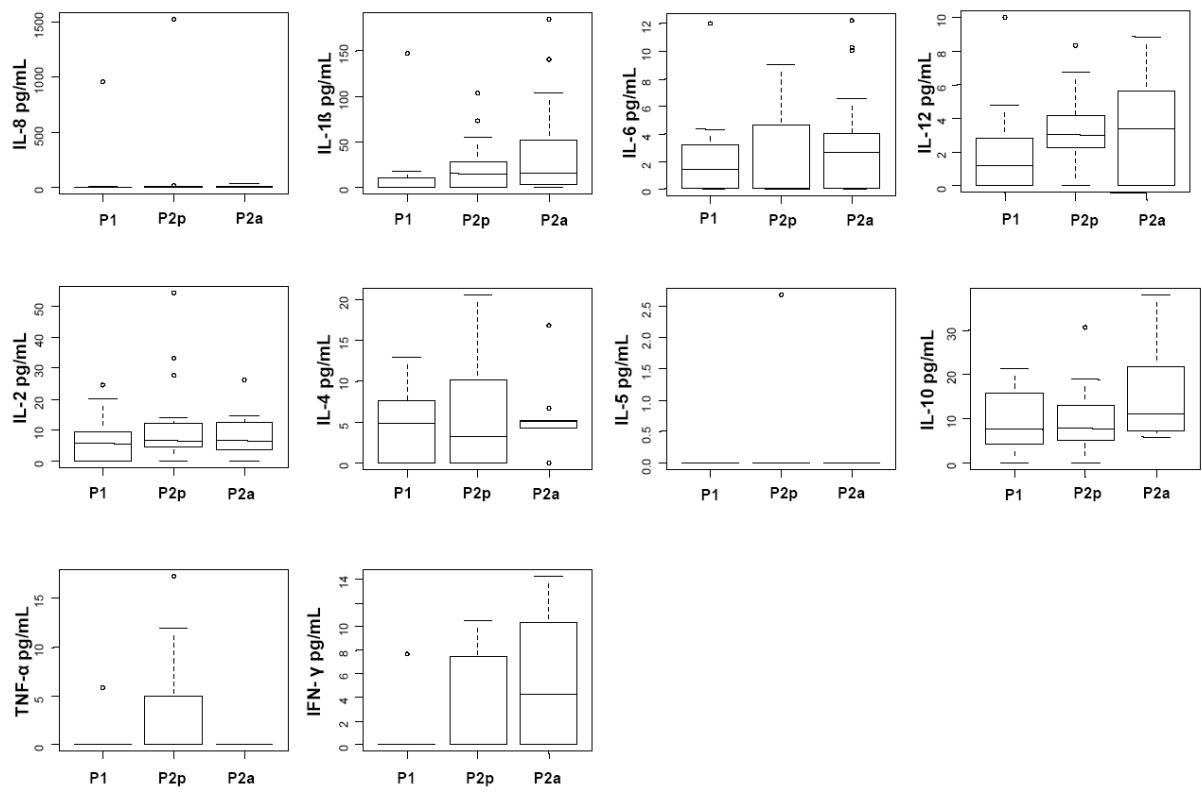


Figure 29 : Profil des cytokines IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α et IFN- γ dans le plasma en fonction des phases de la THA.

P1 : trypanosomés en phase 1, P2p : trypanosomés en phase 2 précoce, P2a : trypanosomés en phase 2 avancée.

III.2. Comparaison des profils cytokiniques du plasma entre les trypanosomés, les SERO TL⁺ et les contrôles endémiques.

A l'exception de l'IL-5 pour laquelle aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes d'individus, d'importantes différences ont été observées entre les trypanosomés, les SERO TL⁺ et les contrôles endémiques pour toutes les autres cytokines étudiées (**figure 30**). De manière générale, les concentrations les plus faibles ont été observées chez les contrôles endémiques pour toutes les cytokines à l'exception de l'IL-12p70. Les profils des trypanosomés et des SERO TL⁺ étaient similaires du point de vue de l'IL-1 β , de l'IL-10 et de l'IFN- γ avec des concentrations significativement plus élevées que celles observées chez les contrôles. Au contraire les niveaux d'IL-2 ($p=<0,0001$) et d'IL-4 ($p=<0,0001$) étaient plus élevés chez les trypanosomés alors que les concentrations d'IL-8 ($p<0,0001$), d'IL-6 ($p=0,0015$) et de TNF- α ($p=0,0047$) étaient significativement supérieures chez les SERO TL⁺. Par rapport aux trypanosomés et aux contrôles, les SERO TL⁺ se

distinguent également par de très faibles concentrations d'IL-12p70 ($p<0,0001$), 55/60 individus présentant des valeurs inférieures au seuil de détection contre 16/52 et 2/40 chez les trypanosomés et les contrôles respectivement.

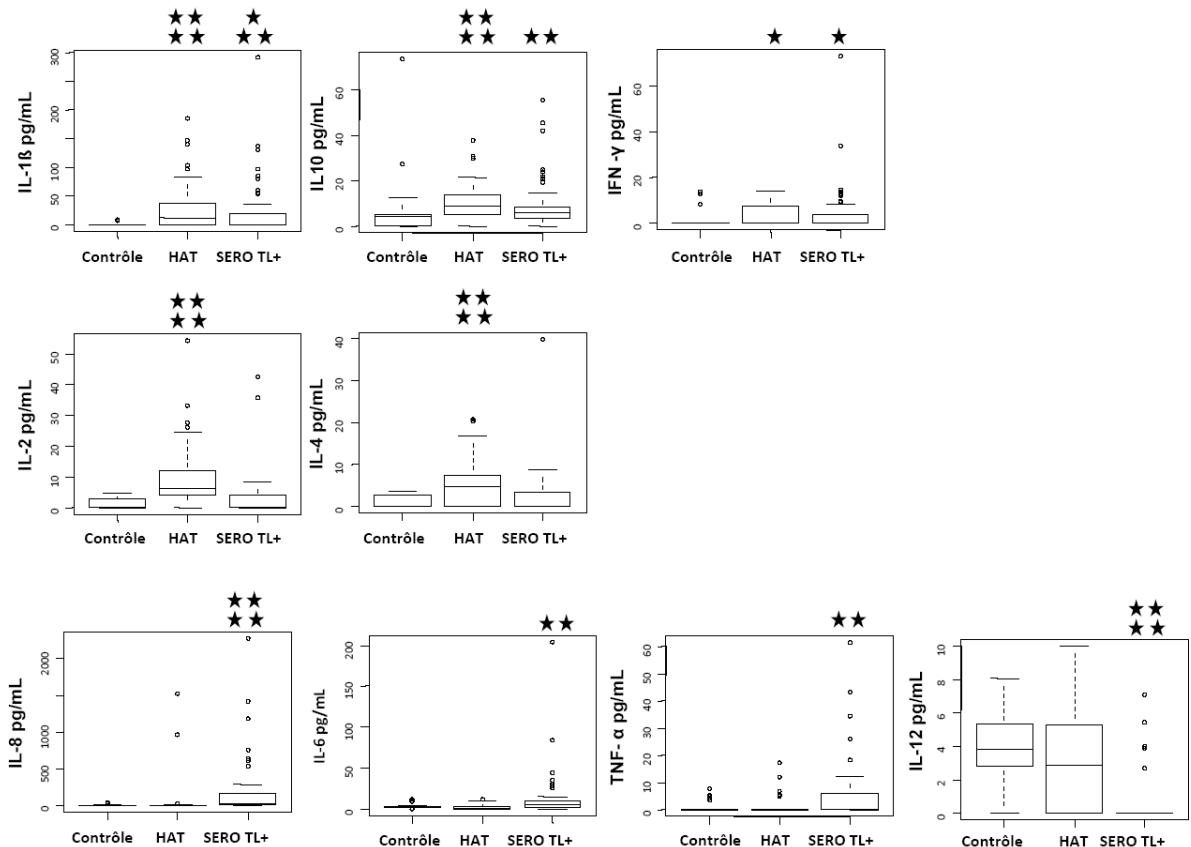


Figure 30 : Profil des cytokines plasmatiques chez les SERO TL $^+$, les trypanosomés et les contrôles endémiques.

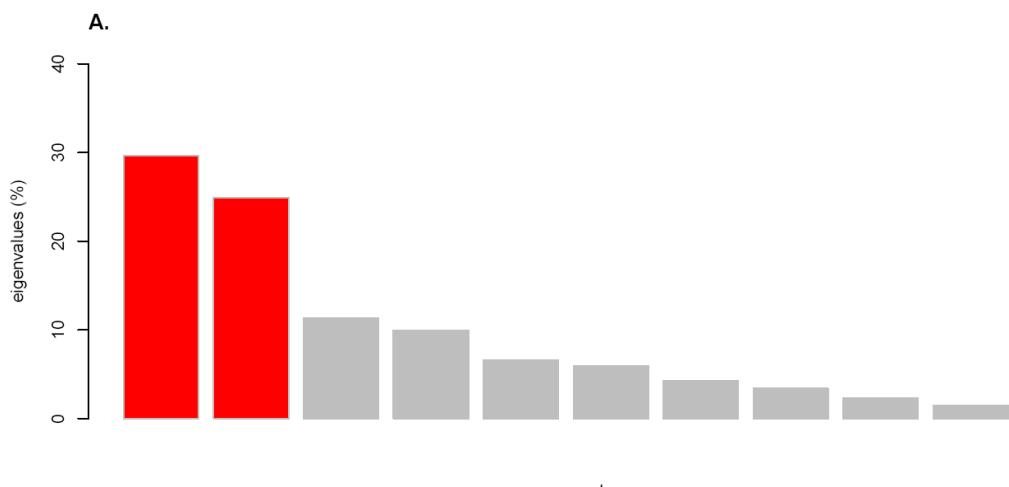
Les p values par rapport aux contrôles sont indiquées par les étoiles. Quatre étoiles : $p < 0,0001$, trois étoiles : p compris entre 0,001 et 0,01; deux étoiles : p compris entre 0,01 et 0,001; une étoile : p compris entre 0,05 et 0,01. Seules les cytokines présentant des différences significatives sont représentées.

III.3. Analyses multivariées des profils cytokiniques chez les trypanosomés et les SERO TL $^+$

Afin d'avoir une vue plus globale de la réponse immune développée chez les trypanosomés et les SERO TL $^+$, les résultats de dosage des cytokines ont été dans un premier temps analysés ensemble dans une analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse, dont les résultats sont représentés dans la **figure 31**, montre que les deux premières composantes expliquent respectivement 29,3 et 24,8% de la variance (**figure 31.A**). La

représentation du premier plan factoriel (axe 1: composante 1; axe 2 composante 2, (**figure 31.B**)) montre l'existence d'un gradient le long du deuxième axe différenciant clairement les trypanosomés des SERO TL⁺ confirmant le fait que ces deux groupes d'individus se caractérisent par des réponses immunes bien spécifiques. Les principales cytokines contribuant à la composante 2 sont l'IL-8, l'IL6 et le TNF- α indiquant que le statut SERO TL⁺ est essentiellement caractérisé par une réponse de type inflammatoire comparativement aux trypanosomés.

Les corrélations entre cytokines, l'âge, le sexe ou le foyer d'origine des individus étant potentiellement confondant dans l'analyse des résultats, une analyse multivariée par régression logistique a ensuite été réalisée afin de décrire plus précisément l'effet des cytokines sur la détermination des statuts SERO TL⁺ ou trypanosomés (Analyse I, **Tableau VII**). Dans ces analyses les cytokines ont toutes été recodées en variables qualitatives bimodales (faible/fort) en utilisant la médiane comme seuil. L'analyse univariée par régression logistique de ces variables recodées donne des résultats similaires à ceux obtenus par les tests non paramétriques décrits plus haut. Les seules variables incluses dans le modèle multivarié, suite à une procédure pas à pas, étaient l'IL-8, l'IL-6 et l'IL-12. Suite à l'entrée de l'IL-12p70 dans le modèle, les autres cytokines (IL-2, IL-4, IL-10 et IFN- γ) présentant des différences significatives en analyse univariée entre SERO TL⁺ et trypanosomés deviennent non significatives et sont exclues de l'analyse. Le statut SERO TL⁺ se caractérise par rapport aux trypanosomés par des concentrations élevées d'IL-8 ($p=0.006$, odds ratio [OR]=6.28, Intervalle de Confiance [IC] 1.67 – 30.7) et d'IL-6 ($p=0.002$; OR=8.87, IC 2.09 – 61.2) ainsi que par des concentrations d'IL-12p70 inférieures au seuil de détection ($p<10^{-4}$; OR=0.012, IC 0.001 – 0.055). Aucun effet significatif de l'âge, du sexe ou du foyer d'origine n'a été détecté dans cette analyse.



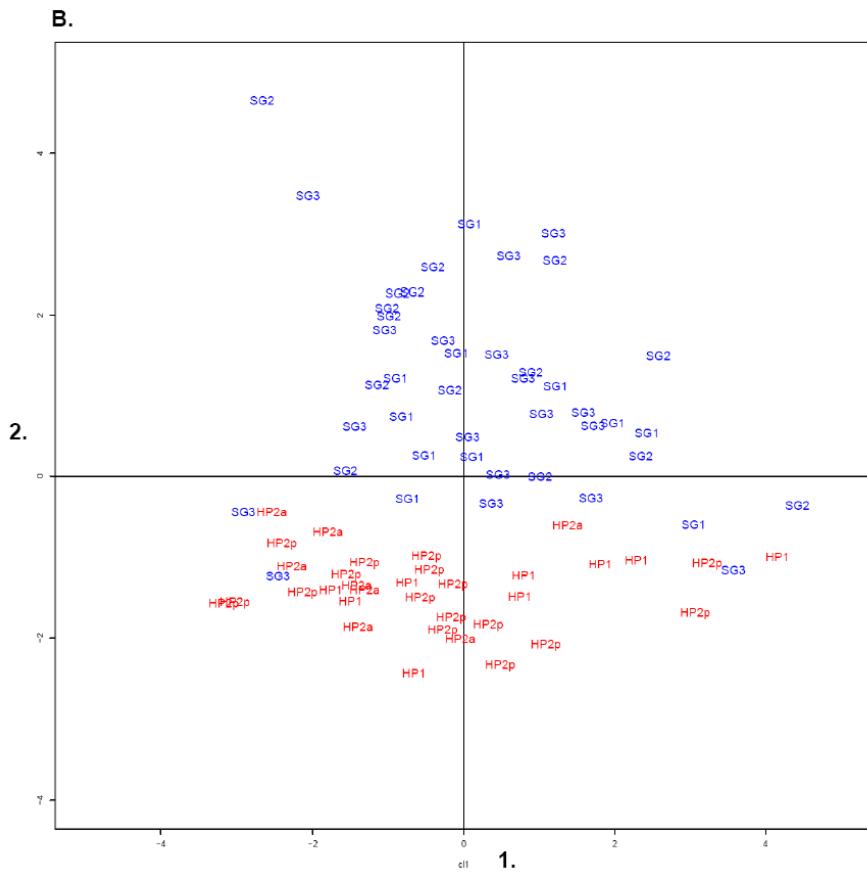


Figure 31 : Analyse en Composante principale.

La figure 31.A représente la contribution des composantes dans la variance (les deux premières composantes expliquent plus de 50% de la variance). La figure 31.B représente le premier plan factoriel de l'analyse en composantes principales des niveaux de cytokines (1 : première composante, 2 : deuxième composante). SG1 : SERO TL⁺ groupe 1 (séropositifs chez qui le parasite a été mis en évidence au cours du suivi), SG2 : SERO TL⁺ groupe 2 (séropositifs devenant inférieurs au seuil de positivité du titre CATT-plasma et sans détection du parasite au cours du suivi), SG3 : (séropositifs ayant maintenus des titres CATT-plasma élevés et sans détection du parasite tout au long du suivi), HP1 : (trypanosomés en phase 1), HP2p : (trypanosomés en phase 2 précoce), HP2a : (trypanosomés en deuxième phase avancée).

Tableau VII : Analyse par régression logistique des profils cytokiniques chez les trypanosomés et les SERO TL⁺

ANALYSE	Covariables avant l'analyse pas à pas	Cytokines inclus dans le modèle	seuil	P	OR	CI
Analyse I						
SERO versus trypanosomés	IL-8 (<10 ⁻⁴); IL-6 (<10 ⁻⁴); IL-12 (<10 ⁻⁴); IL-2 (<10 ⁻⁴); IL-4 (0,009); IL-10 (0,011) TNF- α (0,012)	IL-8 IL-6 IL-12	>10 pg/ml >3,7 pg/ml < seuil detection*	0,0003 0,0075 <10 ⁻⁴	9,86 5,93 50,51	2,72-47,49 1,58-28,86 12,51-309,55
Analyse II						
SERO TL⁺/T⁺	IL-8 (0,056); IL-10 (0,017); TNF- α (0,048);	IL-10	>6 pg/ml	0,0034	13,09	2,19-124,29
(SG1 versus SG2 et SG3)	IFN- γ (0,098) ; Age (0,06)*	TNF-α	< seuil détection	0,009	10,49	1,72-101,12
Analyse III						
SERO/CATT<1/8	IL-8 (0,009); IL-6 (0,095); Age (0,066)*	IL-8	>30 pg/ml	0,0056	8,32	1,79-53,44
(SG2 versus SG1 et SG3)		Age	-	0,048	-	-
Analyse IV						
SERO/CATT\geq1/8	Aucune variable inclue					
(SG3 versus SG1 et SG2)						

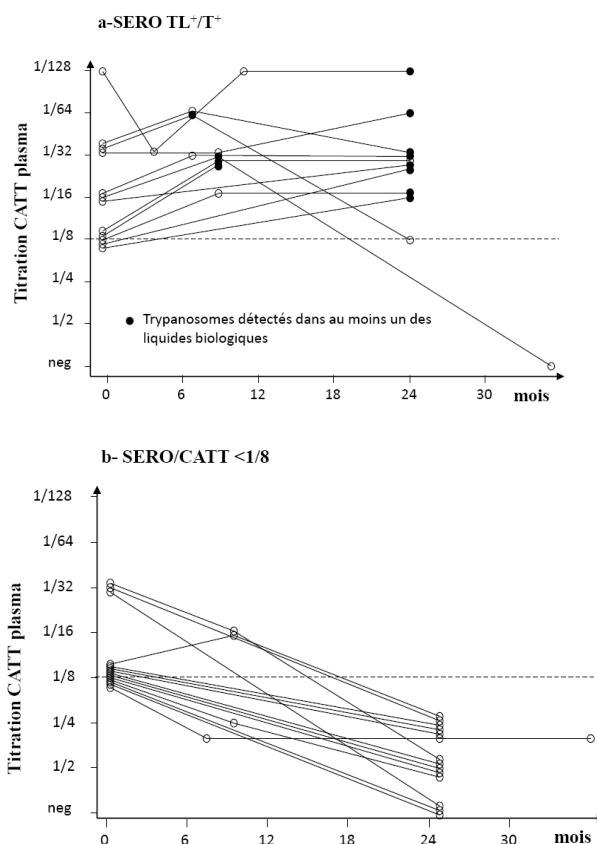
Les variables incluses dans les analyses multivariées ainsi que les meilleurs modèles issus de l'analyse pas à pas sont présentés. L'analyse I compare les profils cytokiniques des SERO par rapport aux trypanosomés. L'Analyse II compare les SERO devenus malades au cours de leur suivi (SG1) par rapport aux SERO devenant inférieurs au seuil de positivité du titre CATT (SG2) et aux SERO ayant maintenus des titres élevés tout au long du suivi (SG3). L'analyse III compare les SERO devenant inférieurs au seuil de positivité du titre CATT (SG2) par rapport aux SERO devenus malades au cours de leur suivi (SG1) et aux SERO ayant maintenus des titres élevés tout au long du suivi (SG3). L'analyse IV compare les SERO ayant maintenus des titres élevés tout au long du suivi (SG3) par rapport aux SERO devenus malades au cours de leur suivi (SG1) et aux SERO devenant inférieurs au seuil de positivité du titre CATT (SG2).

OR : Odds Ratio, CI : Intervalle de Confiance.

* L'âge a été inclus en tant que variable quantitative dans les modèles.

III.4. Valeur pronostique des cytokines sur l'évolution de l'infection chez les individus SERO TL⁺.

Dans le but d'évaluer la valeur pronostique des niveaux de cytokines mesurés à l'inclusion sur le devenir du statut parasitologique et sérologique des SERO TL⁺, des suivis longitudinaux ont été réalisés à domicile pour ces individus. Au total, nous avons pu obtenir des données de suivi sur une période de deux ans pour 40 SERO TL⁺. Les résultats des tests parasitologiques et sérologiques réalisés au cours du suivi ont permis de distinguer trois groupes d'individus (**figure 32**), parmi lesquels : le groupe 1 (SERO TL⁺/T⁺, SG1) est constitué de 12 individus chez qui le parasite a pu être mis en évidence dans un liquide biologique au cours de leur suivi, pour la majorité d'entre eux, deux ans après leur diagnostic initial; le groupe 2 (SERO/CATT <1/8, SG2) est constitué par 15 individus pour lesquels une décroissance des titres CATT-plasma a été observée sans détection du parasite; le groupe 3 (SERO/CATT $\geq 1/8$, SG3) est constitué de 13 individus qui ont maintenu une réponse sérologique au CATT élevée ($\geq 1/8$) sans que le parasite n'ait jamais pu être mis en évidence.



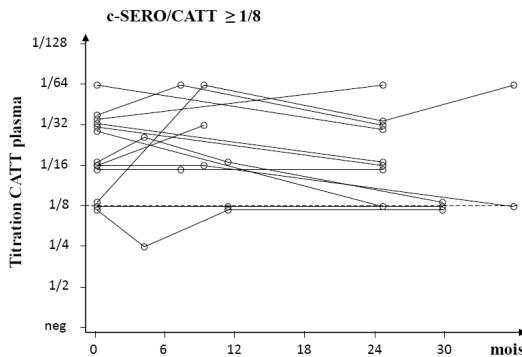


Figure 32 : Evolution du statut sérologique et parasitologique des SERO TL⁺

La figure 32-a représente les SERO TL⁺ ayant développé la THA au cours de leur suivi (SERO TL⁺/T⁺). La figure 32-b, les SERO TL⁺ ayant montré une décroissance de leur titre CATT (SERO/CATT <1/8) et la figure 32-c les SERO TL⁺ ayant maintenu des titres CATT élevés (SERO/CATT ≥1/8). Les ronds noirs indiquent la mise en évidence des trypanosomes dans un liquide biologique.

L'analyse multivariée des cytokines effectuée dans ces 3 groupes de SERO TL⁺, a montré que les niveaux élevés d'IL-10 ($p= 0,0034$, OR=13,09, IC 2,19 – 124,29) et les niveaux faibles de TNF- α ($p= 0,009$, OR=10,49, IC 1,72 – 101,12) sont associés à un risque accru de développer la THA chez les SERO TL⁺ (Tableau VII, analyse II, figure 33) tandis que les niveaux élevés d'IL-8 ($p= 0,0056$, OR= 8,32, IC 1,79 – 53,44) sont associés à une décroissance des titres CATT chez les SERO TL⁺ (Tableau VII, analyse III, figure 33). Aucune association avec les cytokines n'a été observée dans le groupe des SERO TL⁺ qui maintiennent des titres CATT élevés. On peut noter cependant que l'on n'observe pas de regroupement particulier des 3 groupes de SERO TL⁺ sur l'ACP.

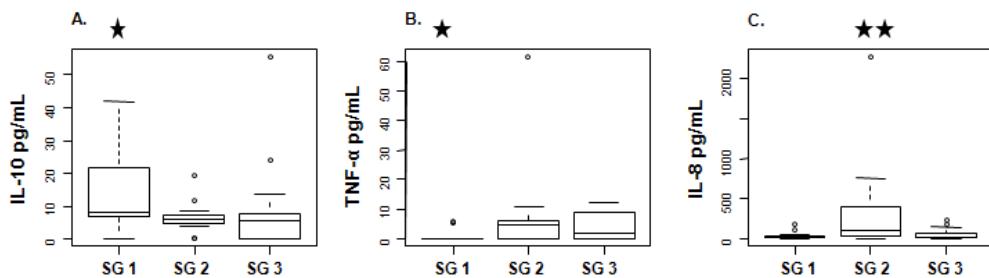


Figure 33 : Valeur pronostique des cytokines mesurée à l'inclusion sur l'évolution du statut SERO TL⁺.

