REPARTITION ET PROPAGATION DE LA TRYPANOSOMIASE HUMAINE AFRICAINE : INTERET DE L'IDENTIFICATION GENETIQUE DES TRYPANOSOMES

P. TRUC, G. CUNY

Med. Trop. 2001 ; **61** : 433-436

RESUME • De nombreux facteurs extrinsèques au trypanosome peuvent contribuer à expliquer la distribution et la propagation de la trypanosomiase humaine africaine ou THA. Ils sont cependant difficilement quantifiables. Par contre, l'identification des trypanosomes et la distinction de *Trypanosoma brucei rhodesiense* de *Trypanosoma brucei gambiense* d'une part, puis la détermination de différents génotypes au sein de chaque sous-espèce chez l'hôte et le vecteur permettent de suivre l'évolution et la propagation de la THA par le « traçage » des parasites, et par conséquent de l'hôte ou du vecteur. Le rôle de l'hôte vertébré dans la distribution et la propagation de la THA a pu être confirmé grâce à l'identification génétique des trypanosomes. Cependant, bien que les techniques biomoléculaires soient de plus en plus performantes, il est impératif d'effectuer ces identifications sur les réelles populations naturelles de trypanosomes qui circulent dans les liquides biologiques de l'hôte et chez le vecteur pour éviter le biais dû à l'isolement des trypanosomes *in vivo* ou *in vitro*.

MOTS-CLES • Trypanosomiase Humaine Africaine - Endémie et épidémie - Marqueurs génétiques.

VALUE OF GENETIC IDENTIFICATION OF TRYPANOSOMES FOR ASSESSING THE DISTRIBUTION AND SPREAD OF HUMAN AFRICAN TRYPANOSOMIASIS

ABSTRACT • Numerous factors extrinsic to trypanosome populations have been implicated in the distribution and spread of human African trypanosomiasis (HAT), but quantification of these factors has proven difficult. An easier method of monitoring HAT consists of tracking parasites by genetic identification of trypanosomes in hosts and vectors. This method requires distinction between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei gambiense* followed by determination of the genotype of each subspecies in the host and vector. The role of vertebrate hosts in the distribution and spread of HAT has been confirmed by genetic identification of trypanosomes. Despite the ever-improving performance of biomolecular techniques, identification must be carried out on natural populations actually circulating in the biological fluids of the host and vector. This precaution is necessary to rule out the biasing effect of in vivo or in vitro isolation of trypanosomes.

KEY WORDS • Human African trypanosomiasis - Endemic and epidemic outbreak - Genetic markers.

La maladie du sommeil ou Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) est provoquée par la transmission puis la multiplication chez l'homme de trypanosomes de l'espèce *Trypanosoma brucei*. Le cycle inclut de façon certaine un réservoir animal sauvage et domestique pour la forme aiguë dite rhodésienne (due à *Trypanosoma brucei rhodesiense*). Un réservoir animal a aussi été décrit pour la forme chronique dite gambienne (due à *Trypanosoma brucei gambiense*), mais son rôle en termes de transmission reste encore à préciser. Quelle que soit la sous-espèce, y compris *Trypanosoma brucei brucei* non pathogène pour l'homme, ces trypanosomes sont morphologiquement identiques. Le vecteur, la glossine ou mouche tsétsé, diffère selon la localisation géographique. En Afrique de l'Ouest et Centrale, le groupe *palpalis* a besoin de beaucoup d'humidité, ce qui explique sa présence à proximité des cours d'eau. Ces glossines se nourrissent préférentiellement sur l'homme, en particulier grâce à un contact fréquent homme-glossine. Ainsi, l'homme est-il le principal réservoir de THA pour la forme chronique, bien que le réservoir animal puisse aussi avoir un rôle dans la transmission active. L'importance d'un réservoir actif, l'homme, contribue à expliquer, en l'absence de traitement des malades, les épisodes épidémiques auxquels nous assistons par exemple aujourd'hui en Guinée, en Angola, en République Démocratique du Congo et au Congo. La transmission de la forme rhodésienne en Afrique de l'Est est faite par des espèces de glossines de savane du groupe *morsitans*. Ces glossines vivent dans de vastes zones beaucoup plus sèches