SG1 : SERO TL⁺/T⁺ (séropositifs chez qui le parasite a pu être mis en évidence dans un liquide biologique au cours de leur suivi), SG2 : SERO/CATT <1/8 (séropositifs devenant inférieurs au seuil de positivité) et SG3 : SERO/CATT ≥1/8 (séropositifs qui maintiennent une réponse sérologique au CATT élevé). Les p values sont indiquées par les étoiles. Deux étoiles : p compris entre 0,01 et 0,001; une étoile : p compris entre 0,05 et 0,01.

IV. Etude moléculaire : l'expression d'APOL1 est induite par *Trypanosoma brucei gambiense* mais n'est pas associée au contrôle de l'infection

Cette étude a été soumise pour publication dans Infection, Genetics and Evolution.

L'échantillonnage des ARNs sanguins pour cette étude a été effectué dans les foyers actifs de THA du littoral guinéen (Dubreka, Boffa et Forécariah). Pour cette étude, nous avons inclus 199 individus répondant aux critères d'inclusions suivants :

- Trypanosomés (N=110) : positifs au CATT; positifs au test de trypanolyse (TL⁺); trypanosomes détectés par le test mAECT (Buscher *et al.*, 2009) et/ou par examen du suc ganglionnaire. Pour tous ces patients, nous avons également enregistré le nombre de trypanosomes récupérés dans le collecteur des mini-colonnes qui est représentatif des densités parasitaires sanguines. Ces patients ont ensuite été classés en fonction des résultats de la cytorachie : phase 1 lymphatico-sanguine (P1; < 5 cellules; n=16), phase neurologique précoce (P2p; 6-20 cellules; n=45) et phase neurologique avancée (P2a; > 20 cellules; n=49).
- SERO TL⁺ (N=37) : positifs au CATT avec une dilution du plasma $\geq 1/8$; TL⁺; aucun trypanosome détecté par la mAECT ou examen du suc ganglionnaire lorsque des adénopathies cervicales étaient présentes.
- Contrôles endémiques (N=52) : négatifs au CATT; TL⁻; habitant le même village qu'un trypanosomé et/ou un SERO TL⁺.

Les résultats de cette étude sont présentés et discutés en même temps.

IV.1. L'expression d'APOL1 : un trait phénotypique au déterminisme complexe.

La **figure 34** représente la distribution des niveaux d'expression d'APOL1 dans l'ensemble de la population d'étude, relativement à l'individu de l'échantillon présentant la plus faible expression (calibrateur). L'expression d'APOL1 apparaît comme un trait hautement variable d'un individu à l'autre avec des niveaux d'expression pouvant varier d'un facteur de 1

à plus de 100. L'analyse par régression linéaire simple de la part de la variance pouvant être expliquée par les variables disponibles pour cet échantillon de population (genre, âge, foyer et statut vis à vis de l'infection), montre par ailleurs que l'expression d'*APOL1* est un trait complexe contrôlé par des facteurs d'origines multiples (**tableau VIII**). Sur l'ensemble de l'échantillon, des associations significatives ont été observées avec les variables liées à l'infection par *T. b. gambiense* : les niveaux moyens d'expression d'*APOL1* étaient significativement plus élevés ($p=0.02$) chez les trypanosomés (29.7 ± 1.2) et les SERO TL⁺ (28.1 ± 1.3) que chez les contrôles endémiques (24.5 ± 1.6) et au sein des trypanosomés les plus forts niveaux moyens d'expression étaient associés aux patients présentant les plus fortes densités parasitaires; $p=0.009$ pour supérieure à 2 trypanosomes observés dans le collecteur de la mAECT, correspondant à des parasitémies sanguines supérieures 50 trypanosomes/ml de sang (Buscher *et al.*, 2009; Camara *et al.*, 2010). Cependant d'autres variables étaient également associées significativement à l'expression d'*APOL1*. Un effet de l'âge, visible essentiellement chez les individus trypanosomés avec des niveaux d'*APOL1* supérieurs chez les patients de moins de 25 ans ($p=0.009$) et surtout un effet foyer très significatif ($p<0,0001$). Les niveaux moyens d'expression d'*APOL1* apparaissent effectivement très inférieurs à Forécariah (22.5 ± 1.2) comparativement aux deux autres foyers Dubréka (30.5 ± 1.1) et Boffa (30.5 ± 2.3) situés à 100 et 150 km respectivement le long du littoral Guinéen. L'effet foyer reste très significatif, chez les contrôles endémiques et indique que ces différences entre foyers sont au moins en grande partie indépendantes de l'infection par *T. b. gambiense*. Les raisons qui expliquent ces différences entre foyers sont inconnues mais pourraient être liées à des différences provenant du régime alimentaire (apport en lipides, vitamine D, etc.) à la prévalence de différentes pathologies associées à des niveaux élevés de concentration plasmatique d'apolipoprotéines L ou encore à des polymorphismes génétiques impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique. En effet, des corrélations significatives ont été observées entre les concentrations plasmatiques d'apolipoprotéines L et les concentrations de triglycérides et de cholestérol chez des individus normolipidémiques. Par ailleurs des concentrations significativement plus élevées sont également observées chez les diabétiques et les personnes souffrant d'hyperlipidémie (Duchateau *et al.*, 2000). Il est par ailleurs suggéré que cette régulation a lieu en partie au niveau transcriptionnel au travers de site de régulation par les stérols identifiés au niveau des promoteurs des gènes *APOL* (Duchateau *et al.*, 2001).

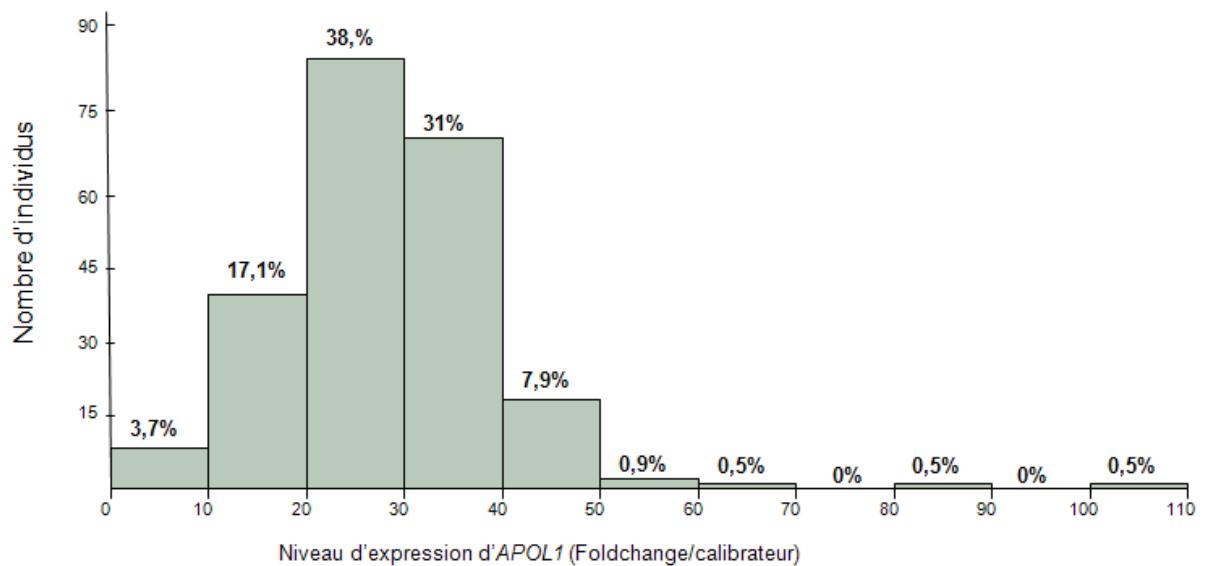


Figure 34 : Variabilité de l'expression d'APOL1 dans la population d'étude.

Tableau VIII : Effet des variables enregistrées sur les niveaux d'expression d'APOL1.

Co-variables	Tous			Contrôles			SERO TL ⁺			HAT		
	N	APOL1 ¹	p-value	N	APOL1	p-value	N	APOL1	p-value	N	APOL1	p-value
Sexe												
Hommes	112	27.5		34	24.5		19	27		59	29.4	
Femmes	87	29.1	0.32	18	24.6	0.96	18	29.2	0.39	51	30.7	0.59
Age												
<25 ans	68	32.4		5	28.5		14	28.1		49	34	
25-39 ans	69	25.7		25	23.6		11	29		33	26.2	
≥45 ans	62	26.4	0.001²	22	24.6	0.68	12	27.3	0.87	28	27.4	0.009
Foyer												
Forécariah	58	22.5		21	18.4		15	25.7		22	24.1	
Dubréka	111	30.5		21	28.7		15	31.3		75	30.9	
Boffa	30	30.5	<0.0001	10	28.6	0.0004	7	26.5	0.11	13	34.2	0.032
Phases de la maladie												
lymphatiko sanguine (P1)	-	-		-	-		-	-		16	28.1	
neurologique précoce (P2p)	-	-		-	-		-	-		45	31.5	
neurologique avancée (P2a)	-	-		-	-		-	-		49	29.2	0.549
Densité parasitaire												
0-1 tryp/mAECT collecteur	-	-		-	-		-	-		39	27.5	
>1 tryp/mAECT collecteur	-	-		-	-		-	-		28	36	0.009
Statut THA												
Contrôle	52	24.5										
SERO TL ⁺	37	28.1										
Trypanosomés	110	29.7	0.02									

L'analyse de l'effet des variables enregistrées sur l'expression d'APOL1 a été effectuée par régression linéaire univariée par la méthode des moindres carrés. Les résultats sont présentés pour l'ensemble de l'échantillon (n=199) et pour chacune des catégories phénotypiques considérées dans l'étude : Contrôles endémiques (n=52), SERO TL⁺ (n=37) et Trypanosomés (n=110).

¹ moyenne des niveaux d'expression d'APOL1 (fold change).

² les valeurs de p < 0.05 sont indiquées en gras.

IV.2. Nature de la relation entre l'infection par *T. b. gambiense* et l'expression d'*APOL1*

Afin de prendre en compte l'effet de l'ensemble des variables dans l'analyse de la relation entre l'infection par *T. b. gambiense* et les niveaux d'expression d'*APOL1*, l'analyse a été stratifiée en fonction du foyer. Les foyers de Dubréka et de Boffa ne présentant pas de différences concernant l'expression d'*APOL1*, ils ont été regroupés et analysés indépendamment de Forécariah. Par ailleurs, dans chacune des analyses, l'effet de l'âge a été pris en compte en l'incluant en tant que variable quantitative dans les modèles de régression linéaire (**tableau IX**). Contrairement à l'analyse précédente qui regroupait l'ensemble des échantillons, à Dubréka et Boffa, aucun effet significatif de la densité parasitaire chez les malades n'a pu être confirmé, indiquant que les différences observées dans le **tableau VIII** étaient essentiellement attribuable à la variable foyer et au fait que la grande majorité des malades du foyer de Forécariah sont dépistés à l'examen du suc ganglionnaire mais sont négatifs à la mAECT (Ilboudo *et al.*, 2011), traduisant des parasitoses sanguines particulièrement faibles dans cette population. Concernant le statut vis à vis de l'infection, aucune différence n'a été notée également entre les contrôles endémiques, les SERO TL⁺ et les trypanosomés dans les foyers de Dubréka et Boffa. Ceci pourrait en partie être expliqué par l'existence d'autres facteurs dans ces foyers induisant l'expression d'*APOL1* et qui sont influençant dans l'analyse. Au contraire, dans un contexte épidémiologique où l'expression d'*APOL1* est plus faible dans la population (Forécariah) le statut vis à vis de l'infection demeure une variable qui reste significativement associée à l'expression de ce gène ($p=0,012$), les SERO TL⁺ (25.7 ± 1.7) et trypanosomés (24.1 ± 1.7) présentant les plus forts niveaux d'expression en comparaison des contrôles endémiques non infectés (18.4 ± 2.3).

Tableau IX : Analyse multivariée par régression linéaire de l'effet de la parasitémie sanguine (1-) et du statut clinique (2-) sur l'expression d'APOL1 en fonction du foyer.

Effets testés	Dubréka/Boffa		Forécariah	
	APOL1 ¹	p-value	APOL1	p-value
1- Parasitémie sanguine				
Nb de trypanosomes : 0-1	31.4		24.1	
> 1	36.1	0.244	-	ND ²
Age ³	-	0.202	-	0.362
2- Diversité clinique				
Statut HAT : Contrôles	29.5		18.4	
HAT & SERO TL+	30.9	0.545	24.7	0.012⁴
Age	-	0.046	-	0.982

L'analyse a été réalisée par régression linéaire, selon la méthode des moindres carrés en utilisant la quantification relative d'APOL1 comme variable à expliquer et 1- le nombre de trypanosomes observés dans le collecteur de la mini-colonne lors du diagnostic (analyse effectuée chez les trypanosomés uniquement) et 2- le statut clinique (incluant tous les individus). L'analyse a été réalisée indépendamment pour le foyer Dubréka/Boffa (n=141) et le Foyer de Forécariah (n=58).

¹ moyenne des niveaux d'expression d'APOL1 (fold change)

² Non déterminé

³ L'âge a été inclus dans toutes les analyses en tant que variable quantitative

⁴ Les individus HAT et SERO TL⁺ ont été regroupé car ils ne présentaient pas de différences significatives de niveau d'expression d'APOL1. Des résultats similaires sont observés lorsque l'analyse est réalisée en trois classes (p=0.03 à Forécariah; p=0.49 à Dubréka/Boffa).

Quatrième partie : Discussion

Dans l'épidémiologie de la THA, l'une des caractéristiques frappantes est l'existence d'individus affichant des réponses CATT élevées sans que les parasites ne puissent être mis en évidence. En effet, des questions demeurent toujours autour de ces sujets ici appelés SERO : (i) sont – ils des faux positifs au CATT (par exemple dus à des réactions croisées)? (ii) sont – ils infectés par des trypanosomes mais avec une parasitémie inférieure au seuil de détection des tests parasitologiques disponibles? (iii) Sont – ils en mesure de contrôler l'infection ? (iv) Quel est leur rôle potentiel dans la transmission du parasite et le maintien de la THA en zone d'endémie ?(v) Quelle est la nature de leur réponse immunitaire contre les trypanosomes? Ce travail de thèse réalisé dans les foyers actifs de la THA du littoral guinéen (Dubreka, Boffa et Forécariah) se proposait d'apporter des éléments de réponses à toutes ses questions qui doivent permettre d'assurer une meilleure connaissance et un meilleur contrôle de la THA et soutenir le processus d'éradication. Il avait pour objectif de : (i) caractériser en zone d'endémie la diversité clinique résultant de l'infection par *T. b. gambiense* en combinant à la fois des suivis dans le temps et l'utilisation d'outils diagnostiques plus sensibles et plus spécifiques que ceux utilisés sur le terrain, et de (ii) caractériser les réponses de l'hôte vis à vis des trypanosomes dans les différentes catégories d'individus rencontrés sur le terrain par l'évaluation de la réponse immune (dosage de cytokines) et l'expression des gènes du TLF en particulier *APOL1* dans le compartiment sanguin.

Notre discussion, s'articulera autour de 3 parties. Nous discuterons dans la première partie des résultats de l'étude épidémiologique dans le foyer de Forécariah et sur l'ensemble des foyers du littoral guinéen. La quantification d'*APOL1* et le lien entre les différents phénotypes cliniques de la THA seront discutés dans la deuxième partie, et dans la troisième partie nous discuterons des résultats de l'étude immunologique. Enfin nous terminerons cette quatrième partie par la conclusion, les perspectives et les recommandations qui découlent de ces travaux de thèse.

I. Discussion des résultats de l'étude épidémiologique dans le Foyer de Forécariah et sur l'ensemble des foyers du littoral guinéen

I.1. Epidémiologie de la THA dans le foyer de Forécariah

Les résultats des prospections médicales menées entre Novembre 2007 et Avril 2010 montrent une prévalence globale de 2,4 cas de THA pour 1 000 habitants indicative d'une transmission faible ou modérée dans le foyer de Forécariah. De tels foyers devraient devenir plus fréquents avec les campagnes d'élimination de la THA conduites en Afrique subsaharienne (Simarro *et al.*, 2008; Brun *et al.*, 2010) et il apparaît donc important dans ce contexte de caractériser les facteurs qui pourraient favoriser le maintien de la THA en vue d'élaborer des stratégies pour le contrôle ou l'élimination durable de la THA dans ces foyers. A Forécariah, la THA semble être regroupée dans certaines zones de la mangrove, la population active (15-49 ans) étant de loin la plus touchée. Ces résultats suggèrent que dans ce foyer, la transmission ne se produit pas dans l'espace péri-domestique, mais plutôt au cours des activités humaines, notamment celles se déroulant dans la mangrove. Conformément à ce point de vue, l'analyse de la mobilité quotidienne de la population dans le foyer de Forécariah a montré que les trypanosomés avaient plusieurs sites de travail dans la mangrove par rapport aux contrôles appariés (Courtin *et al.*, 2010). De façon intéressante, la distribution de la THA et des SERO étaient assez similaires tant à l'échelle géographique qu'en fonction des classes d'âge, suggérant que certains déterminants sont communs à ces deux classes d'individus, notamment l'exposition aux mouches infectées. Les glossines étant présentes partout dans la zone de mangrove, ces résultats suggèrent que la transmission du parasite ne se produit que dans certaines zones spécifiques et limitées. La lutte anti-vectorielle ciblée dans ces zones pourrait donc avoir un impact important sur la réduction de la transmission de *T. b. gambiense* dans le foyer de Forécariah.

I.2. Spécificités du diagnostic et du traitement

Une des spécificités du foyer de Forécariah réside dans les caractéristiques du diagnostic. En effet, 22% seulement des trypanosomés étaient positifs à la mAECT alors que tous étaient positifs à l'examen microscopique du suc ganglionnaire. Cette observation indique que la parasitémie à Forécariah est inférieure à celle observée dans les autres foyers

de THA en Afrique de l'Ouest (Camara *et al.*, 2005; Njiokou *et al.*, 2010). Celle-ci pourrait être liée à des différences de virulence ou de tropisme tissulaire des trypanosomes de ce foyer. Récemment nous avons montré dans une autre étude que la sensibilité de la mAECT pouvait être augmentée de 5 fois en utilisant le buffy coat à la place du sang (Camara *et al.*, 2010). L'application de cette nouvelle procédure devrait donc augmenter la sensibilité du diagnostic dans de telles zones. Une prédominance des trypanosomés en deuxième phase (84%) a été également observée. Cette observation pourrait être liée au fait que les niveaux de transmission sont actuellement faibles dans ce foyer et donc que les infections récentes sont peu nombreuses. Une hypothèse alternative cependant est que les trypanosomes de ce foyer pourraient induire des infections avec une atteinte rapide du système nerveux central. Nous n'avons pas observé d'échecs au traitement dans le cadre de cette étude quelque soit le schéma thérapeutique utilisé par le PNLTHA/Guinée. En Guinée, les trypanosomés en phase 2 précoce sont traités à la pentamidine afin de réduire significativement le risque d'encéphalopathie arsenicale réactive et réduire la mortalité associée à l'utilisation de l'arsobal. Cette stratégie s'est montrée efficace dans plusieurs études (Doua *et al.*, 1996; Stanghellini et Josenando, 2001) alors que d'autres études ont rapporté une relation significative entre une cytorachie élevée dans le LCR (11-20 cellules/ μ l) et le risque de rechute (Ruiz *et al.*, 2002; Lejon *et al.*, 2003). Nos résultats suggèrent que le traitement des trypanosomés en phase 2 précoce à la pentamidine en Guinée, notamment dans le foyer de Forécariah est une alternative efficace à l'arsobal. Cependant, ces résultats doivent être confirmés sur une plus grande cohorte de trypanosomés. Ce problème devrait toutefois être bientôt résolu du fait que le traitement par le NECT, qui est moins toxique (Priotto *et al.*, 2009), a été approuvé maintenant en Guinée et doit se mettre en place.

I.3. Séropositifs et trypanotolérance humaine

Un aspect important de ma thèse a été de mieux caractériser les SERO apparemment aparasitémique avec des titres CATT élevés et qui constituent une grande proportion des sujets trouvés pendant les prospections médicales (dans le foyer de Forécariah, la moitié des sujets avec des titres CATT plasma $\geq 1/8$ étaient négatifs aux tests parasitologiques). L'application de la TL a montré que plus de la moitié de ces SERO (19/31) a été en contact avec *T. b. gambiense*. La positivité du CATT chez les SERO TL⁻ pourrait être attribuée à des réactions croisées avec d'autres infections comme en témoigne la décroissance rapide des titres CATT chez ces individus. Au contraire, et à la différence des patients après traitement,

chez lesquels une diminution rapide des réponses CATT était associée à une disparition de l'ADN parasitaire dans le sang, la plupart des SERO TL⁺ ont maintenu des titres CATT élevés tout au long de leur suivi (30 mois pour le plus long suivi). Par ailleurs, de l'ADN parasitaire a été détecté au moins une fois au cours de leur suivi, chez la moitié d'entre eux, suggérant ainsi que des infections latentes caractérisées par des faibles parasitémies se produisent chez les SERO TL⁺ et sont responsables du maintien des réponses sérologiques observées. Ces SERO TL⁺ n'ont généralement pas rapporté de symptômes cliniques plus que les contrôles à l'exception d'adénopathies cervicales présentes chez 42,1% d'entre eux, suggérant encore une fois la présence d'une infection subclinique chez ces individus. Parmi les SERO TL⁺, 4 ont développé la THA pendant leur suivi. Ceci est en accord avec l'hypothèse que les SERO TL⁺ sont effectivement infectés par *T. b. gambiense* et peuvent donc être considérés comme des porteurs asymptomatiques de parasite. Il est intéressant de noter également que de l'ADN parasitaire de ces sujets a pu être génotypé à plusieurs loci microsatellites et clairement identifié comme du *T. b. gambiense* groupe 1, avec des génotypes similaires à ceux observés chez les malades (Kabore *et al.*, 2011a). Ils constituent de ce fait, une bonne illustration de l'impact que les SERO TL⁺ peuvent avoir dans le maintien de la transmission de la THA dans certaines zones endémiques, alors que les campagnes nationales de lutte contre la THA ne ciblent que les trypanosomés uniquement.

Nos résultats suggèrent fortement qu'au moins une partie des SERO, les SERO TL⁺, sont de potentiels porteurs asymptomatiques de parasites et confirment l'intérêt de la trypanolyse en tant qu'outil diagnostique (Jamonneau *et al.*, 2010). Ces résultats suggéraient par ailleurs, l'existence d'un phénotype de trypanotolérance chez l'homme (capacité à contrôler voir à éliminer l'infection), comme cela a pu être démontré chez les animaux (Kemp *et al.*, 1996; Hanotte *et al.*, 2003). En étendant notre étude à l'ensemble des foyers du littoral guinéen (Dubreka et Boffa), nous avons pu montrer que les SERO TL⁺ formaient un groupe hétérogène et se répartissaient en trois grands groupes : (i) les SERO TL⁺ qui développent la THA dans les mois qui suivent leur diagnostic initial, (ii) les SERO TL⁺ qui affichent une décroissance des titres CATT plasma dans le temps, individus chez lesquels on peut donc soupçonner une « élimination » spontanée de l'infection et (iii) les SERO TL⁺ qui maintiennent des titres CATT plasma élevés sur de longues périodes sans développer la maladie, que l'on soupçonne d'être en mesure de contrôler l'infection.

Dans les trois foyers du littoral guinéen, des différences sont observées aussi bien en terme de proportions des malades dans les différentes phases de la maladie (précoce, avancée)

que de proportions des différentes catégories d'individus SERO TL⁺. Le foyer de Boffa est caractérisé par une proportion élevée de trypanosomés en phase 1 et une proportion faible de SERO TL⁺ développant la maladie (SERO TL⁺/T⁺). A l'inverse, la majorité des trypanosomés du foyer de Forécariah (où les prévalences de la maladie sont les plus faibles) sont dépistés en seconde phase et la majorité des SERO TL⁺ maintiennent des réponses CATT élevées dans le temps. Une situation intermédiaire est observée à Dubréka. Bien que ces différences puissent en partie être attribuables à des différences de virulence/pathogénicité des souches circulant dans ces foyers, elles peuvent également provenir de particularités temporelles de l'évolution de ces différents foyers. Sur la base de ces observations, nous proposons le schéma suivant pour décrire l'évolution d'un foyer de THA dans le temps (**figure 35**). Au début de l'épidémie, la transmission est intense et le nombre d'individus récemment infectés est important : la majorité des trypanosomés sont dépistés en première phase. Avec le temps, vont apparaître les trypanosomés dans le deuxième stade (témoignant d'infections plus anciennes). Le dépistage/traitement, mené dans ces zones par les PNLTHA contribue à réduire la transmission en réduisant le réservoir humain de trypanosomes. Les infections récentes se faisant plus rares, on ne détecte par la suite dans ces foyers qu'essentiellement des malades en deuxième phase avancée. A l'inverse, les SERO TL⁺ qui maintiennent de fortes réponses sérologiques, s'accumulent dans le temps et deviennent majoritaires. Ces individus que l'on suspecte fortement d'être des porteurs asymptomatiques de trypanosomes contribuent au maintien d'une transmission à bas bruit malgré les efforts de lutte engagés. Dans cette hypothèse, le foyer de Boffa semble être plus récent et caractérisé par des niveaux de transmission plus intenses. A l'inverse, on peut penser que le foyer de Forécariah représente un modèle de vieux foyer, où la transmission n'est plus très intense, mais comporte de nombreux individus avec des infections asymptomatiques. Il est intéressant de noter que des situations similaires (fort pourcentage d'individus séropositifs, mais peu de malades) sont actuellement observées dans le centre ouest de la Côte d'Ivoire (Kaba *et al.*, 2006) et dans les foyers de Campo et Fontem au Cameroun (Simo *et al.*, 2006; Njiokou *et al.*, 2010), des foyers actifs dans les années 1990-2000 où d'importantes activités de lutte médicale ont permis de faire fortement baisser les prévalences.

L'hypothèse selon laquelle les individus SERO TL⁺ constituerait un réservoir humain de trypanosome est par ailleurs soutenue par une étude de génétique de populations. Cette étude a montré que la taille effective des populations de trypanosomes, calculée à partir de parasites isolés chez les malades, était supérieure aux prévalences de la THA observées,

suggérant ainsi la présence d'un réservoir de parasites non détecté lors des prospections médicales (Koffi *et al.*, 2009). Au vue de ces résultats, il parait important d'associer aux campagnes de dépistage actif, des mesures de lutte anti-vectorielles pour aboutir à un contrôle durable de la THA dans ces foyers. Ces mesures semblent appropriées et devraient constituer un minimum, notamment lorsque le coût des prospections médicales devient trop important par rapport au nombre de cas dépistés.

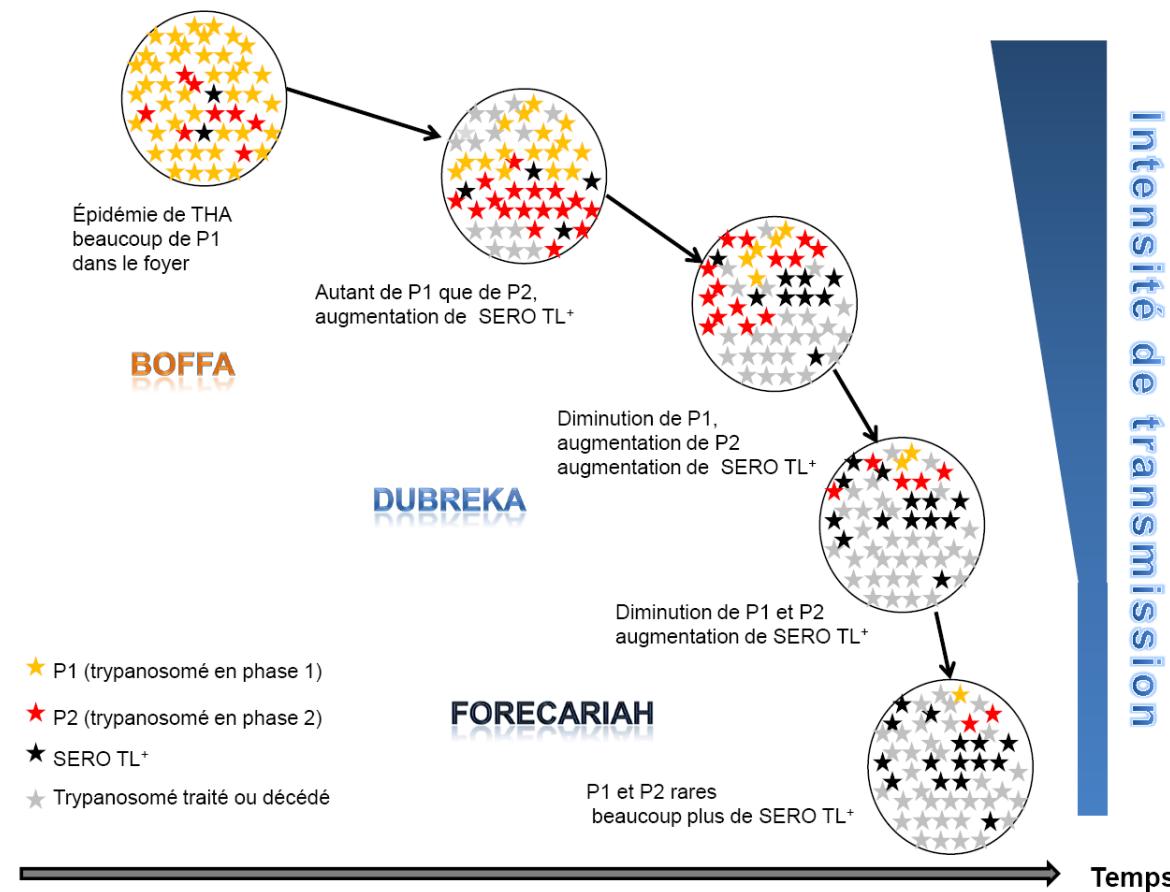


Figure 35 : Evolution d'un foyer de THA

II. Quantification d'*APOL1* et le lien entre les différents phénotypes clinique de la THA.

Un intérêt croissant est porté à *APOL1* dans les trypanosomoses humaines ces dernières années (Genovese *et al.*, 2010). Dans cette thèse nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle une forte expression d'*APOL1* (molécule trypanocide) serait associée à un meilleur contrôle de la multiplication parasitaire. Les résultats de cette étude montrent que l'expression d'*APOL1* dans les populations humaines apparaît donc comme un trait très variable au déterminisme complexe faisant intervenir de nombreux facteurs à la fois de l'environnement et de l'hôte lui même qu'il est nécessaire de prendre en compte dans le cadre de l'étude spécifique de la THA. Les résultats obtenus dans le foyer de Forécariah cependant, sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'infection par *T. b. gambiense* induit une surexpression d'*APOL1* chez son hôte, induction qui n'est visible que dans un contexte où les niveaux d'*APOL1* sont faibles dans la population. Les niveaux d'expression d'*APOL1* ne semblent toutefois pas associés à la résistance/susceptibilité à l'infection : aucune différence n'ayant été observée en fonction des stades de la maladie ou de la densité parasitaire chez les malades ou entre les individus SERO TL⁺ suspectés d'être en mesure de contrôler l'infection à bas bruit et les trypanosomés. Une importante limitation dans notre étude cependant qui empêche de tirer des conclusions définitives sur ce point est de n'avoir quantifié que l'expression d'*APOL1*. En effet, l'association d'*APOL1* avec l'HPR est nécessaire pour permettre son internalisation dans les trypanosomes via le récepteur parasitaire HpHbr. Il est donc possible qu'un effet de l'expression d'*APOL1* sur le contrôle de l'infection nécessite la présence d'HPR en quantité non limitante. La prise en compte par ailleurs des concentrations plasmatiques en triglycérides et cholestérol devrait permettre d'améliorer la pertinence des études prochaines. Comme perspective, nous envisageons de poursuivre l'étude de l'expression des gènes du TLF en quantifiant l'HPR afin d'avoir des résultats plus complets sur l'expression des gènes du TLF et de leur association avec les différents phénotypes cliniques de la THA. Dans le cadre de cette étude nous prévoyons également d'effectuer un dosage plasmatique des triglycérides et du cholestérol afin de pouvoir prendre en compte ces données dans les analyses statistiques. Par ailleurs, il a été suggéré récemment que certains polymorphismes du gène *APOL1*, vraisemblablement sélectionnés en Afrique et situés dans le domaine d'interaction avec la protéine SRA, pourraient protéger contre *T. b. rhodesiense* mais non *T. b. gambiense* (Genovese *et al.*, 2010). Des séquençages complémentaires sont donc

nécessaires pour identifier les polymorphismes du gène *APOL1* dans les populations africaines vivant en zone d'endémie à *T. b. gambiense* afin de tester leur association avec la susceptibilité de la THA à *T. b. gambiense*.

III. Discussion des résultats de l'étude immunologique

III.1. Dans le LCR, IL-10, IL-8 et IL-6 sont des marqueurs de la deuxième phase avancée.

Dans le LCR, les résultats obtenus sur les trypanosomés dans les différentes phases de la maladie sont en conformité avec ceux d'études précédentes menées dans d'autres foyers de maladie du sommeil à *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*. De fortes concentrations d'IL-10 d'IL-8 et d'IL-6, retournant à la normale après traitement, sont observées chez les patients en P2a comme cela a déjà été observé chez les patients de la République Démocratique du Congo (Lejon *et al.*, 2002). Ces concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et IL-6 ou ayant au contraire des propriétés anti-inflammatoires (IL-10) sont le résultat de la méningo-encéphalique chronique qui s'installe dans ce compartiment en réaction au passage de la barrière hémato-méningée et à la multiplication des trypanosomes dans le LCR (Anthoons *et al.*, 1989; Quan *et al.*, 1999). Ces résultats sont en ligne avec la proposition d'utiliser ces cytokines ou autres molécules intervenant dans la réponse neuro-inflammatoire : CCL2, CCL3 (Courtieux *et al.*, 2006), CXCL10 (Hainard *et al.*, 2009), MMP9, ICAM1 (Hainard *et al.*, 2011); β 2 microglobuline, Osteopotin (Tiberti *et al.*, 2010) comme outils de diagnostic de phase comme alternative à la cytorachie actuellement utilisée.

En comparaison avec les contrôles endémiques, des concentrations plasmatiques très significativement plus élevées ($p \leq 0.0001$) d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10, d'IL-1 β et dans une moindre mesure d'IFN- γ ($p = 0.01$) ont été observées chez les individus trypanosomés. Ces résultats, également en accord avec les études précédentes (Rhind *et al.*, 1997; MacLean *et al.*, 2001; Courtin *et al.*, 2006b), sont en faveur du développement chez les trypanosomés d'une réponse acquise de type T présentant des profils mixte TH1 et TH2. Contrairement au LCR, les niveaux de ces cytokines dans le plasma apparaissent peu corrélés avec la phase de la maladie (Lejon *et al.*, 2002; Courtieux *et al.*, 2006) à l'exception de l' IL-1 β , pour laquelle une tendance à être présente plus fortement dans les phases neurologiques de la maladie a été observée dans cette étude. Certaines études ont cependant permis de mettre en évidence des

corrélations entre les niveaux de TNF- α , dans la THA à *T.b. gambiense* (Okomo-Assoumou *et al.*, 1995) et d'INF- γ dans la THA à *T.b. rhodesiense* (Maclean *et al.*, 2007) et la sévérité de la maladie. Ces différences peuvent en partie s'expliquer par la faiblesse de notre échantillon pour cette analyse (P1, n=10, P2p, n=19, P2a, n=23) ou par des différences liées, soit à des polymorphismes immunologiques des populations humaines vivant sur le littoral guinéen ou à des souches de trypanosomes particulières circulant dans les foyers de mangrove en Guinée (Koffi *et al.*, 2009). En effet il a été montré pour *T.b. rhodesiense* que des trypanosomes géographiquement et génétiquement distincts induisaient chez les patients des réponses contrastées, notamment au niveau de la production d'IFN- γ (Maclean *et al.*, 2007).

III.2. Inflammation, immunité innée et contrôle de l'infection

La principale originalité de l'étude immunologique, réside dans l'inclusion, le suivi et la caractérisation de la réponse immune chez les individus SERO TL⁺. Ces individus qui présentent de fortes réponses sérologiques, spécifiques de *T.b. gambiense* mais qui sont négatifs au tests parasitologiques réalisés sur le terrain, sont fortement suspectés d'être capables de contrôler naturellement l'infection (Garcia *et al.*, 2002; Bucheton *et al.*, 2011; Ilboudo *et al.*, 2011) à l'instar des bovins trypanotolérants dans la trypanosomose animale (Kemp *et al.*, 1996; Hanotte *et al.*, 2003). Cette étude, montre pour la première fois que dans le plasma, le profil cytokinique observé chez ces individus est très contrasté, à la fois par rapport aux contrôles endémiques mais surtout par rapport aux trypanosomés (**figure 30**). A l'exception de l'IL-10 qui était significativement plus élevée à la fois chez les malades et les SERO TL⁺, le profil cytokinique des SERO TL⁺ se caractérise par de faibles niveaux de cytokines produites par la réponse cellulaire de type T (IL-2, IL-4) et une quasi absence d'IL-12, une cytokine jouant un rôle majeur dans l'établissement des réponses à médiation cellulaires. A l'inverse des trypanosomés, les individus SERO TL⁺, se caractérisent par une réponse inflammatoire marquée avec des concentrations élevées d'IL-8, d'IL-6 et de TNF- α . Le statut SERO TL⁺ est donc associé à une réponse inflammatoire en partie indépendante d'une réponse de type TH1, comme en témoigne l'absence d'IL-12, et résulte donc plus probablement d'une activation efficace de l'immunité innée par les trypanosomes (Magez *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2011) L'analyse pas à pas par régression logistique montre que les concentrations d'IL-8 (> 10 pg/ml; OR=9, 86, p=0,0003), d'IL-6 (>3,7 pg/ml; OR=5,93, p=0,0075) et l'absence d'IL-12 (OR=50,51, p≤0,0001) sont les principales variables associées au statut SERO TL⁺. Par ailleurs, chez les SERO TL⁺, les plus fortes concentrations d'IL-10

(>6 pg/ml) et les plus faibles concentrations de TNF- α (<3,7 pg/ml) étaient significativement associées à un risque accru (OR=13,09, p=0,0034 et OR=10,49, p=0,009 respectivement) de développer la THA au cours de leur deux ans de suivi. A l'inverse les fortes concentrations d'IL-8 (> 30 pg/ml, OR=8,32, p=0,0056) étaient fortement associées au groupe des SERO TL⁺ chez qui une négativation du CATT a été observée suggérant que les concentrations élevées de cette cytokine dans le plasma représentent un marqueur d'une réponse immunitaire de l'hôte efficace vis à vis de *T. b. gambiense*, capable de contrôler, voir d'éliminer spontanément l'infection. La principale fonction de l'IL-8 est d'être un puissant chémo-attractant pour les neutrophiles. Ces résultats suggèrent donc que ces cellules, qui jouent un rôle central dans l'immunité innée chez l'homme, jouent un rôle important dans le contrôle voir la résolution naturelle de l'infection à *T. b. gambiense* chez les individus SERO TL⁺. De fortes concentrations d'IL-6 et de TNF- α (**figure 36**) sont également associées au statut SERO TL⁺, c'est-à-dire l'absence de trypanosomes détectables en microscopie. Des études ont montré que les trypanosomes ou des produits parasitaires solubles sont capables d'induire *in-vitro* la production de TNF- α par les macrophages humains, ce dernier ayant par ailleurs des effets lytiques sur les trypanosomes (Magez *et al.*, 1997; Daulouede *et al.*, 2001). Les concentrations élevées de TNF- α chez les SERO TL⁺ pourraient donc en partie expliquer les faibles parasitémies suspectées chez ces individus (Garcia *et al.*, 2002; Ilboudo *et al.*, 2011). Finalement, en plus de son rôle dans l'inflammation, l'IL-6 participe à la maturation des cellules B et augmente la sécrétion d'Immunoglobulines (Ig). Il est donc possible que les fortes concentrations d'IL-6 observées chez les SERO TL⁺ soient associées à une réponse humorale dirigée contre les VSG des trypanosomes plus rapide et intense permettant ainsi un meilleur contrôle des vagues parasitaires résultant de la variation antigénique des trypanosomes (Pays, 2006).

En zone d'endémie, les individus positifs au CATT sans confirmation parasitologique, posent toujours d'importants problèmes aux programmes nationaux de lutte contre la THA et la décision de traiter ou non ces individus demeure empirique surtout en l'absence de traitement non toxique et facile à administrer (Kennedy, 2008). Les résultats obtenus lors de cette étude permettent d'envisager l'utilisation des cytokines comme outil d'aide à la décision thérapeutique concernant ces individus. Si la question de traiter des individus présentant de forte concentration d'IL-8 (qui contrôlent potentiellement l'infection) se pose toujours, il paraît opportun d'initier un traitement pour les individus avec des concentrations élevées d'IL-10 et/ou de faibles niveaux de TNF- α , ces derniers présentant un risque très élevé de

développer des parasitoses détectables dans les mois qui suivent leur diagnostic. Dans cette perspective, des études complémentaires incluant un plus grand nombre d'individus et provenant des différentes zones d'endémie à *T. b. gambiense* sont maintenant nécessaires pour valider ces résultats et mieux déterminer les valeur-seuils des cytokines à considérer.

En dehors des potentielles applications développées ci-dessus, cette étude apporte un éclairage nouveau sur les mécanismes qui permettent le contrôle de l'infection à *T. b. gambiense*. Jusqu' alors l'essentiel des études immunologiques concernant ce point provenait d'études menées chez la souris dans des lignées présentant des différences de susceptibilité à l'infection. Malgré de nombreuses différences en fonction des modèles utilisés, le consensus est que les souris les plus résistantes développent une réponse adaptative de type TH1 avec production d'IFN- γ , de TNF- α et de NO efficace pour contrôler l'infection dans les premiers stades. Par la suite, se met en place progressivement une réponse de type 2 caractérisée notamment par des concentrations élevées d'IL-10, qui permettent de contrôler les effets pathogènes résultants d'une réponse inflammatoire excessive et débouche sur une infection chronique chez ces souris. En revanche, les souris susceptibles succombent rapidement d'un syndrome inflammatoire associé avec une activation excessive des macrophages. Ceci est globalement en accord avec la réponse immune observée chez les patients atteints de THA. Au contraire, le contrôle de l'infection semble essentiellement lié à une forte activation de l'immunité innée, possiblement via l'IL-8 et les neutrophiles et une « down » régulation de la réponse immune adaptative par les lymphocytes T. Contrairement aux modèles murins d'infections, l'immunité innée semble en mesure de contrôler la multiplication parasitaire chez ces individus alors que l'activation de la réponse cellulaire T semble plutôt favorable à la multiplication des trypanosomes. Il est intéressant à ce sujet de noter que cette hypothèse est soutenue par une étude récente menée chez la souris, dans laquelle des conditions d'infections plus naturelles, où peu de trypanosomes sont inoculés de façon intradermique, ont été utilisées. Cette étude a montré que lors de la primo infection, ces souris étaient capables de contrôler l'infection par une réponse innée impliquant à la fois le NO et le TNF- α , et cela, même chez des souris déficientes en cellules B ou RAG2 (Recombination Activating Genes). Par ailleurs, les souris CD1d (cluster of différenciation)^{-/-} et complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe II^{-/-} étaient encore plus résistantes à la primo infection que les souris sauvages. Par contre les auteurs ont pu mettre en évidence une apparition très rapide de cellules T spécifiques des trypanosomes au niveau de la rate chez les souris sauvages suite à l'injection intradermique de parasites. Cette réponse adaptative est capable par la suite

d'inhiber la réponse innée protectrice lors d'un nouveau challenge rendant les souris plus susceptibles à l'infection (Wei *et al.*, 2011).

Si les modèles expérimentaux chez la souris ont permis d'accomplir de grandes avancées dans la compréhension du système immunitaire chez l'homme, il faut cependant garder à l'esprit que (i) ces modèles sont parfois assez éloignés de l'infection humaine (en particulier pour *T. b. gambiense*) et que 65 millions d'années d'évolution ont pu aboutir à des différences significatives entre le fonctionnement du système immunitaire de l'homme et de celui de la souris (Mestas et Hughes, 2004). Au regard des résultats obtenus au cours de cette étude, il est intéressant de noter que l'IL-8 est absente chez la souris et qu'il existe d'importantes différences dans le ratio lymphocytes/neutrophiles, le sang humain étant beaucoup plus riche en neutrophiles (50-70%) que celui de la souris (10-25%). Une autre différence d'importance concerne la famille des peptides anti-microbiens comme les défensines et les cathelelicidines, dont on sait maintenant qu'elles exercent une activité trypanocide (Haines *et al.*, 2003; McGwire *et al.*, 2003; McGwire et Kulkarni, 2010; Harrington, 2011). Les neutrophiles sont une importante source de peptides anti-microbiens chez l'homme alors qu'ils ne sont pas exprimés par les neutrophiles murins (Risso, 2000; Mestas et Hughes, 2004).

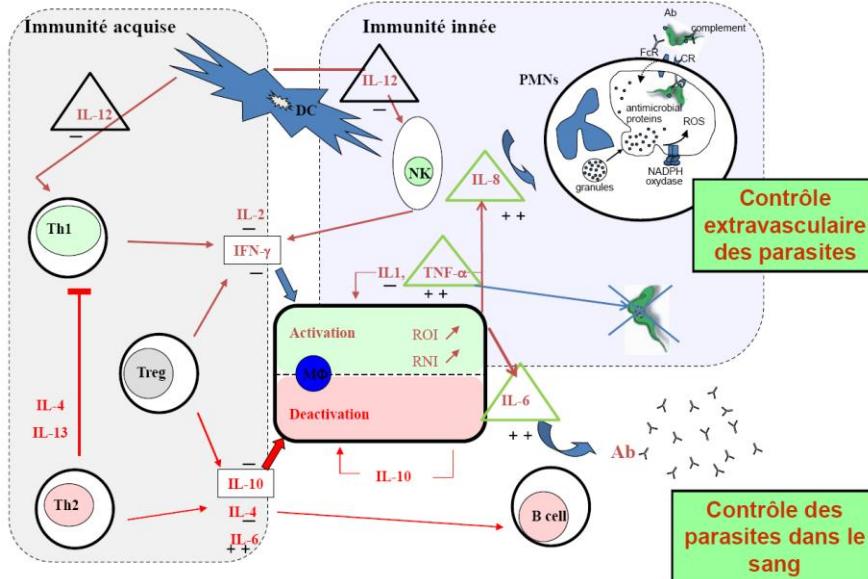


Figure 36 : Mécanisme immunologique du contrôle des trypanosomes chez les SERO TL⁺

Les cytokines caractéristiques des SERO TL⁺ sont celles qui sont inscrites dans les triangles en vert. ++ : cytokines activées chez les SERO TL⁺, - : cytokines désactivées chez les SERO TL⁺. Th1 : cellule T helper 1, Th2 : cellule T helper 2, Treg : cellule T régulatrice, Nk : Natural killer, B cell : cellule B, PMNs : polynucléaires neutrophiles, Ab : antibodies (anticorps).