• *Travail de l'Unité de Recherche 035 de l'Institut de Recherche pour le Développement (P.T., chargé de Recherches, G.C. Directeur de Recherches et Directeur de l'UR 035).*

• *Correspondance : P. TRUC., Laboratoire d'Etude de la chimiosensibilité des trypanosomes, OCEAC, BP 288, Yaoundé, Cameroun • e-mail : truc@iccnet.cm •*

• *Article sollicité.*

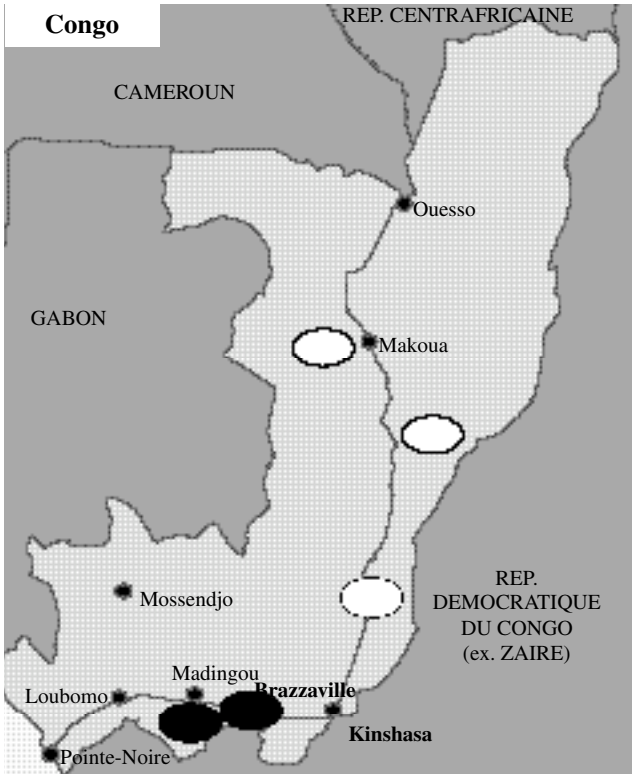
et préfèrent se nourrir sur des animaux sauvages et domestiques. Le contact homme-glossine est beaucoup plus rare que pour la forme gambienne et c'est généralement l'homme qui devient un hôte accidentel. Dans ce contexte, l'épidémisation de la THA semble plus difficile. Cependant, la situation est différente lorsque *Trypanosoma brucei rhodesiense* est transmis par des glossines forestières (*Glossina fuscipes*) rendant ainsi l'épidémisation de la THA possible. Ce contexte épidémiologique pourrait en partie expliquer les flambées épidémiques.

Mais d'autres facteurs contribuent également à l'épidémisation de la THA. L'absence de dépistage actif par arrêt ou impossibilité d'action des équipes mobiles (guerre, situation sanitaire et sociale), les déplacements importants de population (réfugiés), la virulence des trypanosomes ou encore l'évolution génétique des parasites, sont autant de facteurs aggravants. Inversement, l'isolement géographique de certaines régions, la sédentarisation des populations locales et le faible nombre d'individus allogènes s'installant dans ces régions renforcent l'endémicité de la maladie.

Ainsi, de nombreux facteurs extrinsèques au parasite peuvent contribuer à expliquer la distribution et la propagation de la THA. Ils sont cependant difficilement quantifiables. En revanche, l'identification des trypanosomes et la distinction de *Trypanosoma brucei rhodesiense* de *Trypanosoma brucei gambiense* d'une part, puis la détermination de différents génotypes au sein de chaque sous-espèce chez l'hôte et le vecteur sont possibles. Grâce à ces caractères intrinsèques des parasites, il est aisé de suivre à l'aide de marqueurs génétiques l'évolution et la propagation de la THA par le « traçage » des parasites, et par conséquent de l'hôte ou du vecteur.