Conclusion

Cette thèse a permis d'améliorer nos connaissances dans le domaine de la diversité clinique résultant de l'infection par *T. b. gambiense*. En particulier elle a permis de jeter un regard nouveau sur les individus SERO TL⁺ et de développer les outils nécessaires à la caractérisation d'un phénotype de trypanotolérance humaine. Très étudiés dans les modèles animaux, ces phénotypes n'ont encore reçu que très peu d'attention chez l'homme. Les premiers résultats obtenus au cours de cette thèse sont très encourageants. Ils démontrent en effet que la nature de la réponse immune induite par l'infection est très différente entre les SERO TL⁺ et les trypanosomés et suggèrent l'existence de mécanismes de contrôle spécifiques de l'infection humaine impliquant notamment fortement l'immunité innée dirigée contre les trypanosomes. Les cohortes finement caractérisées au cours de ce travail, ainsi que les échantillons d'ARNs sanguins collectés lors de cette étude permettent aujourd'hui d'envisager la réalisation d'étude transcriptomiques et génétiques de la trypanotolérance humaine qui doivent permettre de franchir un nouveau pas dans la connaissance des interactions complexes entre l'hôte-humain et *T. b. gambiense*.

Perspectives

1. Clarification du rôle épidémiologique des individus trypanotolérants

A ce jour, on ne sait pas si les SERO TL⁺ sont infectieux pour les glossines. Cependant, il a été montré que dans les infections chroniques à *T. b. brucei* chez les bovins, où les parasites sont indétectables dans le sang, ces derniers sont toujours infectieux pour les glossines (Van den Bossche *et al.*, 2005). Des études plus récentes ont montré que des glossines (*Glossina morsitans submorsitans*) étaient capables de s'infecter chez des porcs ou des bovins ayant des faibles parasitémies de *T. b. gambiense* ou de *T. congolense*, suggérant que le xénodiagnostic demeure positif même à de très faibles parasitémies (Wombou Toukam *et al.*, 2011). L'utilisation du xénodiagnostic, où des glossines saines d'insectarium seraient gorgées sur des individus SERO TL⁺ pourrait permettre de mieux caractériser le statut parasitologique de ces individus. Cependant ce type d'étude, bien que utilisé pour le diagnostic de la forme chronique de la trypanosomose humaine américaine (maladie Chagas) (Pineda *et al.*, 1998), pose des problèmes d'ordre logistique qu'il sera nécessaire de lever en attendant de pouvoir réaliser ce type d'étude. Nous envisageons en revanche, lors de nos prochaines activités en Guinée, de mener une étude qui va consister à sélectionner 20 SERO TL⁺ maintenant des réponses CATT élevées (forte suspicion d'un contact présent avec le parasite) parmi lesquels 10 seront traités et les 10 autres ne le seront pas. L'observation d'une diminution des titres CATT/pl chez les SERO TL⁺ traités, comme observé chez les trypanosomés après traitement, constituerait une preuve supplémentaire que ces sujets sont effectivement des porteurs asymptomatiques de parasites.

2. Facteurs responsables de la diversité de réponses à l'infection

Dans cette thèse, nous avons pu caractériser de manière précise la diversité de réponses à l'infection et nous avons montré pour la première fois que les SERO TL⁺ affichaient des réponses immunes d'une nature très différente de celles des trypanosomés. Cependant, il faut maintenant rechercher les facteurs responsables impliqués dans le déterminisme de cette réponse. Ils doivent être recherchés chez le parasite (variabilité génétique) et chez l'hôte (variabilité individuelle). Concernant le parasite, les études utilisant les marqueurs microsatellites n'ont pas pu mettre en évidence de corrélation entre la diversité

parasitaire et la diversité d'évolutions cliniques résultant de l'infection par les trypanosomes (Kabore *et al.*, 2011b). Bien que la variabilité génétique de *T. b. gambiense* soit bien caractérisée, son impact réel sur la variabilité clinique de l'infection naturelle observée chez l'homme n'est pas connu à ce jour. Des études ont cependant montré que des souches, présentant chez la souris des phénotypes extrêmes, étaient très différentes (bien que génétiquement semblables avec les marqueurs utilisés) du point de vue de la composition de leur secrétome (protéines récupérées dans les surnageants de culture). Ces molécules sécrétées par les trypanosomes semblent jouer un rôle important dans l'interaction hôte-parasite chez *T. b. gambiense* par leur action modulatrice sur la réponse immune (Holzmuller *et al.*, 2008). De ce fait il serait donc important d'approfondir ce genre d'étude afin de rechercher des corrélations entre diversité parasitaire et diversité de réponses à l'infection.

Quant à l'hôte, plusieurs arguments issus d'observation de terrain (Garcia *et al.*, 2006) sont en faveur de l'existence d'une composante génétique contrôlant la susceptibilité individuelle au développement de la maladie. Les modèles expérimentaux murins et bovins, au cours desquels l'hôte, l'agent pathogène et les circonstances mêmes de l'infection peuvent être parfaitement contrôlés, ont permis d'étudier les principaux mécanismes de résistance/susceptibilité à l'infection par les trypanosomes au travers d'approches globales (génétiques et/ou transcriptomiques) menées sur l'ensemble du génome. Au contraire, beaucoup moins d'études sont disponibles chez l'homme et sont toutes basées sur une approche gènes candidats. Il est cependant important de noter que en accord avec les résultats présentés dans cette thèse, les rares études existantes (Courtin *et al.*, 2006a; Courtin *et al.*, 2007) ont mis en évidence des associations génétiques entre des polymorphismes des gènes *IL6* en RDC et des gènes du *TNF-α* et de l'*IL10* en Côte d'Ivoire et la susceptibilité à la THA. Ces résultats suggèrent que des variations génétiques dans certains éléments clefs de la réponse immune pourraient contribuer à la diversité clinique observée en réponse à l'infection par *T. b. gambiense*.

Bien que les études immunologiques aient permis de montrer que les SERO TL⁺ affichent une réponse immune contrastée par rapport aux trypanosomés, l'étude des cytokines ne permet d'avoir qu'une vue très générale et partielle des mécanismes biologiques ou immunologiques mis en jeux dans l'infection. Dans le but de progresser dans la compréhension de l'interaction complexe entre l'homme et les trypanosomes et d'identifier les mécanismes de l'immunité qui permettent de contrôler naturellement l'infection, nous envisageons de :

➤ **Caractériser de manière fine la réponse observée chez les trypanosomés et chez les SERO TL⁺ par une approche transcriptomique.**

Les ARNs extraits du sang et caractéristiques de la diversité de réponses à l'infection à *T. b. gambiense* (HAT P1, HAT P2p, HAT P2a, SERO TL⁺/T⁺, SERO/CATT <1/8, SERO/CATT ≥1/8) sont en cours d'analyses au moyen de microarray. Nous rechercherons par cette approche (i) à identifier des marqueurs de phase de la THA dans le compartiment sanguin, (ii) à identifier des bio-marqueurs pronostiques du développement de la THA et (iii) à mettre en évidence les principales voies métaboliques mis en jeux dans le contrôle ou non de l'infection.

➤ **Evaluer l'impact des facteurs génétiques de l'hôte dans le déterminisme de la diversité clinique de la THA**

Analyse des gènes candidats mis en évidence par l'approche transcriptomique

L'expression des gènes différentiellement exprimés entre les SERO TL⁺ et les trypanosomés mis en évidence par les microarray sera évaluée par RT-QPCR sur l'ensemble des ARNs extraits lors des prospections médicales. Ceci devrait permettre (i) d'infirmer/confirmer l'importance de ces gènes dans différents contextes épidémiologiques. Les gènes confirmés seront sélectionnés pour les études d'association génétique.

Etude d'association génétique

L'objectif de cette étude sera d'évaluer si des polymorphismes des gènes candidats identifiés par microarray et confirmés par RT-QPCR sont associés aux différents phénotypes cliniques de la THA et/ou aux niveaux d'expression génique. L'échantillonnage (trypanosomés, SERO TL⁺ et contrôles appariés) que nous avons pu constituer dans le cadre de cette thèse permettra d'évaluer l'association génétique de nos gènes candidats par comparaison des fréquences alléliques ou génotypiques dans ces différents groupes.

Recommandations

1. Pour la recherche thérapeutique

A l'heure actuelle, l'essentiel des efforts dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules ou combinaisons thérapeutiques est ciblé sur le traitement des patients en phase neurologique avancée. Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent fortement la nécessité de développer des traitements oraux, non toxiques, actifs contre les trypanosomes en périphérie (sang, lymph) qui permettraient le traitement systématique des individus SERO TL⁺. De telles molécules, qui n'ont pas besoin de franchir la barrière hémato-pharyngée semblent plus accessibles que celles nécessaires au traitement des phases avancées. Le traitement des SERO TL⁺ pourrait donc permettre : (i) au niveau individuel, de rompre la progression de la maladie et d'éviter ainsi le recours ultérieur à des traitements plus dangereux et couteux, (ii) au niveau collectif et dans les perspectives d'une stratégie de lutte durable et/ ou d'un processus d'élimination de la THA, d'éliminer des réservoirs humains qui contribueraient au maintien de la transmission.

2. Aux PNLTHA

En attendant que des décisions soient prises concernant le traitement des SERO TL⁺ et au regard des résultats obtenus dans cette thèse, nous recommandons au PNLTHA :

(i) d'effectuer un suivi actif et régulier des SERO TL⁺ sur une durée d'au moins 2 ans en effectuant les tests tous les six mois, car parmi les SERO TL⁺ devenus malades, l'un a été trouvé malade après 6 mois de suivi, et la majorité après 12 mois de suivi (**figure 25-a**). En effet le suivi des SERO TL⁺ est très important car il va permettre de dépister la partie de ces individus qui deviendra trypanosomé (SERO TL⁺/T⁺). Le suivi à domicile de ces sujets ainsi que des trypanosomés traités est également important car il permet de gagner la confiance de la population locale et à risque (à proximité des sujets infectés) et de dépister de nouveaux trypanosomés qui n'étaient pas présents lors des prospections médicales classiques. Cette stratégie de suivi actif ciblant les zones et populations à risque avec des petites équipes mobiles de proximité, pourrait être un complément à la procédure classique de dépistage actif par prospection médicale exhaustive (très onéreuse et qui lasse les populations), sans oublier la lutte anti-vectorielle.

(ii) en l'absence de recommandations claires pour le traitement des SERO TL⁺, nous conseillons également au PNLTHA de mettre en place des stratégies de contrôle des populations de glossines dans les lieux de vie des SERO et des trypanosomés (Courtin *et al.*, 2010) afin de réduire les risques de transmission dans ces zones où la présence de mouches infectées et d'un réservoir de parasites sont suspectés.

Bibliographie

- Abel, L., Demenais, F., Prata, A., Souza, A.E., Dessein, A., 1991. Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am J Hum Genet* 48, 959-970.
- Abel, L., Casanova, J.L., 2010. Human genetics of tuberculosis. *Bull Acad Natl Med* 194, 943-950.
- Anthoens, J.A., Van Marck, E.A., Gigase, P.L., Stevens, W.J., 1989. Immunohistochemical characterization of the mononuclear cells in the brain of the rat with an experimental chronic *Trypanosoma brucei gambiense* infection. *Parasitol Res* 75, 251-256.
- Authié, E., Cuisance, D., Force-Barge, P., Frezil, J.L., Gouteux, J.P., Jannin, J., Lancien, J., Laveissière, C., Lemesre, J.L., Mathieu-Daudé, F., Nitcheman, S., Noireau, F., Penchenier, L., Tibayrenc, M., Truc, P., 1991. Some new prospects in epidemiology and fight against human african trypanosomiasis. *Res Rev Parasitolo* 51 (1-4), 29-46.
- Authié, E., Bringaud, F., Bakalara, N., Tetaud, E., Baltz, T., 1999. Trypanosomoses humaines et animales: maladie du sommeil et Nagana. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 10, 27-50
- Baetselier, P.D., Namangala, B., Noel, W., Brys, L., Pays, E., Beschin, A., 2001. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomosis. *Int J Parasitol* 31, 575-587.
- Bailey, J.W., Smith, D.H., 1992. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 630.
- Balmer, O., Beadell, J.S., Gibson, W., Caccone, A., 2011. Phylogeography and taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e961.
- Barbier, M., Delahaye, N.F., Fumoux, F., Rihet, P., 2008. Family-based association of a low producing lymphotoxin-alpha allele with reduced *Plasmodium falciparum* parasitemia. *Microbes Infect* 10, 673-679.
- Berberof, M., Perez-Morga, D., Pays, E., 2001. A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol Biochem Parasitol* 113, 127-138.
- Berthier, D., Chantal, I., Thevenon, S., Sakande, H., Maillard, J.C., Bengaly, Z., Piquemal, D., Marti, J., Cuny, G., 2008. Study of bovine trypanotolerance by whole transcriptome analysis. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 71-76.
- Borst, P., Rudenko, G., 1994. Antigenic variation in African trypanosomes. *Science* 264, 1872-1873.

Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C., 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375, 148-159.

Bucheton, B., Abel, L., Kheir, M.M., Mirgani, A., El-Safi, S.H., Chevillard, C., Dessein, A., 2003. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun* 4, 104-109.

Bucheton, B., MacLeod, A., Jamonneau, V., 2011. Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Parasite Immunol* 33, 438-447.

Burgner, D., Jamieson, S.E., Blackwell, J.M., 2006. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis* 6, 653-663.

Buscher, P., Draelants, E., Magnus, E., Vervoort, T., Van Meirvenne, N., 1991. An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 71, 267-273.

Buscher, P., Mumba Ngoyi, D., Kabore, J., Lejon, V., Robays, J., Jamonneau, V., Bebronne, N., Van der Veken, W., Bieler, S., 2009. Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e471.

Camara, M., Kaba, D., KagbaDouno, M., Sanon, J.R., Ouendeno, F.F., Solano, P., 2005. [Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea: epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas]. *Med Trop (Mars)* 65, 155-161.

Camara, M., Camara, O., Ilboudo, H., Sakande, H., Kabore, J., N'Dri, L., Jamonneau, V., Bucheton, B., 2010. Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health* 15, 796-799.

Campillo, N., Carrington, M., 2003. The origin of the serum resistance associated (SRA) gene and a model of the structure of the SRA polypeptide from *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol* 127, 79-84.

Castellani, A., 1903. Some Observations on the Morphology of the *Trypanosoma* Found in Sleeping Sickness. *Br Med J* 1, 1431-1432.

Cattand, P., Miezan, B.T., de Raadt, P., 1988. Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull World Health Organ* 66, 83-86.

Cattand, P., Jannin, J., Lucas, P., 2001. Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Trop Med Int Health* 6, 348-361.

Cecchi, G., Paone, M., Franco, J.R., Fevre, E.M., Diarra, A., Ruiz, J.A., Mattioli, R.C., Simarro, P.P., 2009. Towards the Atlas of human African trypanosomiasis. *Int J Health Geogr* 8, 15.

Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., Buscher, P., 2005. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 18, 133-146.

Checchi, F., Filipe, J.A., Barrett, M.P., Chandramohan, D., 2008. The natural progression of *Gambiense* sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS Negl Trop Dis* 2, e303.

Claes, F., Buscher, P., Touratier, L., Goddeeris, B.M., 2005. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? *Trends Parasitol* 21, 316-321.

Clayton, C.E., 1978. *Trypanosoma brucei*: influence of host strain and parasite antigenic type on infections in mice. *Exp Parasitol* 44, 202-208.

Courtin, D., Argiro, L., Jamonneau, V., N'Dri, L., N'Guessan, P., Abel, L., Dessein, A., Cot, M., Laveissiere, C., Garcia, A., 2006a. Interest of tumor necrosis factor-alpha -308 G/A and interleukin-10 -592 C/A polymorphisms in human African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol* 6, 123-129.

Courtin, D., Jamonneau, V., Mathieu, J.F., Koffi, M., Milet, J., Yeminanga, C.S., Kumeso, V.K., Cuny, G., Bilengue, C.M., Garcia, A., 2006b. Comparison of cytokine plasma levels in human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* 11, 647-653.

Courtin, D., Milet, J., Jamonneau, V., Yeminanga, C.S., Kumeso, V.K., Bilengue, C.M., Betard, C., Garcia, A., 2007. Association between human African trypanosomiasis and the IL6 gene in a Congolese population. *Infect Genet Evol* 7, 60-68.

Courtin, D., Berthier, D., Thevenon, S., Dayo, G.K., Garcia, A., Bucheton, B., 2008. Host genetics in African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol* 8, 229-238.

Courtin, F., Jamonneau, V., Camara, M., Camara, O., Coulibaly, B., Diarra, A., Solano, P., Bucheton, B., 2010. A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Trop Med Int Health* 15, 881-889.

Courtiox, B., Boda, C., Vatunga, G., Pervieux, L., Josenando, T., M'Eyi, P.M., Bouteille, B., Jauberteau-Marchan, M.O., Bisser, S., 2006. A link between chemokine levels and disease severity in human African trypanosomiasis. *Int J Parasitol* 36, 1057-1065.

Daulouede, S., Bouteille, B., Moynet, D., De Baetselier, P., Courtois, P., Lemesre, J.L., Buguet, A., Cespuglio, R., Vincendeau, P., 2001. Human macrophage tumor necrosis factor (TNF)-alpha production induced by *Trypanosoma brucei* gambiense and the role of TNF-alpha in parasite control. *J Infect Dis* 183, 988-991.

Dayo, G.K., Thevenon, S., Berthier, D., Moazami-Goudarzi, K., Denis, C., Cuny, G., Eggen, A., Gautier, M., 2009. Detection of selection signatures within candidate regions underlying trypanotolerance in outbred cattle populations. *Mol Ecol* 18, 1801-1813.

De Buhr, M.F., Mahler, M., Geffers, R., Hansen, W., Westendorf, A.M., Lauber, J., Buer, J., Schlegelberger, B., Hedrich, H.J., Bleich, A., 2006. Cd14, Gbp1, and Pla2g2a: three major

candidate genes for experimental IBD identified by combining QTL and microarray analyses. *Physiol Genomics* 25, 426-434.

De Greef, C., Chimfwembe, E., Kihang'a Wabacha, J., Bajyana Songa, E., Hamers, R., 1992. Only the serum-resistant bloodstream forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* express the serum resistance associated (SRA) protein. *Ann Soc Belg Med Trop* 72 Suppl 1, 13-21.

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

Deborggraeve, S., Claes, F., Laurent, T., Mertens, P., Leclipteux, T., Dujardin, J.C., Herdewijn, P., Buscher, P., 2006. Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness. *J Clin Microbiol* 44, 2884-2889.

Deborggraeve, S., Buscher, P., 2010. Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient? *Lancet Infect Dis* 10, 433-439.

Dessein, A.J., Hillaire, D., Elwali, N.E., Marquet, S., Mohamed-Ali, Q., Mirghani, A., Henri, S., Abdelhameed, A.A., Saeed, O.K., Magzoub, M.M., Abel, L., 1999. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *Am J Hum Genet* 65, 709-721.

Donelson, J.E., Turner, M., 1985. Les métamorphoses du trypanosome. *Pour la Science* 4, 14-23.

Doua, F., Miezan, T.W., Sanon Singaro, J.R., Boa Yapo, F., Baltz, T., 1996. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 55, 586-588.

Duchateau, P.N., Movsesyan, I., Yamashita, S., Sakai, N., Hirano, K., Schoenhaus, S.A., O'Connor-Kearns, P.M., Spencer, S.J., Jaffe, R.B., Redberg, R.F., Ishida, B.Y., Matsuzawa, Y., Kane, J.P., Malloy, M.J., 2000. Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. *J Lipid Res* 41, 1231-1236.

Duchateau, P.N., Pullinger, C.R., Cho, M.H., Eng, C., Kane, J.P., 2001. Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res* 42, 620-630.

Dukes, P., Rickman, L.R., Killick-Kendrick, R., Kakoma, I., Wurapa, F.K., de Raadt, P., Morrow, R., 1984. A field comparison of seven diagnostic techniques for human trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *Tropenmed Parasitol* 35, 141-147.

Dukes, P., Gibson, W.C., Gashumba, J.K., Hudson, K.M., Bromidge, T.J., Kaukus, A., Asonganyi, T., Magnus, E., 1992. Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop* 51, 123-134.

Duleu, S., Vincendeau, P., Courtois, P., Semballa, S., Lagroye, I., Daulouede, S., Boucher, J.L., Wilson, K.T., Veyret, B., Gobert, A.P., 2004. Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J Immunol* 172, 6298-6303.

Dumas, M., Bouteille, B., 1996. [Human African trypanosomiasis]. *C R Seances Soc Biol Fil* 190, 395-408.

Dutton, J.E., 1903. Notes sur un trypanosome trouvé dans le sang de l'homme. *Annales d'Hygiène et de Médecine Coloniale* 6, 355-363.

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

Edeghere, H., Olise, P.O., Olatunde, D.S., 1989. Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): new endemic foci in Bendel State, Nigeria. *Trop Med Parasitol* 40, 16-20.

Enyaru, J.C., Matovu, E., Akol, M., Sebikali, C., Kyambadde, J., Schmidt, C., Brun, R., Kaminsky, R., Ogwal, L.M., Kansiime, F., 1998. Parasitological detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in serologically negative sleeping-sickness suspects from north-western Uganda. *Ann Trop Med Parasitol* 92, 845-850.

Fisher, P., Hedeler, C., Wolstencroft, K., Hulme, H., Noyes, H., Kemp, S., Stevens, R., Brass, A., 2007. A systematic strategy for large-scale analysis of genotype phenotype correlations: identification of candidate genes involved in African trypanosomiasis. *Nucleic Acids Res* 35, 5625-5633.

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

Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissiere, C., Lejon, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Van Meirvenne, N., Buscher, P., 2000. Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop Med Int Health* 5, 786-793.

Garcia, A., Jamonneau, V., Sane, B., Fournet, F., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Kaba, D., Laveissiere, C., 2002. Host age and time of exposure in *Trypanosoma brucei gambiense* Human African Trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* 7, 429-434.

Garcia, A., Courtin, D., Solano, P., Koffi, M., Jamonneau, V., 2006. Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends Parasitol* 22, 405-409.

Genovese, G., Friedman, D.J., Ross, M.D., Lecordier, L., Uzureau, P., Freedman, B.I., Bowden, D.W., Langefeld, C.D., Oleksyk, T.K., Uscinski Knob, A.L., Bernhardy, A.J., Hicks, P.J., Nelson, G.W., Vanhollebeke, B., Winkler, C.A., Kopp, J.B., Pays, E., Pollak,

M.R., 2010. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science* 329, 841-845.

Gentilini, M., 1993. *Medecine Tropicale*. Cinquieme edition. Flammarion medecine-sciences.

Gibson, W., 2007. Resolution of the species problem in African trypanosomes. *Int J Parasitol* 37, 829-838.

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

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

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

Girolami, M., 1971. [History of the discovery of African trypanosomiasis]. *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol* 51, 459-463.

Giroud, C., Ottone, F., Coustou, V., Dacheux, D., Biteau, N., Miezan, B., Van Reet, N., Carrington, M., Doua, F., Baltz, T., 2009. Murine Models for *Trypanosoma brucei gambiense* disease progression--from silent to chronic infections and early brain tropism. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e509.

Gobert, A.P., Daulouede, S., Lepoivre, M., Boucher, J.L., Bouteille, B., Buguet, A., Cespuglio, R., Veyret, B., Vincendeau, P., 2000. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* 68, 4653-4657.

Godfrey, D.G., Baker, R.D., Rickman, L.R., Mehlitz, D., 1990. The distribution, relationships and identification of enzymic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Adv Parasitol* 29, 1-74.

Hager, K.M., Pierce, M.A., Moore, D.R., Tytler, E.M., Esko, J.D., Hajduk, S.L., 1994. Endocytosis of a cytotoxic human high density lipoprotein results in disruption of acidic intracellular vesicles and subsequent killing of African trypanosomes. *J Cell Biol* 126, 155-167.

Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Lejon, V., Ngoyi, D.M., Matovu, E., Enyaru, J.C., Fouda, C., Ndung'u, J.M., Lisacek, F., Muller, M., Turck, N., Sanchez, J.C., 2009. A combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP panel for the staging of human African trypanosomiasis patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e459.

Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Ngoyi, D.M., Matovu, E., Enyaru, J.C., Muller, M., Turck, N., Ndung'u, J.M., Lejon, V., Sanchez, J.C., 2011. Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are powerful staging markers for human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* 16, 119-126.

Haines, L.R., Hancock, R.E., Pearson, T.W., 2003. Cationic antimicrobial peptide killing of African trypanosomes and *Sodalis glossinidius*, a bacterial symbiont of the insect vector of sleeping sickness. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3, 175-186.

Hanotte, O., Ronin, Y., Agaba, M., Nilsson, P., Gelhaus, A., Horstmann, R., Sugimoto, Y., Kemp, S., Gibson, J., Korol, A., Soller, M., Teale, A., 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7443-7448.

Harrington, J.M., 2011. Antimicrobial peptide killing of African trypanosomes. *Parasite Immunol* 33, 461-469.

Hill, E.W., O'Gorman, G.M., Agaba, M., Gibson, J.P., Hanotte, O., Kemp, S.J., Naessens, J., Coussens, P.M., MacHugh, D.E., 2005. Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet Immunol Immunopathol* 105, 247-258.

Holzmuller, P., Biron, D.G., Courtois, P., Koffi, M., Bras-Goncalves, R., Daulouede, S., Solano, P., Cuny, G., Vincendeau, P., Jamonneau, V., 2008. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei* gambiense field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect* 10, 79-86.

Ilboudo, H., Jamonneau, V., Camara, M., Camara, O., Dama, E., Leno, M., Ouendeno, F., Courtin, F., Sakande, H., Sanon, R., Kabore, J., Coulibaly, B., N'Dri, L., Diarra, A., N'Goran, E., Bucheton, B., 2011. Diversity of response to *Trypanosoma brucei* gambiense infections in the Forecariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes Infect* 13, 943-952.

Iraqi, F., Clapcott, S.J., Kumari, P., Haley, C.S., Kemp, S.J., Teale, A.J., 2000. Fine mapping of trypanosomiasis resistance loci in murine advanced intercross lines. *Mamm Genome* 11, 645-648.

Jamonneau, V., Garcia, A., Frezil, J.L., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Laveissiere, C., Truc, P., 2000a. Clinical and biological evolution of human trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* 94, 831-835.

Jamonneau, V., Truc, P., Garcia, A., Magnus, E., Buscher, P., 2000b. Preliminary evaluation of LATEX/T. b. gambiense and alternative versions of CATT/T. b. gambiense for the serodiagnosis of human african trypanosomiasis of a population at risk in Côte d'Ivoire: considerations for mass-screening. *Acta Trop* 76, 175-183.

Jamonneau, V., Garcia, A., Ravel, S., Cuny, G., Oury, B., Solano, P., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Frezil, J.L., Truc, P., 2002. Genetic characterization of *Trypanosoma brucei gambiense* and clinical evolution of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 7, 610-621.

Jamonneau, V., Solano, P., Garcia, A., Lejon, V., Dje, N., Miezan, T.W., N'Guessan, P., Cuny, G., Buscher, P., 2003. Stage determination and therapeutic decision in human African trypanosomiasis: value of polymerase chain reaction and immunoglobulin M quantification on the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients in Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 8, 589-594.

Jamonneau, V., Ravel, S., Garcia, A., Koffi, M., Truc, P., Laveissiere, C., Herder, S., Grebaut, P., Cuny, G., Solano, P., 2004. Characterization of *Trypanosoma brucei s.l.* infecting asymptomatic sleeping-sickness patients in Côte d'Ivoire: a new genetic group? *Ann Trop Med Parasitol* 98, 329-337.

Jamonneau, V., Bucheton, B., Kabore, J., Ilboudo, H., Camara, O., Courtin, F., Solano, P., Kaba, D., Kambire, R., Lingue, K., Camara, M., Baelmans, R., Lejon, V., Buscher, P., 2010. Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e917.

Jannin, J.G., 2005. Sleeping sickness--a growing problem? *BMJ* 331, 1242.

Jennings, F.W., Whitelaw, D.D., Holmes, P.H., Urquhart, G.M., 1978. The susceptibility of strains of mice to infection with *Trypanosoma congolense*. *Res Vet Sci* 25, 399-400.

Kaba, D., Dje, N.N., Courtin, F., Oke, E., Koffi, M., Garcia, A., Jamonneau, V., Solano, P., 2006. [The impact of war on the evolution of sleeping sickness in west-central Côte d'Ivoire]. *Trop Med Int Health* 11, 136-143.

Kabiri, M., Franco, J.R., Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Sarsa, M., Steverding, D., 1999. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop Med Int Health* 4, 658-661.

Kabore, J., Koffi, M., Bucheton, B., Macleod, A., Duffy, C., Ilboudo, H., Camara, M., De Meeus, T., Belem, A.M., Jamonneau, V., 2011a. First evidence that parasite infecting apparent aparasitemic serological suspects in human African trypanosomiasis are *Trypanosoma brucei gambiense* and are similar to those found in patients. *Infect Genet Evol* 11, 1250-1255.

Kabore, J., Macleod, A., Jamonneau, V., Ilboudo, H., Duffy, C., Camara, M., Camara, O., Belem, A.M., Bucheton, B., De Meeus, T., 2011b. Population genetic structure of Guinea *Trypanosoma brucei gambiense* isolates according to host factors. *Infect Genet Evol* 11, 1129-1135.

Keeling, Patrick, Brian, S., Léandre, Alastair, S., 2009. Eukaryotes. Eukaryota, Organisms with nucleated cells. Version 28 October 2009. <http://tolweb.org/Eukaryotes/3/2009.10.28> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

Kemp, S.J., Darvasi, A., Soller, M., Teale, A.J., 1996. Genetic control of resistance to trypanosomiasis. *Vet Immunol Immunopathol* 54, 239-243.

Kemp, S.J., Iraqi, F., Darvasi, A., Soller, M., Teale, A.J., 1997. Localization of genes controlling resistance to trypanosomiasis in mice. *Nat Genet* 16, 194-196.

Kennedy, P.G., 2008. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Ann Neurol* 64, 116-126.

Khonde, N., Pepin, J., Niyonsenga, T., De Wals, P., 1997. Familial aggregation of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis in a very high incidence community in Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91, 521-524.

Kieft, R., Capewell, P., Turner, C.M., Veitch, N.J., MacLeod, A., Hajduk, S., 2010. Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16137-16141.

Koffi, M., Solano, P., Denizot, M., Courtin, D., Garcia, A., Lejon, V., Buscher, P., Cuny, G., Jamonneau, V., 2006. Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop* 98, 183-188.

Koffi, M., Solano, P., Barnabe, C., de Meeus, T., Bucheton, B., Cuny, G., Jamonneau, V., 2007. Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* s.l. using microsatellite typing: new perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol* 7, 675-684.

Koffi, M., De Meeus, T., Bucheton, B., Solano, P., Camara, M., Kaba, D., Cuny, G., Ayala, F.J., Jamonneau, V., 2009. Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 209-214.

Lai, D.H., Hashimi, H., Lun, Z.R., Ayala, F.J., Lukes, J., 2008. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1999-2004.

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

Laveran, A., Mesnil, F., 1912. Trypanosomes et trypanosomiases. Paris: Masson, 118-154.

Lazaro, F.P., Werneck, R.I., Mackert, C.C., Cobat, A., Prevedello, F.C., Pimentel, R.P., Macedo, G.M., Eleuterio, M.A., Vilar, G., Abel, L., Xavier, M.B., Alcais, A., Mira, M.T.,

2010. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis* 201, 1598-1605.

Lecordier, L., Vanhollebeke, B., Poelvoorde, P., Tebabi, P., Paturiaux-Hanocq, F., Andris, F., Lins, L., Pays, E., 2009. C-terminal mutants of apolipoprotein L-I efficiently kill both *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Pathog* 5, e1000685.

Lejon, V., Lardon, J., Kenis, G., Pinoges, L., Legros, D., Bisser, S., N'Siesi, X., Bosmans, E., Buscher, P., 2002. Interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 in serum and CSF of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness patients before and after treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96, 329-333.

Lejon, V., Legros, D., Savignoni, A., Etchegorry, M.G., Mbulamberi, D., Buscher, P., 2003. Neuro-inflammatory risk factors for treatment failure in "early second stage" sleeping sickness patients treated with pentamidine. *J Neuroimmunol* 144, 132-138.

Lejon, V., Jamonneau, V., Solano, P., Atchade, P., Mumba, D., Nkoy, N., Bebronne, N., Kibonja, T., Balharbi, F., Wierckx, A., Boelaert, M., Buscher, P., 2006. Detection of trypanosome-specific antibodies in saliva, towards non-invasive serological diagnosis of sleeping sickness. *Trop Med Int Health* 11, 620-627.

Levine, R.F., Mansfield, J.M., 1981. Genetics of resistance to African trypanosomes: role of the H-2 locus in determining resistance to infection with *Trypanosoma rhodesiense*. *Infect Immun* 34, 513-518.

Li, F.J., Gasser, R.B., Zheng, J.Y., Claes, F., Zhu, X.Q., Lun, Z.R., 2005. Application of multiple DNA fingerprinting techniques to study the genetic relationships among three members of the subgenus *Trypanozoon* (Protozoa: Trypanosomatidae). *Mol Cell Probes* 19, 400-407.

Li, F.J., Lai, D.H., Lukes, J., Chen, X.G., Lun, Z.R., 2006. Doubts about *Trypanosoma equiperdum* strains classed as *Trypanosoma brucei* or *Trypanosoma evansi*. *Trends Parasitol* 22, 55-56; author reply 58-59.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Lizard, G., Monier, S., Prunet, C., Duvillard, L., Gambert, P., 2004. [Microspheres, nanospheres and flow cytometry: from cellular to molecular analysis]. *Ann Biol Clin (Paris)* 62, 47-52.

Lumsden, W.H., Kimber, C.D., Strange, M., 1977. *Trypanosoma brucei*: detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71, 421-424.

Lumsden, W.H., Kimber, C.D., Evans, D.A., Doig, S.J., 1979. *Trypanosoma brucei*: Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73, 312-317.

MacLean, L., Odiit, M., Sternberg, J.M., 2001. Nitric oxide and cytokine synthesis in human African trypanosomiasis. *J Infect Dis* 184, 1086-1090.

MacLean, L., Chisi, J.E., Odiit, M., Gibson, W.C., Ferris, V., Picozzi, K., Sternberg, J.M., 2004. Severity of human african trypanosomiasis in East Africa is associated with geographic location, parasite genotype, and host inflammatory cytokine response profile. *Infect Immun* 72, 7040-7044.

Maclean, L., Odiit, M., Macleod, A., Morrison, L., Sweeney, L., Cooper, A., Kennedy, P.G., Sternberg, J.M., 2007. Spatially and genetically distinct African Trypanosome virulence variants defined by host interferon-gamma response. *J Infect Dis* 196, 1620-1628.

Magez, S., Geuskens, M., Beschin, A., del Favero, H., Verschueren, H., Lucas, R., Pays, E., de Baetselier, P., 1997. Specific uptake of tumor necrosis factor-alpha is involved in growth control of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 137, 715-727.

Magez, S., Stijlemans, B., Radwanska, M., Pays, E., Ferguson, M.A., De Baetselier, P., 1998. The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors. *J Immunol* 160, 1949-1956.

Magez, S., Radwanska, M., Drennan, M., Fick, L., Baral, T.N., Brombacher, F., De Baetselier, P., 2006. Interferon-gamma and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during trypanosoma congolense Tc13 Infections. *J Infect Dis* 193, 1575-1583.

Magnus, E., Vervoort, T., Van Meirvenne, N., 1978. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 58, 169-176.

Mansfield, J.M., Paulnock, D.M., 2005. Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunol* 27, 361-371.

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

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

McCulloch, R., 2004. Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol* 20, 117-121.

McGwire, B.S., Olson, C.L., Tack, B.F., Engman, D.M., 2003. Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *J Infect Dis* 188, 146-152.

McGwire, B.S., Kulkarni, M.M., 2010. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp Parasitol* 126, 397-405.

Mehlitz, D., Zillmann, U., Scott, C.M., Godfrey, D.G., 1982. Epidemiological studies on the animal reservoir of *Gambiense* sleeping sickness. Part III. Characterization of trypanozoon stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed Parasitol* 33, 113-118.

Mestas, J., Hughes, C.C., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738.

Miezan, T.W., Meda, H.A., Doua, F., Dje, N.N., Lejon, V., Buscher, P., 2000. Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 293.

Molyneux, D.H., Pentreath, V.W., Doua, F., 1996. African trypanosomiasis in man. *Manson's Tropical Diseases*. WB Saunders Compagny LTD. Cook GC (Ed) 1171-1196.

Moore, K.J., Nagle, D.L., 2000. Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. *Annu Rev Genet* 34, 653-686.

Morrison, L.J., Tait, A., McLellan, S., Sweeney, L., Turner, C.M., MacLeod, A., 2009. A major genetic locus in *Trypanosoma brucei* is a determinant of host pathology. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e557.

Morrison, L.J., McLellan, S., Sweeney, L., Chan, C.N., MacLeod, A., Tait, A., Turner, C.M., 2010. Role for parasite genetic diversity in differential host responses to *Trypanosoma brucei* infection. *Infect Immun* 78, 1096-1108.

Morrison, W.I., Roelants, G.E., Mayor-Withey, K.S., Murray, M., 1978. Susceptibility of inbred strains of mice to *Trypanosoma congolense*: correlation with changes in spleen lymphocyte populations. *Clin Exp Immunol* 32, 25-40.

Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs, D.E., Bailey, C.P., McKane, M.R., Donelson, J.E., 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* 99 Pt 1, 57-66.

Mugasa, C.M., Laurent, T., Schoone, G.J., Kager, P.A., Lubega, G.W., Schallig, H.D., 2009. Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 47, 630-635.

Murray, M., Gray, R.A., 1984. The current situation in animal trypanosomosis in Africa. *Preventive Veterinary Medicine* 2, 23-30.

Namangala, B., De Baetselier, P., Beschin, A., 2009. Both type-I and type-II responses contribute to murine trypanotolerance. *J Vet Med Sci* 71, 313-318.

Nganga, J.K., Soller, M., Iraqi, F.A., 2010. High resolution mapping of trypanosomosis resistance loci Tir2 and Tir3 using F12 advanced intercross lines with major locus Tir1 fixed for the susceptible allele. *BMC Genomics* 11, 394.

Njiokou, F., Nimpaye, H., Simo, G., Njitchouang, G.R., Asonganyi, T., Cuny, G., Herder, S., 2010. Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon. *Parasite* 17, 61-66.

Njiru, Z.K., Traub, R., Ouma, J.O., Enyaru, J.C., Matovu, E., 2011. Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 49, 1530-1536.

Noireau, F., Gouteux, J.P., Duteurtre, J.P., 1987. [Diagnostic value of a card agglutination test (Testryp CATT) in the mass screening of human trypanosomiasis in the Congo]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 80, 797-803.

Noyes, H.A., Alimohammadian, M.H., Agaba, M., Brass, A., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hulme, H., Iraqi, F., Kemp, S., Rathkolb, B., Wolf, E., de Angelis, M.H., Roshandel, D., Naessens, J., 2009. Mechanisms controlling anaemia in *Trypanosoma congolense* infected mice. *PLoS One* 4, e5170.

O'Gorman, G.M., Park, S.D., Hill, E.W., Meade, K.G., Coussens, P.M., Agaba, M., Naessens, J., Kemp, S.J., MacHugh, D.E., 2009. Transcriptional profiling of cattle infected with *Trypanosoma congolense* highlights gene expression signatures underlying trypanotolerance and trypanosusceptibility. *BMC Genomics* 10, 207.

Okia, M., Mbulamberi, D.B., De Muynck, A., 1994. Risk factors assessment for *T. b. rhodesiense* sleeping sickness acquisition in S.E. Uganda. A case-control study. *Ann Soc Belg Med Trop* 74, 105-112.

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

OMS, 2002. Rapport OMS 2002. Genève, Suisse.

Pays, E., Berberof, M., 1995. Antigènes variables et non variables des trypanosomes africains. *Med Sci* 11, 261-267.

Pays, E., 2006. The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. *Microbes Infect* 8, 930-937.

Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Perez-Morga, D., 2006. The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol* 4, 477-486.

Pays, E., Vanhollebeke, B., 2009. Human innate immunity against African trypanosomes. *Curr Opin Immunol* 21, 493-498.

Peacock, C.S., Collins, A., Shaw, M.A., Silveira, F., Costa, J., Coste, C.H., Nascimento, M.D., Siddiqui, R., Shaw, J.J., Blackwell, J.M., 2001. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Genet Epidemiol* 20, 383-396.

Penchenier, L., Dumas, V., Grebaut, P., Reifenberg, J.M., Cuny, G., 1996. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite* 3, 387-389.

Penchenier, L., Simo, G., Grebaut, P., Nkinin, S., Laveissiere, C., Herder, S., 2000. Diagnosis of human trypanosomiasis, due to *Trypanosoma brucei gambiense* in central Africa, by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 392-394.

Penchenier, L., Grebaut, P., Njokou, F., Eboo Eyenga, V., Buscher, P., 2003. Evaluation of LATEX/T.b.gambiense for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa. *Acta Trop* 85, 31-37.

Pepin, J., Milord, F., 1994. The treatment of human African trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 33, 1-47.

Perez-Morga, D., Vanhollebeke, B., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Lins, L., Homble, F., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Poelvoorde, P., Jacquet, A., Brasseur, R., Pays, E., 2005. Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. *Science* 309, 469-472.

Pineda, J.P., Luquetti, A., Castro, C., 1998. [Comparison between classical and artificial xenodiagnosis in chronic Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 31, 473-480.

Poitras, E., Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotechnol* 2, 2-11.

Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohlig, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torreele, E., Kande, V., 2009. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* 374, 56-64.

Quan, N., Mhlanga, J.D., Whiteside, M.B., McCoy, A.N., Kristensson, K., Herkenham, M., 1999. Chronic overexpression of proinflammatory cytokines and histopathology in the brains of rats infected with *Trypanosoma brucei*. *J Comp Neurol* 414, 114-130.

Radwanska, M., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., Perez-Morga, D., Pays, E., Buscher, P., 2002. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg* 67, 289-295.

Rhind, S.G., Sabiston, B.H., Shek, P.N., Buguet, A., Muanga, G., Stanghellini, A., Dumas, M., Radomski, M.W., 1997. Effect of melarsoprol treatment on circulating IL-10 and TNF-alpha levels in human African trypanosomiasis. *Clin Immunol Immunopathol* 83, 185-189.

Risso, A., 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 68, 785-792.

Robays, J., Bilengue, M.M., Van der Stuyft, P., Boelaert, M., 2004. The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health* 9, 542-550.

Ruiz, J.A., Simarro, P.P., Josenando, T., 2002. Control of human African trypanosomiasis in the Quicama focus, Angola. *Bull World Health Organ* 80, 738-745.

Shi, M., Pan, W., Tabel, H., 2003. Experimental African trypanosomiasis: IFN-gamma mediates early mortality. *Eur J Immunol* 33, 108-118.

Shi, M., Wei, G., Pan, W., Tabel, H., 2006. Experimental African trypanosomiasis: a subset of pathogenic, IFN-gamma-producing, MHC class II-restricted CD4+ T cells mediates early mortality in highly susceptible mice. *J Immunol* 176, 1724-1732.

Shiflett, A.M., Faulkner, S.D., Cotlin, L.F., Widener, J., Stephens, N., Hajduk, S.L., 2007. African trypanosomes: intracellular trafficking of host defense molecules. *J Eukaryot Microbiol* 54, 18-21.

Simarro, P.P., Jannin, J., Cattand, P., 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Med* 5, e55.

Simarro, P.P., Cecchi, G., Paone, M., Franco, J.R., Diarra, A., Ruiz, J.A., Fevre, E.M., Courtin, F., Mattioli, R.C., Jannin, J.G., 2010. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int J Health Geogr* 9, 57.

Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R., Jannin, J.G., 2011. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1007.

Simo, G., Asonganyi, T., Nkinin, S.W., Njiokou, F., Herder, S., 2006. High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. *Vet Parasitol* 139, 57-66.

Smith, D.H., Bailey, J.W., 1997. Human African trypanosomiasis in south-eastern Uganda: clinical diversity and isoenzyme profiles. *Ann Trop Med Parasitol* 91, 851-856.

Solano, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Dje, N.N., Miezan, T.W., Lejon, V., Buscher, P., Garcia, A., 2002. Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human African Trypanosomosis in Cote d'Ivoire. *Acta Trop* 82, 349-356.

Stanghellini, A., Josenando, T., 2001. The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop Med Int Health* 6, 330-334.

Sternberg, J.M., Maclean, L., 2010. A spectrum of disease in Human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence. *Parasitology* 137, 2007-2015.

Steverding, D., 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors* 1, 3.

Tabel, H., Kaushik, R.S., Uzonna, J.E., 2000. Susceptibility and resistance to *Trypanosoma congolense* infections. *Microbes Infect* 2, 1619-1629.

Tabel, H., Wei, G., Shi, M., 2008. T cells and immunopathogenesis of experimental African trypanosomiasis. *Immunol Rev* 225, 128-139.

Thevenon, S., Dayo, G.K., Sylla, S., Sidibe, I., Berthier, D., Legros, H., Boichard, D., Eggen, A., Gautier, M., 2007. The extent of linkage disequilibrium in a large cattle population of western Africa and its consequences for association studies. *Anim Genet* 38, 277-286.

Tiberti, N., Hainard, A., Lejon, V., Robin, X., Ngoyi, D.M., Turck, N., Matovu, E., Enyaru, J., Ndung'u, J.M., Scherl, A., Dayon, L., Sanchez, J.C., 2010. Discovery and verification of osteopontin and Beta-2-microglobulin as promising markers for staging human African trypanosomiasis. *Mol Cell Proteomics* 9, 2783-2795.

Truc, P., Mathieu-Daude, F., Tibayrenc, M., 1991. Multilocus isozyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Trop* 49, 127-135.

Truc, P., Formenty, P., Diallo, P.B., Komoin-Oka, C., Lauginie, F., 1997. Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting man and wild mammals in Cote d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Ann Trop Med Parasitol* 91, 951-956.

Truc, P., Jamonneau, V., Cuny, G., Frezil, J.L., 1999. Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bull World Health Organ* 77, 745-748.

Truc, P., Lejon, V., Magnus, E., Jamonneau, V., Nangouma, A., Verloo, D., Penchenier, L., Buscher, P., 2002. Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei* gambiense, and LATEX/T b gambiense methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bull World Health Organ* 80, 882-886.

Tse, C., Capeau, J., 2003. [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. *Ann Biol Clin (Paris)* 61, 279-293.

Van den Bossche, P., Ky-Zerbo, A., Brandt, J., Marcotty, T., Geerts, S., De Deken, R., 2005. Transmissibility of *Trypanosoma brucei* during its development in cattle. *Trop Med Int Health* 10, 833-839.

Van der Ploeg, L.H., Gottesdiener, K., Lee, M.G., 1992. Antigenic variation in African trypanosomes. *Trends Genet* 8, 452-457.

van Meirvenne, N., Maginus, E., Janssens, P.G., 1976. The effect of normal human serum on trypanosomes of distinct antigenic type (ETat 1 to 12) isolated from a strain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Ann Soc Belg Med Trop* 56, 55-63.

Van Meirvenne, N., 1992. Diagnosis of human African trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 72 Suppl 1, 53-56.

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

Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D.P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., Moguilevsky, N., Dieu, M., Kane, J.P., De Baetselier, P., Brasseur, R., Pays, E., 2003. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422, 83-87.

Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M.J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S.K., Pays, E., 2008. A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* 320, 677-681.

Vickerman, K., 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull* 41, 105-114.

Vincendeau, P., Gobert, A.P., Daulouede, S., Moynet, D., Mossalayi, M.D., 2003. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19, 9-12.

Wei, G., Tabel, H., 2008. Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis. *J Immunol* 180, 2514-2521.

Wei, G., Bull, H., Zhou, X., Tabel, H., 2011. Intradermal infections of mice by low numbers of african trypanosomes are controlled by innate resistance but enhance susceptibility to reinfection. *J Infect Dis* 203, 418-429.

Welburn, S.C., Picozzi, K., Fevre, E.M., Coleman, P.G., Odiit, M., Carrington, M., Maudlin, I., 2001. Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. *Lancet* 358, 2017-2019.

Whitelaw, D.D., Macaskill, J.A., Holmes, P.H., Jennings, F.W., Urquhart, G.M., 1980. Genetic resistance to *Trypanosoma congolense* infections in mice. *Infect Immun* 27, 707-713.

WHO, 1998. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 881.

WHO, 2011. Human African Trypanosomiasis: number of new cases drops to historically low level in 50 years.
http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media/integrated_media_hat_june_2010/en/index.html. Accessed 27 june 2011.

Wombou Toukam, C.M., Solano, P., Bengaly, Z., Jamonneau, V., Bucheton, B., 2011. Experimental evaluation of xenodiagnosis to detect trypanosomes at low parasitaemia levels in infected hosts. Parasite 18, 295-302.

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

Xong, H.V., Vanhamme, L., Chamekh, M., Chimfwembe, C.E., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Van Meirvenne, N., Hamers, R., De Baetselier, P., Pays, E., 1998. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. Cell 95, 839-846.

Yun, O., Priotto, G., Tong, J., Flevaud, L., Chappuis, F., 2010. NECT is next: implementing the new drug combination therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. PLoS Negl Trop Dis 4, e720.

Annexes

Annexe 1 : questionnaire épidémiologique et clinique

Etat civil Date :

Nom : N° dépistage :

Prénoms : Centre de Prospection:

Age : Sexe : Ethnie : Profession :

Nom du père : Nom de la mère :

Questionnaire épidémiologique :

- Activité :

Activité principale : Activité secondaire :

Lieu de travail :

- Originaire de la zone : OUI / NON si non provenance :
Date d'arrivée :

- Lieu de résidence - permanente :

- Temporaire :

- voyages (3 dernière années) : OUI / NON

Si oui : où Durée du séjour :

- Fréquentez -vous les îles ?

- Si oui ; îles visitées :

- Présence d'animaux dans la concession : OUI / NON lesquels.....

-Avez -vous déjà participé à une séance de dépistage ? quand ?.....

Lieu : résultat :

-Actuel ou ancien trypanosomé dans la famille proche : leur nombre

- leur date de dépistage : la période de la maladie :

- lien de parenté :

- leur lieu de résidence :

Questionnaire clinique :

- adénopathies cervicales : OUI / NON Typique / Atypique

- Insomnie nocturne : OUI / NON ; somnolence diurne : OUI / NON
- Troubles de l'appétit : OUI / NON si OUI : Boulimie / Anorexie
- Troubles activité sexuelle : OUI / NON
- si OUI préciser (aménorrhée, impuissance..) :
- Fièvre : OUI / NON ; maux de tête : OUI / NON ; amaigrissement : OUI / NON
- sensation de fatigue générale : OUI / NON ;
- troubles du comportement : OUI / NON (préciser) :
- troubles de la motricité : OUI / NON (préciser) :
- date d'apparition des premiers symptômes (fatigue, insomnies....) :
- Signes cutanées : Prurits OUI / NON, Trypanides OUI / NON
- autres signes à préciser :
- remarques particulières :

RESULTAT DES TESTS SEROLOGIQUES ET PARASITOLOGIQUES

Tests sérologiques :

- CATT sur sang total : - +/ - +
- CATT sur plasma (dilution) :

Tests parasitologiques sur le suc ganglionnaire et le sang :

- Ponction ganglionnaire réalisée : OUI / NON
- Examen du suc ganglionnaire entre lame et lamelle - +
- mAECT _{sang} - + nombre de trypanosomes :
- mAECT _{BC} - + nombre de trypanosomes :

Tests parasitologiques sur LCR :

- Simple centrifugation : - + nombre de trypanosomes :
- Cytorachie (nombre de cellules) :

Tubes échantillonnés (nb) : BC :..... plasma :..... sang :..... PG :..... PAXgen :.....
--

Annexe 2 : déroulement d'une prospection médicale

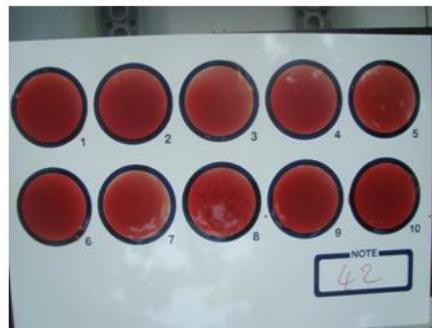
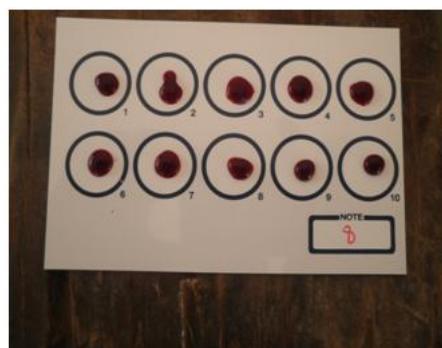
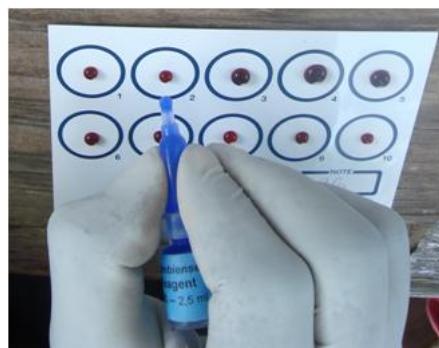
Source des photos : IRD/CIRDES



Etape 1 : enregistrement de la population présente le jour de la prospection. Seules les personnes enrégistrées pourront rentrer dans la chaîne de dépistage.



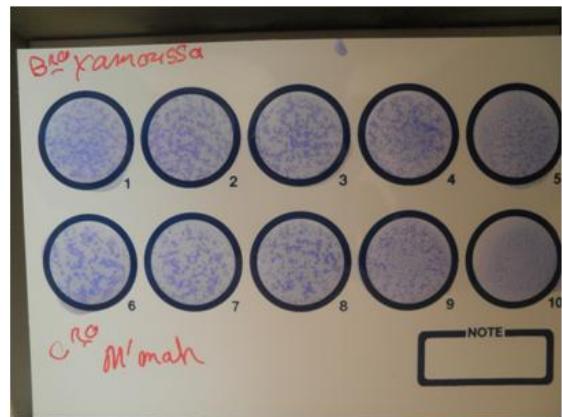
Etape 2 : prélèvement digital. Toutes les personnes enrégistrées sont prélevées par série de dix au bout du doigt dans un tube capillaire afin de réaliser un premier test



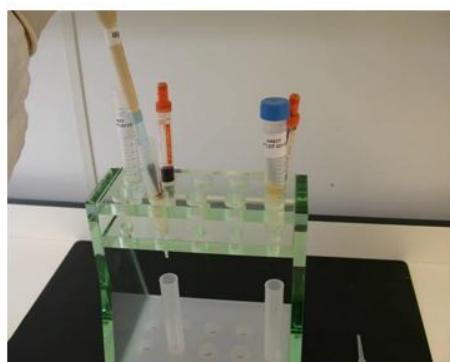
Etape 3 : CATT sur sang total. Un premier test CATT sur sang total est réalisé sur toutes les personnes prélevées. Les personnes négatives sont libérées.



Etape 4 : prélèvement au pli du coude. Les personnes positives au CATT sang total sont prélevées au pli du coude afin de réaliser un deuxième test CATT sur le plasma et éventuellement la mini-colonne (mAECT).



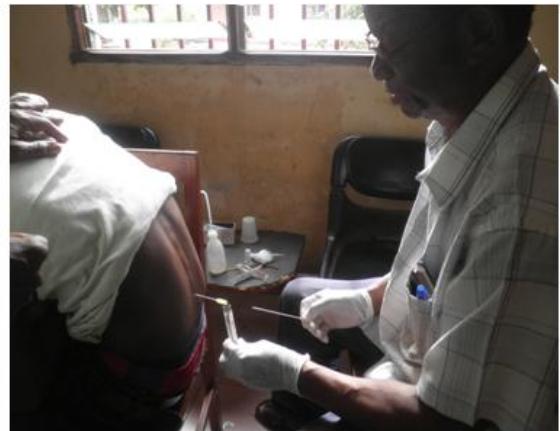
Etape 5 : CATT sur dilutions successives du plasma. Le CATT sur dilutions successive est effectué sur toutes les personnes positives au CATT sang. Les personnes ayant un titre CATT-plasma $\geq 1/8$ sont retenues pour les tests parasitologiques.



Etape 6 : Tests parasitologiques. Ils sont effectués sur les personnes ayant un titre CATT-plasma $\geq 1/8$. Le sang est utilisé pour la mAECT et les éventuels ganglions cervicaux sont ponctionnés pour la recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire. Les personnes négatives sont appelées séropositives.



Etape 7 : convocation pour le traitement. Un questionnaire épidémiologique et clinique est constitué pour chaque séropositif et chaque malade. Les séropositifs sont libérés et seront suivis ultérieurement tandis que les malades sont convoqués au centre de traitement.



Etape 8 : ponction lombaire. Avant le traitement une ponction lombaire est réalisée au centre de traitement pour le diagnostic de phase qui détermine le traitement approprié pour chaque malade.



Equipe Trypano IRD/CIRDES et du PNLTHA de la Guinée.

Annexe 3 : Publications

Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test

Mamadou Camara¹, Oumou Camara^{1,2}, Hamidou Ilboudo², Hassan Sakande², Jacques Kaboré², Louis N'Dri³, Vincent Jamonneau^{2,4} and Bruno Bucheton^{2,4}

¹ Programme National de Lutte contre la Trypanosomose Humaine Africaine, Conakry, Guinée

² Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Sub-humide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

³ Institut Pierre Richet, Unité de Recherche 'Trypanosomoses', Abidjan, Côte d'Ivoire

⁴ Institut de Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, Montpellier, France

Summary

OBJECTIVES To evaluate a modification of the mini anion exchange centrifugation test (mAECT) for the diagnosis of *Trypanosoma brucei* (*T.b.*) *gambiense* human African trypanosomiasis (HAT). To increase its sensitivity, this test uses 350 µl of buffy coat withdrawn from 5 ml of blood instead of blood.

METHODS The new protocol was first tested experimentally on serial dilution of trypanosomes and was then further evaluated under field conditions on 57 patients with HAT diagnosed during a medical survey in Guinea.

RESULTS Experimentally, the use of buffy coats improved mAECT sensitivity at least five fold and enabled to consistently detect parasites in blood at a concentration of 10 trypanosomes/ml. During the field evaluation, more patients tested positive by mAECT-bc (96.5%) than by mAECT-blood (78.9%, $\chi^2 = 6.93$, $P = 0.008$) and lymph juice examination (77.2%, $\chi^2 = 7.67$, $P = 0.005$). Furthermore, the number of parasites per collectors was significantly higher (7.2 vs. 2.6, $P = 0.001$) when buffy coats were used instead of blood.

CONCLUSION The use of the mAECT-bc protocol enabled a significant improvement of HAT parasitological diagnosis in Guinea, without any additional costs. It would deserve to be tested in other *T.b. gambiense* endemic areas.

keywords buffy coat, diagnosis, Human African trypanosomiasis, mini-anion exchange centrifugation technique (mAECT)

Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a disease found in sub-Saharan Africa caused by two sub-species of trypanosome, *Trypanosoma brucei* (*T.b.*) *rhodesiense* and *T.b. gambiense*, with the latter causing over 90% of all cases (Simarro *et al.* 2008). The disease is classically characterized by an early haemolymphatic phase followed by a late meningoencephalitic phase leading to neurological disorders and death. Owing to the absence of specific clinical symptoms and to the fact that available treatments are either highly toxic and/or require long-term hospitalization in specialized health structures (Welburn *et al.* 2009); diagnostic tools are of crucial importance (WHO 1998).

Diagnosis of *T.b. gambiense* HAT usually relies on mass screening with the card agglutination test for trypanosomiasis (CATT). This test is highly sensitive but lacks in specificity. Thus, parasitological tests on body fluids (blood

or lymph juice) are required to confirm HAT. Various techniques such as the capillary tube centrifugation (CTC, WOO), the quantitative buffy coat (QBC) and the mini-anion exchange centrifugation technique (mAECT) were elaborated to concentrate parasite in blood prior to microscopic examination to increase sensitivity of parasitological diagnosis (Chappuis *et al.* 2005). The mAECT has proved to be the most sensitive method (Büscher *et al.* 2009). In mAECT, trypanosomes are separated from 350 µl of blood by anion exchange chromatography on diethylaminoethyl cellulose (DEAE). Eluted trypanosomes are then concentrated by slow centrifugation followed by direct microscopic examination of the sediment in a transparent collector tube. The large volume of blood examined allows the detection of less than 50 trypanosomes/ml (Büscher *et al.* 2009). However, these field-applicable parasitological tools still suffer from limited sensitivity, therefore denying or delaying necessary treatment (Lutumba *et al.* 2005). PCR using specific DNA

probes (Chappuis *et al.* 2005), loop-mediated isothermal amplification (Njiru *et al.* 2008), and more recently, nucleic acid based amplification with oligochromatography (Mugasa *et al.* 2009) provides a better sensitivity compared to parasitological methods. However, molecular diagnosis is expensive, difficult to implement under field conditions and has not yet been included in the diagnosis procedures of National Control Programs (NCP).

These observations led us to evaluate a modified mAECT protocol to increase further the sensitivity of the test. It simply consists of adding an additional parasite concentration step by centrifugation of the venous blood collection tube (5 ml). Upon centrifugation, trypanosomes are concentrated in the buffy coat layer, a principle that is already applied in the CTC (Chappuis *et al.* 2005) but with much smaller volumes of blood.

Methods

mAECT protocols

All tests were performed with 5 ml of blood in heparinized vacutainers from either (i) serial parasite dilutions made in blood (experimental evaluation) or (ii) patients (field evaluation). From each vacutainer, 350 µl of blood was first removed and processed on mAECT columns (INRB-model) according to standard operating procedures (http://www.finndiagnostics.org/programs/hat/find_activities/maect_sop/index.html). The vacutainer was then centrifuged 5 min at 1500 × g. Removal of the buffy coat (the concentrated leucocyte layer) was done using a 1-ml pipette tip that was previously cut out with scissors (at 5 mm from its extremity). The tip was then placed at the

centre of the vacutainer just above (1 mm) the white blood cell layer, and 350 µl of buffy coat were removed slowly without moving the pipette (a small fraction of plasma and of concentrated red blood cells are also removed during the operation). The collected buffy coat suspension was then processed on mAECT columns according to the same protocol as blood.

Experimental evaluation

Trypanosomes (MBONR1 stock, isolated in Guinea) were grown on BalbC mice and added to the blood of a healthy donor to obtain serial parasites concentration of 50, 10, 5 and 1 trypanosomes/ml. Five millilitres of parasitized blood was then transferred to *n* (number of replicates, see below) heparinized vacutainers and processed on to mAECT columns as described earlier. Collectors were then given an arbitrary code, and parasites were counted blindly by a skilled microscopist who did all the readings. The experiment was carried out during three consecutive days using the blood of the same donor each time to minimize the effect of blood donor-dependent variability. Blood parasite concentrations of (i) 50 (*n* = 5) and 10 (*n* = 5) trypanosomes/ml; (ii) 10 (*n* = 5) and 5 (*n* = 5) trypanosomes/ml and (iii) 5 (*n* = 5) and 1 (*n* = 5) trypanosomes/ml were tested on day 1, day 2 and day 3 respectively.

Field evaluation

The field evaluation of the mAECT-bc protocol was performed during a medical survey in the Dubreka area, the most active HAT focus in Guinea (Camara *et al.* 2005).

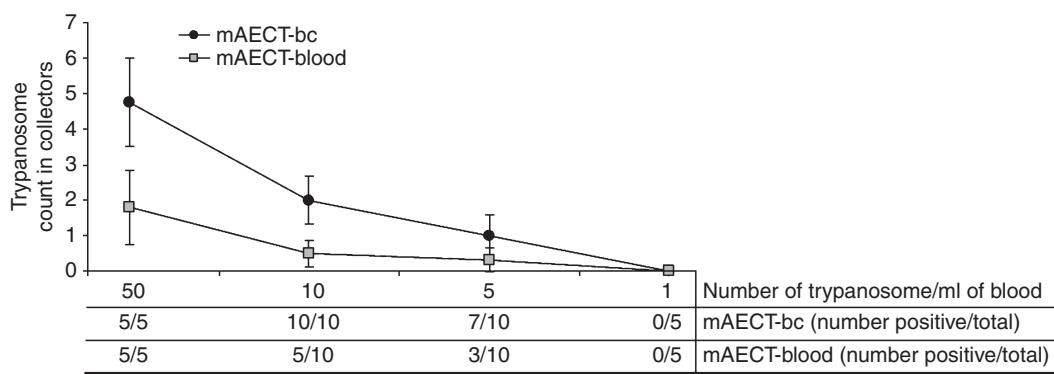


Figure 1 Experimental evaluation of mAECT-bc over mAECT-blood. Serial blood dilution of a *Trypanosoma brucei gambiense* strain isolated in Guinea (MBONR1) and produced on BalbC mice was used to compare mini anion exchange centrifugation test (mAECT) performed directly from blood or from buffy coat. Blood parasite concentrations tested were 50 trypanosomes/ml (*n* = 5), 10 trypanosomes/ml (*n* = 10), 5 trypanosomes/ml (*n* = 10) and 1 trypanosome/ml (*n* = 5). The graph represents the mean parasite counts of replicates, calculated for each parasite concentration. Standard error of the mean is also indicated. The proportions of positive collectors (with at least one trypanosome seen) are indicated in the table under the graph.

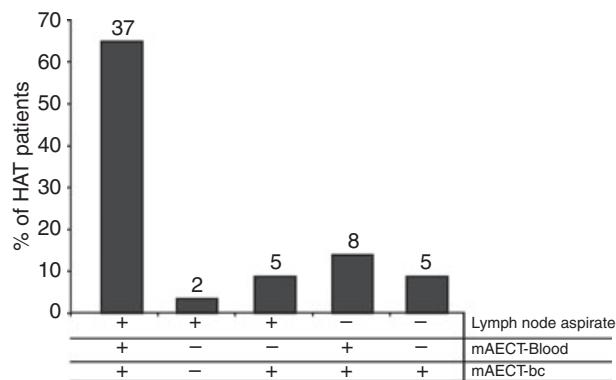


Figure 2 Distribution of HAT cases according to the result of parasitological tests. Percentage of HAT cases (numbers are indicated above the histogram bars) is shown according to the three parasitological tests performed. For all subjects with CATT titration results $\geq 1/8$, direct microscopic examination of lymph node aspirates was performed whenever cervical lymph nodes were present and 5 ml of venous blood was collected on a heparinized collection tube. Three hundred and fifty microlitres of blood or 350 μ l of buffy coat (taken after centrifugation of the tube, 5 min at $1500 \times g$) was processed on mini anion exchange centrifugation test columns. Results are shown for all patients with HAT that were positive to at least one parasitological test ($n = 57$).

Mass screening was performed with the CATT, and all individuals with a CATT dilution titre $\geq 1/8$ ($n = 96$) were submitted to lymph node aspirate examination whenever swollen lymph nodes were present ($n = 62$) and mAECT

was performed both with blood and buffy coat. All mAECT columns were set up and read by the same technician. Reading in this case was not done blindly.

Ethical aspects

The study protocol was approved by the Guinean Ministry of Health and the field survey was conducted under the supervision of the National Control Program. All patients diagnosed in the frame of this study were treated at the Dubreka treatment centre.

Results and discussion

Experimental evaluation of the mAECT-bc protocol showed that the average number of trypanosomes recovered from mAECT-bc collectors were consistently and significantly higher than for mAECT-blood collectors, at all parasite concentrations tested ($P = 0.005$, $P = 0.001$ and $P = 0.02$ at 50, 10 and 5 trypanosome/ml respectively by the paired t -test) except for 1 trypanosome/ml, where both tests were negative (Figure 1). In agreement with previous reported sensitivity thresholds, all mAECT-blood collectors were positive at 50 trypanosomes/ml, while only 50% (5/10) and 30% (3/10) were positive at 10 and 5 trypanosomes/ml, respectively. In contrast, 100% (10/10) of mAECT-bc collectors were still positive at 10 trypanosomes/ml, and 70% (7/10) at 5 trypanosomes/ml. Thus, sensitivity of mAECT-bc was increased at

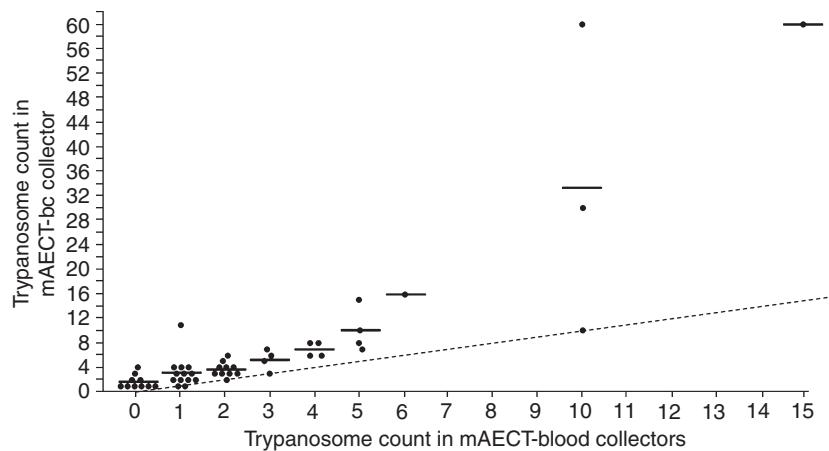


Figure 3 Comparison of trypanosomes counts in mAECT-blood and mAECT-bc collectors. Results are presented only for patients who were positive to at least one of the mini anion exchange centrifugation test (mAECT) protocols (55/57 patients). Furthermore, as an accurate estimation of parasite number is difficult to estimate when a large number of trypanosomes are recovered in collectors, we limited the statistical analysis to patients in whom parasite counts in mAECT-blood was < 15 (50/55 patients). For parasite counts that were > 15 in mAECT-blood collectors, parasite counts in mAECT-bc were usually too high to be accurately evaluated and thus were not included. The horizontal bars represent the mean of mAECT-bc parasite counts. The dotted line is the line $y = x$ above which parasite counts were higher in mAECT-bc than in mAECT-blood.

least five fold considering the last concentration with 100% positivity as the threshold of the test.

The mAECT-bc protocol was then evaluated in the field during a medical survey carried out in the Dubreka HAT focus. A total of 57 individuals were diagnosed as patients with HAT during this survey and were positive to at least one of the performed parasitological tests (lymph examination, mAECT-blood or mAECT-bc). Thirty-seven patients (64.9%) were positive to all tests, 2 (3.5%) were positive to lymph juice examination only and 5 (8.7%) were positive to mAECT-bc only (Figure 2). More patients were positive to mAECT-bc (96.5%) than to lymph juice examination (77.2%, $\chi^2 = 7.67, P = 0.005$) and mAECT-blood (78.9%, $\chi^2 = 6.93, P = 0.008$). The mean number of trypanosomes counted in collectors (Figure 3) was significantly higher for mAECT-bc (7.2 [3.8–11.9] *vs.* 2.6 [1.7–3.5], $P = 0.001$ by the paired *t*-test). This represented a gain of 4.5 trypanosomes per collector, rendering parasitological investigations quicker, easier and more reliable in the case of negative results.

The mAECT-bc method was very much appreciated by the field team and it is now included in the HAT diagnosis chain instead of mAECT-blood by the National Control Program of Guinea. Furthermore, being easier to read, it enabled the diagnostic of 8.7% more patients, compared to the diagnosis protocol relying on examination of lymph nodes and mAECT-blood. We are convinced that the introduction of mAECT-bc in Guinea will represent a significant advance for the control of the disease, without any additional cost. Further evaluation of mAECT-bc at larger scales in other *T. b. gambiense* endemic areas should now be encouraged.

Acknowledgements

We are particularly grateful to the technicians of the HAT NCP of Guinea for their help. This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement, the

French Ministry of Foreign Affairs (FSP/REFS Project, scholarship of Oumou Camara) and the World Health Organization.

References

- Büscher P, Mumba Ngoyi D, Kaboré J *et al.* (2009) Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**, e471.
- Camara M, Kaba D, KagbaDouno M, Sanon JR, Ouendeno FF & Solano P (2005) Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea: epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas. *Médecine Tropicale* **65**, 155–161.
- Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V & Büscher P (2005) Options for field diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **18**, 133–146.
- Lutumba P, Robays J, Miaka C *et al.* (2005) The efficiency of different detection strategies of human African trypanosomiasis by *T. b. gambiense*. *Tropical Medicine and International Health* **10**, 347–356.
- Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Kager PA, Lubega GW & Schallig HD (2009) Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 630–635.
- Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E *et al.* (2008) African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *International Journal of Parasitology* **38**, 589–599.
- Simarro PP, Jannin J & Cattand P (2008) Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Medicine* **5**, e55.
- Welburn SC, Maudlin I & Simarro PP (2009) Controlling sleeping sickness – a review. *Parasitology* **136**, 1943–1949.
- WHO (1998) Control and surveillance of African trypanosomiasis. *World Health Organization Technical Report Series* **881**, 1–113.

Corresponding Author Bruno Bucheton, Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Sub-humide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Tel.: +226 20 97 62 15; Fax: +226 20 97 23 20; E-mail: bruno.bucheton@mpl.ird.fr

Original article

Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forecariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness

Hamidou Ilboudo ^{a,b}, Vincent Jamonneau ^{a,b}, Mamadou Camara ^c, Oumou Camara ^c, Emilie Dama ^{a,b}, Mamadou Léno ^c, Frédéric Ouendeno ^c, Fabrice Courtin ^{a,b}, Hassane Sakande ^a, René Sanon ^b, Jacques Kaboré ^{a,b}, Bamoro Coulibaly ^d, Louis N'Dri ^d, Abdoulaye Diarra ^e, Eliezer N'Goran ^f, Bruno Bucheton ^{a,b,*}

^a Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

^b Institut de Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^c Programme National de Lutte contre la Trypanosomose Humaine Africaine, BP 851 Conakry, Guinée

^d Institut Pierre Richet, Unité de Recherche "Trypanosomoses", 04 BP 293 Abidjan 04, Côte d'Ivoire

^e World Health Organization, Regional Office for Africa, BP 820 Libreville, Gabon

^f URF Parasitologie et Ecologie Parasitaire, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Received 17 March 2011; accepted 13 May 2011

Available online 27 May 2011

Abstract

At a time when human African trypanosomiasis (HAT) elimination again seems a reachable goal in many parts of sub-Saharan Africa, it is becoming increasingly important to characterise the factors involved in disease resurgence or maintenance to develop sustainable control strategies. In this study conducted in the Forecariah mangrove focus in Guinea, HAT patients and serological suspects (SERO) were identified through mass screening of the population with the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) and were followed up for up to 2 years. Analysis of the samples collected during the follow-up of HAT patients and SERO was performed with PCR (TBR1/TBR2) and the trypanolysis serological test (TL) in order to clarify the role played by these individuals in the epidemiology of HAT. PCR positivity was higher in TL⁺ than in SERO TL⁻ (50% vs. 18%, respectively). Whereas CATT plasma titres decreased both in treated HAT patients and SERO TL⁻, SERO TL⁺ maintained high CATT titres. Four out of 17 SERO TL⁺ developed HAT during the study. These results strongly suggest that SERO TL⁺ individuals are asymptomatic carriers. In the context where disease prevalence is sufficiently low, treating SERO TL⁺ individual may thus be of crucial importance in order to cut transmission.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Human African trypanosomiasis; Epidemiology; *Trypanosoma brucei gambiense*; Host response; Control strategy

1. Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, is a disease of sub-Saharan Africa caused by two sub-

species of trypanosomes transmitted by tsetse flies, *Trypanosoma brucei gambiense* (West and Central Africa) and *Trypanosoma brucei rhodesiense* (East Africa), with *Tb. gambiense* causing more than 95% of all cases [1]. The disease is classically characterised by an early haemolymphatic phase (stage 1) followed by a meningoencephalitic phase (stage 2) leading to neurological disorders and death if left untreated. In the case of *Tb. rhodesiense*, wild and domestic animals play an important role in the transmission cycle, whereas for *Tb. gambiense* the main reservoir is the tsetse fly.

* Corresponding author. Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso. Tel.: +226 20 97 62 15; fax: +226 20 97 23 20.

E-mail address: bruno.bucheton@ird.fr (B. Bucheton).

gambiense the cycle is mostly human to human, although wild and domestic animals were also shown to be infected in some areas [2–4]. Therefore, control of *T.b. gambiense* HAT is highly dependent on mass screening of affected populations in an attempt to reduce the human parasite reservoir and disrupt transmission to tsetse flies [5]. This strategy resulted in a 69% reduction of new cases reported during the 1997–2006 period in *T.b. gambiense*-endemic areas [6]. The present number of cases is estimated between 50,000 and 70,000 [1], with reported new cases decreasing to less than the symbolic number of 10,000 in 2009 [7]. However, field observations in current active HAT foci, such as in the Guinean mangrove foci [8], in the mesophilic forests foci of Cote d'Ivoire [9,10] and in historical foci from Cameroon [11], have shown that while this strategy appeared to be efficient in lowering disease prevalence, the disease remains present in many areas despite repeated active surveillance and treatment. Furthermore, one should bear in mind that HAT was once believed almost eliminated in the 1960s [1]; nevertheless, with the subsequent halt in control programs the disease progressively flared up, returning to alarming levels at the end of the last century [12]. In the context of the disease elimination initiative recently launched by WHO [6], it is crucial to better understand the reasons underlying disease re-emergence and maintenance to ensure sustainable control and/or an elimination process.

HAT has for long and is still largely considered as a 100% fatal disease if left untreated. Yet both old field observations [13] and more recent studies [14] argue this is not the case. Infection by *T.b. gambiense* instead appears to result in a great diversity of clinical outcomes ranging from the rapid progression of the disease to stage 2 to asymptomatic infections that can last for years [15]. Indeed, in the *T.b. gambiense*-endemic area where mass screening of the population is routinely performed by the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) [16], a high proportion of individuals displaying positive serological results are negative to direct parasitological investigations. The parasitological status of these individuals, herein called serological suspects (SERO), remains unclear because (i) CATT positivity may be the result of cross reactions due to other infections [17], (ii) it is known that *T.b. gambiense* may occur in its human host at low parasitaemia levels and (iii) available parasitological tests have limited sensitivity and can only detect at best parasites at concentration of 10–50 parasites/ml of blood [18,19]. For these reasons, management of these individuals is still a controversial issue. Whereas it has been recommended to treat SERO with CATT end titres $\geq 1/16$ in some epidemic foci such as in Angola [20] or Southern Sudan [21], SERO are currently not treated by control programs in most endemic areas where the prevalence of disease is lower [17] as it is the case in Guinea. Several lines of evidence, however, indicate that at least part of the SERO subjects are indeed carriers of parasites but with very low parasitaemia, below the detection limit of parasitological tests, and may thus participate in the maintenance and re-emergence of disease in endemic areas [22]. Use of PCR methods to detect parasite DNA have shown that a high proportion of SERO subjects were positive

[23–25] and follow-up of SERO subjects showed that some of these individuals maintain long-lasting CATT responses without developing the disease [26]. Furthermore, application of the immune trypanolysis test (TL), a test that is highly specific of *T.b. gambiense* [27], to these subjects showed that a high number of SERO subjects were positive in areas of proven *T.b. gambiense* transmission [28]. Relying only on the CATT and parasitological tests results renders the SERO status heterogeneous as (i) the CATT reaction may not be specific, (ii) these individuals may be in the very early phase of infection and (iii) they may be asymptomatic carriers of parasites able to control blood parasitaemia to a very low level for long periods of time. Nevertheless, use of tools such as molecular diagnostic [29], TL and follow-up over time may help clarify this complex phenotype.

These tools were applied in this study, carried out in the Forecariah mangrove focus in Guinea, in order to characterise the diversity of *T.b. gambiense* infection outcomes and to optimise control strategies. A particular attention was paid to the evolution of the HAT status in SERO individuals. Four medical surveys were carried out between November 2007 and April 2010. Treated patients and SERO were then followed up for up to 2 years. In addition to the classical diagnosis procedure (CATT and direct parasitological investigations on blood, cervical lymph juice and cerebrospinal fluid), biological samples collected on the different visits were analysed by means of the TL and by a highly sensitive PCR targeting a 177-bp satellite DNA within the subgenus Trypanozoon [30].

2. Population and methods

2.1. Study area and medical surveys

The study was carried out in the Forecariah district, a mangrove area of Coastal Guinea situated at the border with Sierra Leone (Fig. 1a). The area is mainly inhabited by the Soussou ethnic group. Four active screening campaigns were carried out in November 2007, March 2008, October 2008 and April 2010. Prior to each campaign, a house-to-house census of the population was performed in which every household inhabitant as well as their gender and age was recorded in the villages visited. During the study's follow-up activities, the subjects were also seen at their homes by the field team in the villages visited (see below), as were individuals who were not present during the previous medical surveys. During the surveys, HAT was diagnosed by mass screening of the population by the CATT performed on capillary-collected blood. For each positive person, blood was collected in heparinised tubes and a two-fold plasma dilution series in CATT buffer was tested to assess the end titre, i.e. the highest dilution still positive. All individuals with a CATT plasma dilution end titre 1/8 or higher were submitted to lymph node aspirate microscopic examination whenever swollen lymph nodes were present and 350 μ l of blood was examined using the mini-anion exchange centrifugation test (mAECT) [18] for all. A subject was considered as an HAT patient if trypanosomes were detected by microscopy in at least one of the biological fluid

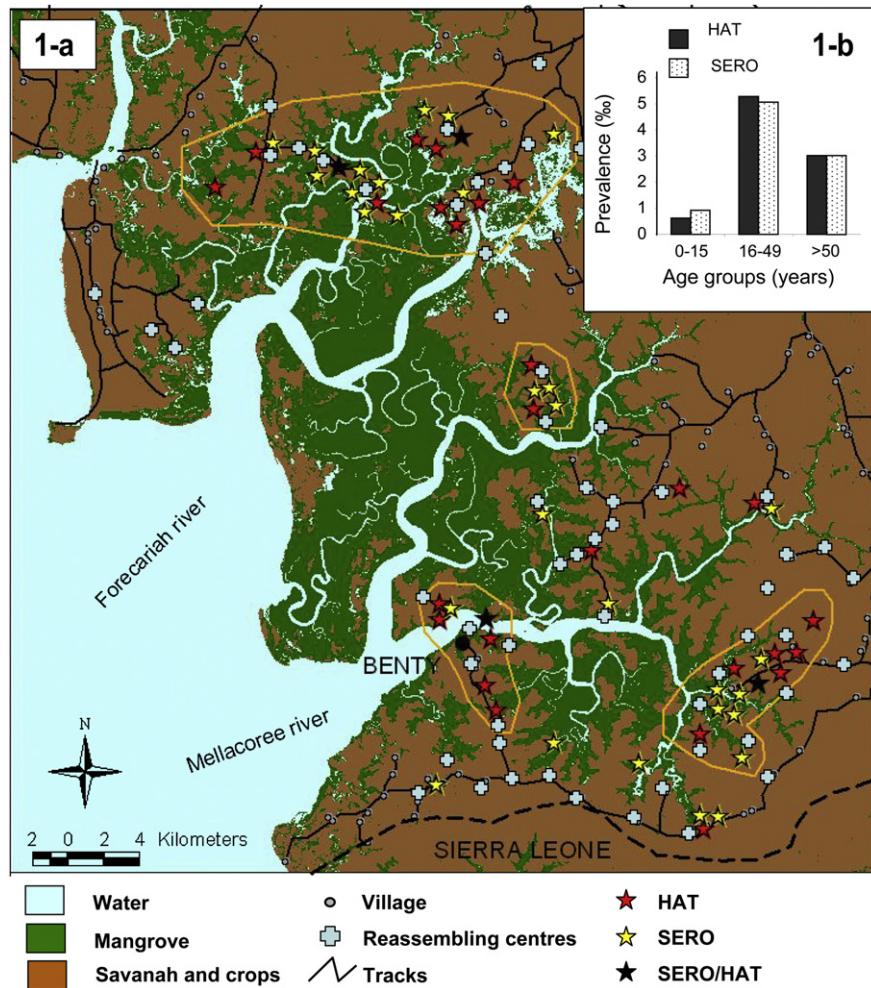


Fig. 1. Distribution of HAT and SERO subjects according to geography and age in the Forecariah focus. 1-a: Map of the area indicating the main vegetation types (savannah and mangrove), the location of reassembling centres for medical surveys and the geographic distribution of HAT patients, seropositive subjects (CATT $\geq 1/8$; SERO) and SERO subjects confirmed as HAT cases during their follow-up (SERO/HAT). 1-b: Prevalence of HAT and SERO subjects according to the different age groups.

tested. Leftover plasma, 500 μ l of blood and when possible lymph juice that remained in the sampling syringe ($\sim 5 \mu$ l) were frozen directly in the field at -20°C in a car freezer and were stored at -80°C at Centre International de Recherche-Développement pour l'Elevage en zone Sub-humide (CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso) until use. For all these subjects, a clinical form recording symptoms such as fever, headaches, loss of appetite, asthenia, presence of cervical lymph nodes or neurological disorders (daytime somnolence or nocturnal insomnia, presence of the palmomental reflex, sexual activity disturbance, abnormal movements such as tremors and psychiatric disorders such as confusion, mood changes, agitation, aggressive behaviours or euphoria) was filled out. In addition to HAT patient and SERO, a clinical form was also filled for 39 subjects attending the medical surveys who were found negative to the CATT performed on blood. They were selected from the same CATT blood series as HAT patients or SERO and were matched for age and gender. At the end of each survey (mass screening or follow-up), all parasitologically positive subjects were summoned to the Forecariah district

health department where a lumbar puncture was performed. Cerebrospinal fluid (CSF) white cell counts were determined and the parasite in the CSF was searched for using the modified simple centrifugation technique [31] performed with model mAECT collector tubes from the Institut National de Recherche Biologique (INRB, Kinshasa, Democratic Republic of Congo) [18]. Five hundred microliters of CSF were then frozen directly in the field at -20°C in a car freezer and were stored at -80°C at CIRDES. All HAT patients diagnosed within this study were then transferred to the Dubreka HAT treatment centre and were treated according to the NCP procedures. Patients with HAT stage 1 disease (CSF white cell counts, ≤ 5) were treated by daily injection of pentamidine for 8 consecutive days. Early stage 2 patients (CSF white cell counts, 6–20) were treated with one injection of pentamidine every 2 days for 20 days (10 injections total). Late stage 2 patients (CSF white cell counts, >20) were treated with three cycles of melarsoprol injections (one-third of the dose on the 1st day, two-thirds of the dose on the 2nd day and a full dose on days 3 and 4) administered 10 days apart.

2.2. Study subjects and follow-up activities

Due to the fact that the only HAT centre available in Guinea for the follow-up of treated patients is located 150 km away from the study area, the follow-up of study subject had to be made at their home at times when this was possible in regard of the political situation that prevailed in this country between 2009 and 2010. During each field trip in March 2008, October 2008 and April 2010, HAT patients or SERO (subjects displaying CATT plasma end titres $\geq 1/8$, but negative in parasitology) identified in the previous surveys were visited in their homes for follow-up. During the follow-up visits, CATT plasma titration, parasitological investigations and sampling were repeated as detailed above. A lumbar puncture was performed for all HAT patients on their first follow-up after treatment and was repeated on subsequent visits if elevated white cell counts were still observed. As it was not possible to follow strictly WHO recommendations for follow-ups (6, 12, 18 and 24 months) a patient was considered cured if no trypanosomes could be detected in body fluids and CSF white cell counts became ≤ 5 at least 6 months post-treatment [32].

2.3. Additional serological and parasitological investigations

In addition to the serological and parasitological investigations carried out in the field as described above, additional tests were performed at the CIRDES.

2.3.1. *T.b. gambiense* immune trypanolysis test

Cloned populations of *T.b. gambiense* variable antigen types (VATs) LiTat 1.3, LiTat 1.5 and LiTat 1.6 and one *T.b. rhodesiense* VAT (ETat 1.2R) were used to test collected plasmas as previously described [28]. ETat 1.2R was a control for the absence of nonspecific trypanolytic activity of the tested plasma. The test was considered positive (TL⁺) when positive with at least one of the three LiTat variants.

2.3.2. *TBR1/TBR2* diagnostic PCR

DNA was extracted from blood, lymph juice and CSF samples collected in the field. Lymph aspirates (5 μ l) were diluted in 200 μ l of PBS and were then processed with the DNeasy Tissue kit (Qiagen) according to the instructions provided by the manufacturer. CSF samples were centrifuged and the sediment resuspended in 200 μ l of PBS before carrying out DNA extraction as mentioned above. DNA extraction from blood and the *TBR1/TBR2* PCR on 10 μ l of DNA [30] were performed as previously described in Koffi et al. [25].

2.4. Statistical analysis

Prevalence of HAT and SERO in the different age groups was compared by means of the χ^2 test. For the other analyses, such as the distribution of clinical signs, the rate of PCR positivity and the progression of the serological status over time between the different HAT statuses, the Fisher exact test was used. *P*-values of 0.05 or less were considered significant.

2.5. Ethical considerations

All samples were collected within the framework of medical surveys conducted by the NCP according to the respective national HAT diagnostic procedures. No samples other than those collected for routine screening and diagnostic procedures were collected for the purposes of the present study. All participants were informed of the objectives of the study in their own language and signed a written informed consent form. For participants less than 18 years of age, informed consent was obtained from their parents. This study is part of a larger project aiming to improve HAT diagnosis for which approval was obtained from WHO (Research Ethics Review Committee) and Institut de Recherche pour le Développement (Comité Consultatif de Déontologie et d'Ethique) ethical committees.

3. Results

3.1. HAT geographic distribution and prevalence in the study area

In all, 12,867 persons were screened with the CATT either through active surveillance campaigns or people presenting spontaneously to the field team during the follow-up of the study subjects at their home (Table 1). According to the population census performed prior to the medical surveys, the proportion of the population screened varied between 70 and 80% in the 79 villages or hamlets that were visited within this study. A total of 27 individuals were initially confirmed as HAT cases. In addition, 31 SERO were identified. Among these SERO, four were confirmed as HAT patients during their follow-up (called SERO/HAT). Fourteen patients were diagnosed with late stage 2 disease, 12 were in early stage 2 and five were stage 1. Considering a total of 31 HAT cases

Table 1

Result of active diagnosis during medical surveys. Table shows the number of individuals screened with CATT, the number of HAT patients (positive in parasitology), the number of seropositive subjects (with CATT end titres $\geq 1/8$ but negative to parasitological tests, called SERO) and the number of villages visited in the Forecariah Focus.

Period	Field activities	Population screened	HAT cases	SERO	Village visited
November 2007	Survey ^a	7586	13	16	30
March 2008	Survey	3763	5	11	29
	Follow-up ^b	104	1	3	—
October 2008	Survey	571	2	0	7
	Follow-up	294	3	1	—
	SERO/HAT ^c		1		
April 2010	Survey	357	3	0	13
	Follow-up	192	0	0	—
	SERO/HAT		3		
Total		12,867	31	31	79

^a Individuals surveyed during classical mass screening of the village population.

^b Individuals absent during previous medical surveys but tested during follow-up activities.

^c Seropositive subjects that developed HAT during their follow-up.

diagnosed during the study (27 HAT + four SERO/HAT), the overall prevalence was 2.4 cases per 1000 inhabitants, indicating a low endemic profile of HAT in the Forecariah focus but with prevalence reaching up to 1% in some villages (data not shown). Most villages visited were at the mangrove/mainland interface which is believed to be the site of human contact with tsetse flies. Nevertheless, HAT patients and SERO were unevenly distributed both at the geographic scale and among the different age groups (Fig. 1). Both HAT patients and SERO seemed to be clustered in geographically restricted areas and the prevalence of disease was 8.6 times higher (5.27%) in the active population (16–49 years) as compared to the 0- to 15-year-old age group (0.61%; $p < 0.0001$). Prevalence of HAT was also higher in the 16- to 49-year-old age group than in older subjects (≥ 50 years old), although the difference was not significant. It is noteworthy that similar observations also hold for SERO. No significant differences were noted between females and males with respect to HAT or seropositivity.

3.2. Diagnostic features in the Forecariah focus

A striking feature of HAT in Forecariah is that only seven of 31 (22%) individuals diagnosed as HAT patients in this study tested positive to mAECT (Table 2), although parasite DNA could be detected by PCR in the blood of 84% of them. On the contrary, all but one HAT patients harboured cervical lymph nodes and trypanosomes were detected by microscopy in lymph juice in 60, 83 and 93% of patients with stage 1, early stage 2 and late stage 2 HAT, respectively. A predominance of patients displaying involvement of the central nervous system was observed: 84% of HAT patients were diagnosed with stage 2 disease and trypanosomes were evidenced by microscopy in the CSF in two (17%) and nine (64%) early stage 2 and late stage 2 patients, respectively. PCR carried out on CSF samples were positive in 1 (20%), 8 (66%) and 13 (93%) stage 1, early stage 2 and late stage 2 patients respectively. In almost half of the individuals (31/58) with

CATT plasma titres 1/8 or higher, no trypanosomes could be detected by microscopy at the initial diagnosis. Of these 31 SERO, 12 were negative to TL. As all parasitologically confirmed HAT patients, the remaining 19 SERO tested positive to TL, indicating a contact with *T. b. gambiense*.

Analysis of clinical signs in HAT patients, SERO individuals negative or positive to TL and CATT-negative endemic controls are presented in Fig. 2. All symptoms recorded except fever were significantly more often reported in HAT patients as compared to CATT-negative endemic controls. This was particularly true for neurological disorders owing to the high proportion of patients with stage 2 disease. Fever, recurrent headaches and to a lesser extent asthenia were not good markers of HAT since most CATT-negative individuals complained of these nonspecific symptoms. No significant differences were observed between controls and SERO with respect to the recorded symptoms, with the exception of the presence of cervical lymph nodes that were more elevated in SERO TL⁺ (42.1%) as compared to CATT-negative controls (5.1%; $p = 0.001$).

3.3. Temporal evolution of HAT status in study subjects

An important aspect of the work was the follow-up of study subjects in order to better characterise the status of SERO subjects and HAT patients after treatment. Among the 27 HAT patients initially diagnosed during medical surveys, three were not followed up (those diagnosed during the last field trip in April 2010); five were seen once, 11 were seen twice and eight were seen three times. The shortest and longest follow-up periods were 11 months (two individuals) and 30 months (ten individuals) respectively, depending on the availability of the study subjects at the time of visits and their date of diagnosis. For the 31 SERO, seven, 14 and seven subjects received one, two and three follow-up visits, respectively, of which 12 were followed up for a maximum period of 30 months and five for a minimum period of seven months. One was lost to follow-up (left the area); one refused the follow-up

Table 2

Diagnostic specificities in the Forecariah focus. The table shows the number and percentage of HAT patients with enlarged lymph nodes, the results of the parasitological tests carried out (at diagnosis or upon follow-up after treatment) with direct examination of cervical lymph juice, mAECT^a, examination of CSF^b samples using the modified simple centrifugation technique and the TBR1/TBR2 PCR on DNA extracted from blood or CSF. Mean white cell counts in CSF samples are also given. For post-treatment, results are given according to the last CSF control performed after treatment ranging from 7 to 26 months. Results are given according to the different stages of the disease: I = Stage 1 patients (white cell counts ≤ 5 in CSF); II-early = early stage 2 patients (white cell count between 6 and 20 cells in CSF and/or presence of trypanosome in CSF); II-late (late stage 2 patients; white cell count > 20 in CSF).

Stage	At inclusion						Post-treatment		
	N	Lymph nodes	Trypanosome detected in			PCR positive in	CSF cell counts [range]	N	Trypanosomes in CSF
			Lymph nodes	Blood	CSF				
I	5	4 (80%)	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	3.6 [2–5]	3 0 (0%)
II-early	12	12 (100%)	10 (83%)	3 (25%)	2 (17%)	11 (92%)	8 (66%)	10 [0–20] ^c	9 0 (0%)
II-late	14	14 (100%)	13 (93%)	2 (14%)	9 (64%)	11 (79%)	13 (93%)	115.7 [21–371]	13 0 (0%)
Total	31	30 (97%)	26 (84%)	7 (22%)	11 (35%)	26 (84%)	22 (71%)		25 0 (0%)

^a Mini-anion exchange centrifugation test.

^b Cerebrospinal fluid.

^c White cell count range in early stage II patients is [0–20] because one patient had trypanosomes detected in the CSF but with a white cell count equal to zero. He was considered as an early stage II patient and was treated accordingly.

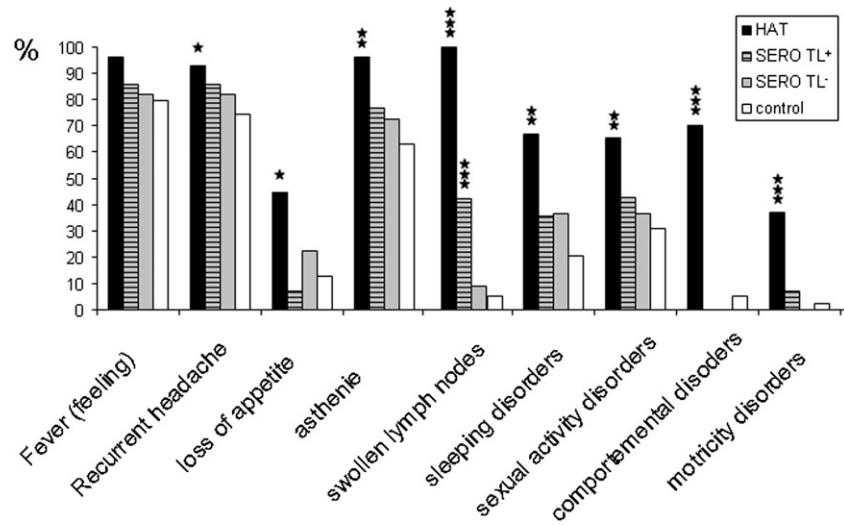


Fig. 2. Distribution of clinical signs according to HAT status. The histogram represents the prevalence of the different clinical signs recorded for the different HAT statuses: HAT patients (HAT; $n = 27$); seropositive individuals positive to TL (SERO TL $^{+}$; $n = 19$); seropositive individuals negative to TL (SERO TL $^{-}$; $n = 12$) and CATT-negative endemic controls (control; $n = 39$). Significant differences from the control group are indicated by a star (3 stars when $P \leq 0.0001$; two stars when $P \leq 0.001$ and one star when $P \leq 0.05$).

visits and one was deceased at the time of his first visit. All HAT patients responded well to treatment with respect to the fact that no trypanosome was detected in any of the CSF samples examined post-treatment and that all had CSF white cell counts returning to normal during their follow-up (Table 2). All HAT patients that could be followed up in the frame of this study had CSF white cell counts ≤ 5 at least six month after

treatment at the exception of one early stage 2 patient, in whom CSF WBC increased to 67 during his first follow-up (7 month), despite clinical improvement, but then became negative after 26 months. In HAT patients, we observed an overall general decrease in CATT titres after treatment, with 70.8% of the subjects evolving to CATT titres less than 1/8 during their follow-up (Fig. 3). All tested positive to at least

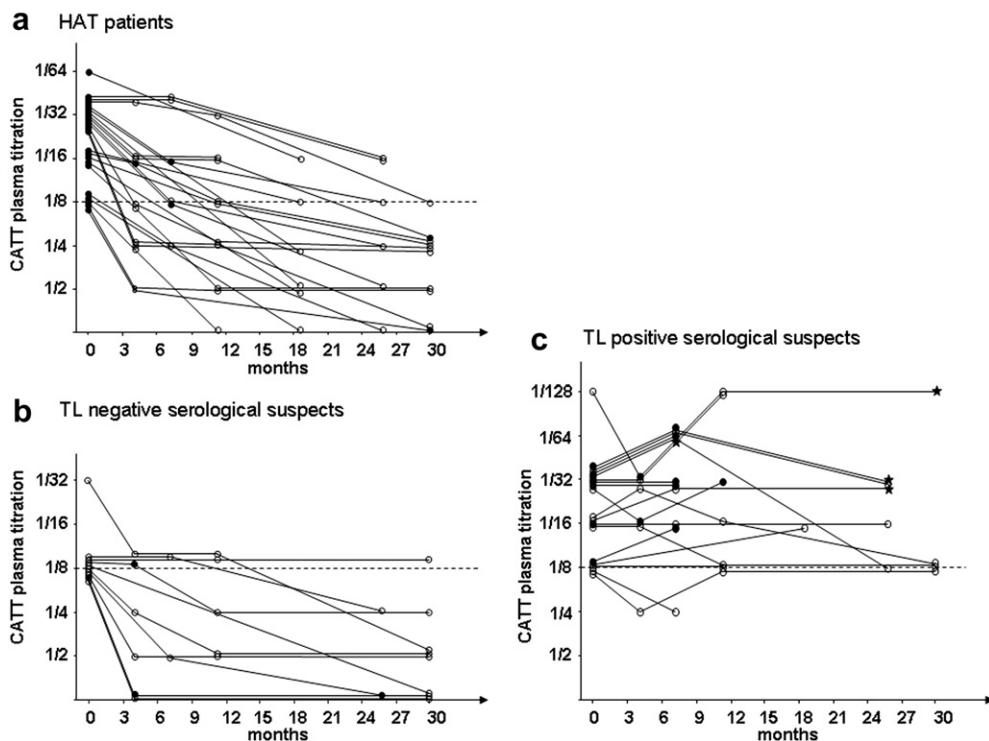


Fig. 3. Follow-up of study subjects in the Forecariah focus. The progression over time of CATT end titres is presented for HAT patients upon diagnosis and after treatment (3-a), SERO TL $^{-}$ subjects (3-b) and SERO TL $^{+}$ subjects (3-c). Plain circles indicate TBR1/TBR2 PCR positivity of either blood or lymph juice extracted DNA; black stars indicate that trypanosomes were found in body fluids (lymph juice, blood or cerebrospinal fluid).

one LiTat variable antigen and remained positive throughout their follow-up (data not shown). In all patients tested, the TBR1/TBR2 PCR became negative after 11 months and remained negative until the end, with the exception of two patients, diagnosed with late stage 2 disease and treated with melarsoprol, in whom positivity to TBR1/TBR2 was observed again after 30 months. All but one SERO TL[−] became serologically negative (CATT < 1:8) during their follow-up (90%) and positivity to the TBR1/TBR2 PCR was observed at least once in four (25%). In sharp contrast, all but one SERO TL⁺ remained with elevated CATT titres 1/8 or higher throughout their follow-up (94.1%), and positivity to TBR1/TBR2 was observed at least once in half of the study subjects (52.6%). Maintenance of high CATT titres ($\geq 1/8$) was highly associated with the SERO TL⁺ group of subjects as compared with the SERO TL[−] group ($p < 0.0001$) or patients after treatment ($p < 0.0001$). Although the highest in SERO TL⁺, the proportion of subjects detected positive by PCR during their follow-up was not significantly different from SERO TL[−] subjects ($p = 0.15$), in part due to the small sample size used in this comparison ($n = 31$). Overall, however, positivity to TBR1/TBR2 was significantly higher ($p = 0.022$) in blood samples collected during the follow-up of SERO TL⁺ subjects (18/51) as compared to samples collected from SERO TL[−] subjects (4/33) or samples collected from HAT patients after treatment (5/49; $p = 0.003$). As in HAT patients, the TL status remained stable over time in SERO subjects (i.e. TL-negative and -positive subjects remained so over the entire follow-up period). Importantly, four (12.9%) SERO subjects developed HAT (i.e. the parasite was detected in body fluids by microscopy) during their follow-up: one was confirmed on his first follow-up (seven month), two on their second (26 month) and one on his third (30 month). One was diagnosed with stage 1 disease and three with early stage 2 disease as determined by the analysis of CSF samples. All four subjects were from the SERO TL⁺ group, had palpable cervical lymph nodes since their inclusion and TBR1/TBR2 positivity was detected in three out of four prior to their diagnosis.

4. Discussion

Although HAT is generally considered to be 100% fatal if left untreated, increasing evidence suggests that contrasting outcomes results from infection by *T.b. gambiense* [13,14]. Among the striking features of HAT epidemiology is the existence of individuals displaying high responses to the CATT who are apparently aparasitaemic (here called SERO subjects). Whereas several studies have shed light on this particular phenotype, suggesting the possible existence of asymptomatic carriers of the parasite [22,26] and that trypanotolerance occurs in humans, as already described in mice and cattle [33], uncertainties remain with respect to their parasitological status, the nature of the host response directed against trypanosomes in such subjects and their potential role in parasite transmission [15]. We report here on a longitudinal study aimed at comparing, in the Forecariah HAT focus in Guinea, the evolution of the parasitological status and of the

serological response between HAT patients after treatment, SERO TL⁺ and SERO TL[−] individuals.

4.1. The HAT epidemiological pattern in the Forecariah focus

The results of the medical surveys conducted between November 2007 and April 2010 indicate an overall prevalence of 2.4 HAT cases per 1000 inhabitants, indicative of low or moderate transmission rates. Such foci should become increasingly common along with the HAT elimination campaigns led in sub-Saharan Africa [1,6] and it therefore appears important in this context to characterise which factors may favour HAT maintenance in order to develop strategies for sustainable control or elimination of HAT in such foci. In Forecariah, the disease seems to be clustered in certain restricted mangrove areas with the active population (15–49 years old) being by far the most affected by the disease, suggesting that transmission does not occur in the peridomestic space but instead during human activities taking place in the mangrove. Consistent with this view is the analysis of the population's daily mobility in the Forecariah focus, which showed that HAT patients were characterised by a higher number of occupational sites in the mangrove as compared to matched controls [34]. Interestingly, the distribution of HAT and SERO subjects was quite similar both at the geographic scale and according to age group, suggesting that some determinants are common to both classes of individuals; presumably exposure to infected tsetse flies. Since tsetse flies are present throughout the mangrove area, this result suggests that transmission of the parasite only occurs in certain specific and restricted foci. Targeting vector control to these areas could therefore have a noticeable impact on reducing *T.b. gambiense* transmission in the Forecariah focus.

4.2. Diagnosis and treatment specificities

Whereas nearly all patients were positive on cervical lymph node microscopic investigations, only 22% tested positive on mAECT. This in contrast with other West African HAT foci such as those from Côte d'Ivoire [35] or the Dubreka focus [19] some 150 km north on the Guinean coast, where the majority of HAT patients (>75%) are positive to mAECT. This observation indicates that blood parasitaemia are lower in Forecariah. This could possibly be related to parasite virulence and/or tissue tropism specificities in this particular focus. Recently, we have shown that sensitivity of mAECT could be increased fivefold by using buffy coats instead of blood [19]. Application of this new procedure should thus increase diagnosis sensitivity in such areas. A predominance of patients with stage 2 disease (84%) was also observed. This is possibly related to the suspected low transmission rates in this focus, which would be in agreement with the fact that few individuals have been infected recently. An alternative explanation, however, could be that trypanosomes from this focus induce infections with a rapid involvement of the central nervous system. We did not observe any treatment failures in the frame

of this study with any of the treatment schedules used by the National Control Program. In Guinea early stage 2 patients are treated with pentamidine in order to reduce significantly the risk of reactive arsenical encephalopathy and death at the treatment centre. This strategy has been reported to be efficient by several studies [36–38] while others reported a significant relationship between elevated CSF white cell counts (11–20 cell/ μ l) and the risk of relapse [39,40]. Our results suggest that in Guinea treatment of early stage 2 patients with pentamidine is an efficient alternative to melarsoprol although this point should be addressed more accurately on a larger cohort of patients. This problem should however soon be solved by the fact that the less toxic NECT treatment [41] has now been approved in this country.

4.3. Treating SERO TL⁺ individuals appears important to interrupt transmission

An important aspect of the work was to provide a better characterisation of apparently aparasitaemic SERO individuals with high CATT titres who constitute a high proportion of subjects found during medical surveys (in the present study, half of subjects with CATT end titre $\geq 1/8$ were negative on parasitological tests). Application of TL proved that to a large extent (19/31) these individuals indeed experienced previous infection/contact with *T.b. gambiense*. CATT positivity in TL[−] individuals may instead be attributed to cross reactions with other infections, as shown by the rapid decrease of CATT titres in this last category of subjects. On the contrary, and unlike in HAT patients after treatment, in whom a general decrease in the CATT response was associated with a disappearance of parasite DNA in blood; most of the SERO TL⁺ subjects maintained high CATT responses over time (30 months for the longest follow-ups). Furthermore, parasite DNA was detected from time to time in half of them, suggesting that latent parasite infections, characterised by low blood parasitaemia, occur in SERO TL⁺ individuals and are responsible for the maintenance of the serological responses. These subjects reported no clinical symptoms more often than endemic CATT-negative individuals, although cervical lymph nodes were present in 42.1% of them, again suggesting the occurrence of subclinical infections in these individuals. In agreement with the fact that SERO TL⁺ subjects are indeed infected by *T.b. gambiense* and can thus be considered asymptomatic carriers of the parasite, is the fact that four of them developed HAT during their follow-up. They furthermore constitute a good illustration of the impact SERO subjects can have in the maintenance of transmission in HAT foci within HAT control strategies targeting HAT patients only.

Our results strongly suggest that HAT patients to which control strategies are targeted only represent part of the infected individuals in endemic areas. This assumption has recently been put forward by a parasite population genetic study conducted in the HAT foci of Guinea and Côte d'Ivoire that showed that the estimated parasite effective clonal population size appeared to be higher than the corresponding

observed local prevalence of HAT [42]. In the perspective of a sustainable control strategy and/or an elimination process it thus appears important to treat SERO TL⁺ individuals in order to interrupt transmission in HAT foci. Whether SERO TL⁺ individuals are infective to tsetse flies is currently unknown and would deserve further attention because it was shown that *T.b. brucei* chronically infected cattle in which parasites are nearly undetectable in blood are still infective for tsetse flies [43]. Xenodiagnostic procedures, using reared tsetse flies, applied to these individuals could help resolving this issue. Furthermore, the observation of a decrease in CATT titres after the treatment of SERO TL⁺ individuals, as observed in HAT patients, would definitively prove that these subjects are indeed asymptomatic carriers of parasites. If left untreated, establishing vector control measures in the daily life sites frequented by SERO TL⁺ individuals in the mangrove area may help control transmission of *T.b. gambiense* to tsetse flies. Follow-up of these subjects is also strongly recommended as we have shown that at least part of them will develop HAT.

4.4. Uncertainties remain on the nature of the host response in SERO TL⁺ individuals

An important question is also related to the nature of the host response in these SERO TL⁺ subjects who are apparently able to control infection. Indeed, to date all studies have focused on the host response observed in patients in the different stages of the disease or in comparison to healthy endemic controls, but nothing is known on the response developed by seropositive individuals. Understanding why individuals are naturally able to resist infection and the knowledge of the host molecules or pathways involved could open the way to identifying new therapeutic or prophylactic targets. Both immunological and genetic analysis of cohorts of well-characterised seropositive subjects and patients from the different HAT foci in Guinea are currently underway and will provide new insights into the mechanisms of trypanotolerance in humans in the near future. Such work should also be extended to other endemic areas such as Central Africa in order to provide a broader view of trypanotolerance in HAT.

Acknowledgements

We would like to thank all study subjects for their kindness with the field team, their active participation in the organisation of the field work and their precious help in the sensitisation of the population during medical surveys. We are also very grateful to the Forecariah District Health Department (DPS Forecariah) medical team who participated actively in all the field activities organised within this study. This study was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the French Ministry of Foreign Affairs through the FSP/REFS project and the World Health Organization (WHO).

References

- [1] R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, C. Burri, Human African trypanosomiasis, *Lancet* 375 (2010) 148–159.
- [2] F. Njiokou, C. Laveissiere, G. Simo, S. Nkini, P. Grebaut, G. Cuny, S. Herder, Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon, *Infect. Genet. Evol.* 6 (2006) 147–153.
- [3] F. Njiokou, H. Nimpaye, G. Simo, G.R. Njitchouang, T. Asonganyi, G. Cuny, S. Herder, Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon, *Parasite* 17 (2010) 61–66.
- [4] F. Noireau, J.P. Gouteux, A. Toudic, F. Samba, J.L. Frezil, Epidemiological importance of the animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Congo. 1. Prevalence of animal trypanosomiasis in the foci of sleeping sickness, *Trop. Med. Parasitol.* 37 (1986) 393–398.
- [5] S.C. Welburn, I. Maudlin, P.P. Simarro, Controlling sleeping sickness – a review, *Parasitology* 136 (2009) 1943–1949.
- [6] P.P. Simarro, J. Jannin, P. Cattand, Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Med.* 5 (2008) e55.
- [7] P.P. Simarro, G. Cecchi, M. Paone, J.R. Franco, A. Diarra, J.A. Ruiz, E. M. Fevre, F. Courtin, R.C. Mattioli, J.G. Jannin, The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases, *Int. J. Health Geogr.* 9 (2010) 57.
- [8] M. Camara, D. Kaba, M. KagbaDouno, J.R. Sanon, F.F. Ouendeno, P. Solano, Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea: epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas, *Med. Trop. (Mars)* 65 (2005) 155–161.
- [9] N.N. Dje, T.W. Miezan, P. N'Guessan, P. Brika, F. Doua, F. Boa, Geographic distribution of trypanosomiasis treated in Ivory Coast from 1993 to 2000, *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 95 (2002) 359–361.
- [10] D. Kaba, N.N. Dje, F. Courtin, E. Oke, M. Koffi, A. Garcia, V. Jamonneau, P. Solano, The impact of war on the evolution of sleeping sickness in west-central Côte d'Ivoire, *Trop. Med. Int. Health* 11 (2006) 136–143.
- [11] T. Asonganyi, C. Hengy, J.P. Louis, N.A. Ghogomu, Reactivation of an old sleeping sickness focus in Mamfe (Cameroon): epidemiological, immunological and parasitological findings, *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 39 (1991) 55–62.
- [12] WHO, control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee, WHO Technical Report Series 881 (1998).
- [13] F. Checchi, J.A. Filipe, M.P. Barrett, D. Chandramohan, The natural progression of *Gambiense* sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (2008) e303.
- [14] J.M. Sternberg, L. Maclean, A spectrum of disease in Human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence, *Parasitology* 137 (2010) 2007–2015.
- [15] B. Bucheton, A. Macleod, V. Jamonneau, Human host determinants influencing the outcome of *T. b. gambiense* infections, *Parasite Immunol.* (2011), doi:10.1111/j.1365-3024.2011.01287.x.
- [16] E. Magnus, T. Vervoort, N. Van Meirvenne, A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis, *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 58 (1978) 169–176.
- [17] F. Chappuis, L. Loutan, P. Simarro, V. Lejon, P. Buscher, Options for field diagnosis of Human African trypanosomiasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 133–146.
- [18] P. Buscher, D. Mumba Ngoyi, J. Kabore, V. Lejon, J. Robays, V. Jamonneau, N. Bebronne, W. Van der Veken, S. Bieler, Improved models of mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) e471.
- [19] M. Camara, O. Camara, H. Ilboudo, H. Sakande, J. Kabore, L. N'Dri, V. Jamonneau, B. Bucheton, Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test, *Trop. Med. Int. Health* 15 (2010) 796–799.
- [20] P.P. Simarro, J.A. Ruiz, J.R. Franco, T. Josenando, Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological confirmation in the African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*) focus of Quicama (Angola), *Trop. Med. Int. Health* 4 (1999) 858–861.
- [21] F. Chappuis, E. Stivanello, K. Adams, S. Kidane, A. Pittet, P.A. Bovier, Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among serologically suspected individuals in southern Sudan, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71 (2004) 313–317.
- [22] A. Garcia, D. Courtin, P. Solano, M. Koffi, V. Jamonneau, Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics, *Trends Parasitol.* 22 (2006) 405–409.
- [23] M. Kabiri, J.R. Franco, P.P. Simarro, J.A. Ruiz, M. Sarsa, D. Steverding, Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7, *Trop. Med. Int. Health* 4 (1999) 658–661.
- [24] G.D. Kanmogne, T. Asonganyi, W.C. Gibson, Detection of *Trypanosoma brucei gambiense*, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90 (1996) 475–483.
- [25] M. Koffi, P. Solano, M. Denizot, D. Courtin, A. Garcia, V. Lejon, P. Buscher, G. Cuny, V. Jamonneau, Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop.* 98 (2006) 183–188.
- [26] A. Garcia, V. Jamonneau, E. Magnus, C. Laveissiere, V. Lejon, P. N'Guessan, L. N'Dri, N. Van Meirvenne, P. Buscher, Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population, *Trop. Med. Int. Health* 5 (2000) 786–793.
- [27] N. Van Meirvenne, E. Magnus, P. Buscher, Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*, *Acta Trop.* 60 (1995) 189–199.
- [28] V. Jamonneau, B. Bucheton, J. Kabore, H. Ilboudo, O. Camara, F. Courtin, P. Solano, D. Kaba, R. Kambire, K. Lingue, M. Camara, R. Baelmans, V. Lejon, P. Buscher, Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) e917.
- [29] S. Deborggraeve, P. Buscher, Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient? *Lancet Infect. Dis.* 10 (2010) 433–439.
- [30] D.R. Moser, G.A. Cook, D.E. Ochs, C.P. Bailey, M.R. McKane, J.E. Donelson, Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction, *Parasitology* 99 (Pt 1) (1989) 57–66.
- [31] T.W. Miezan, H.A. Meda, F. Doua, N.N. Dje, V. Lejon, P. Buscher, Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed Pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 (2000) 293.
- [32] D. Mumba Ngoyi, V. Lejon, P. Pyana, M. Boelaert, M. Ilunga, J. Menten, J.P. Mulunda, S. Van Nieuwenhove, J.J. Muyembe Tamfum, P. Buscher, How to shorten patient follow-up after treatment for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness, *J. Infect. Dis.* 201 (2010) 453–463.
- [33] S.J. Kemp, A.J. Teale, Genetic basis of trypanotolerance in cattle and mice, *Parasitol. Today* 14 (1998) 450–454.
- [34] F. Courtin, V. Jamonneau, M. Camara, O. Camara, B. Coulibaly, A. Diarra, P. Solano, B. Bucheton, A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem, *Trop. Med. Int. Health* 15 (2010) 881–889.
- [35] P. Truc, V. Jamonneau, P. N'Guessan, P.B. Diallo, A. Garcia, Parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis: a comparison of the OBC and miniature anion-exchange centrifugation techniques, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92 (1998) 288–289.
- [36] F. Doua, T.W. Miezan, J.R. Sanon Singaro, F. Boa Yapo, T. Baltz, The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55 (1996) 586–588.
- [37] J. Pepin, F. Milord, The treatment of human African trypanosomiasis, *Adv. Parasitol.* 33 (1994) 1–47.
- [38] A. Stanghellini, T. Josenando, The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity, *Trop. Med. Int. Health* 6 (2001) 330–334.

- [39] V. Lejon, D. Legros, A. Savignoni, M.G. Etchegorry, D. Mbulamperi, P. Buscher, Neuro-inflammatory risk factors for treatment failure in “early second stage” sleeping sickness patients treated with pentamidine, *J. Neuroimmunol.* 144 (2003) 132–138.
- [40] J.A. Ruiz, P.P. Simarro, T. Josenando, Control of human African trypanosomiasis in the Quicama focus, Angola, *Bull. World Health Organ.* 80 (2002) 738–745.
- [41] G. Priotto, S. Kasparian, W. Mutombo, D. Ngouama, S. Ghorashian, U. Arnold, S. Ghabri, E. Baudin, V. Buard, S. Kazadi-Kyanza, M. Ilunga, W. Mutangala, G. Pohlig, C. Schmid, U. Karunakara, E. Torreele, V. Kande, Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial, *Lancet* 374 (2009) 56–64.
- [42] M. Koffi, T. De Meeus, B. Bucheton, P. Solano, M. Camara, D. Kaba, G. Cuny, F.J. Ayala, V. Jamonneau, Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 (2009) 209–214.
- [43] P. Van den Bossche, A. Ky-Zerbo, J. Brandt, T. Marcotty, S. Geerts, R. De Deken, Transmissibility of *Trypanosoma brucei* during its development in cattle, *Trop. Med. Int. Health* 10 (2005) 833–839.