Dans un premier temps, il était nécessaire de distinguer *Trypanosoma brucei gambiense* de *Trypanosoma brucei rhodesiense,* en particulier dans les zones d'Afrique de l'Est où les deux sous-espèces étaient et sont toujours en sympatrie. Dans ces régions, une simple identification de la sous-espèce par localisation géographique ou de l'hôte réservoir n'est pas possible. La distinction des deux sous-espèces a été rendue possible grâce à de nombreuses techniques de biologie qui ont été mises au point depuis une trentaine d'années, de la plus simple (électrophorèse d'isoenzymes) aux plus sophistiquées utilisant l'amplification d'ADN, ou PCR, grâce à des amorces subspécifiques. Une revue de ces différentes techniques a été effectuée (1). Nous ne détaillerons pas ces différentes méthodes mais leurs applications. Une des premières constatations après étude génétique subspécifique de ces trypanosomes est que 80 % des souches de *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1 (2) constitue un groupe beaucoup plus homogène que *Trypanosoma brucei rhodesiense.* Nous discuterons les deux cas séparément.

De nombreux isolats de *Trypanosoma brucei gambiense* ont été effectués dans la majorité des foyers de THA. Dans certains cas, des isolats datent de plus de trente années et ont été régulièrement isolés de l'homme depuis et identifiés à nouveau dans les mêmes foyers. Par exemple, un même zymodème a été isolé dans les foyers de la Bouenza au Congo pendant une période de plus de 20 ans (3). Il est à noter cependant que ce zymodème était endémique et minoritaire, contrairement au zymodème majeur identifié dans la même région durant la période épidémique de 1989 chez 90 % des malades. Par ailleurs, d'autres zymodèmes endémiques ont été identifiés dans d'autres foyers du Congo à cette époque (Fig. 1), par exemple au nord de Brazzaville dans la région de la Cuvette (Mossaka) ou du Couloir (Ngabé), ou de la République



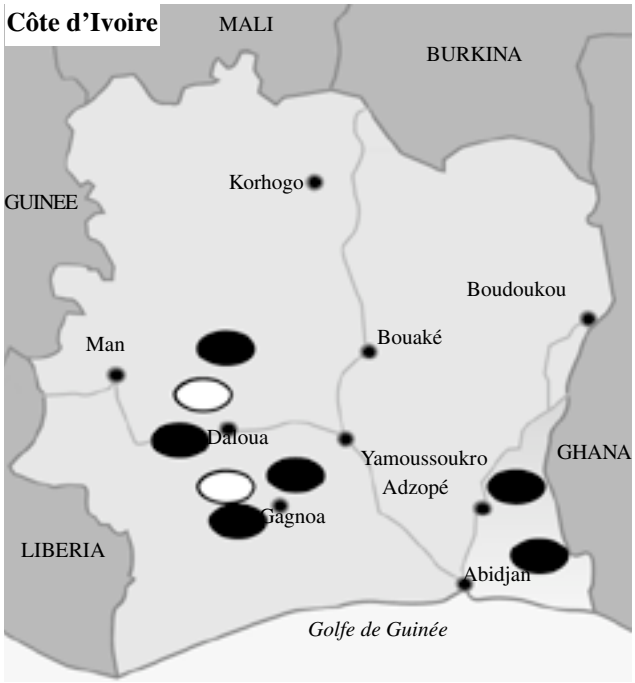


Figure 1 - Comparaison des distributions de la THA au Congo en 1989, et en Côte d'Ivoire en 1997. Les foyers endémiques sont en blanc, les foyers épidémiques sont en noir.

Démocratique de Congo (exemple du Bandundu). L'isolement géographique de ces foyers et le faible taux de déplacement des populations humaines, à l'époque, ont été considérés comme les raisons principales de ce caractère endémique (3). Des constatations similaires ont été effectuées en Côte d'Ivoire (Fig. 1) où des zymodèmes endémiques persistaient et/ou disparaissaient dans le temps, comme par exemple dans la région de Daloa, contrairement aux zymodèmes épidémiques isolés dans la région de Bouaflé/Sinfra (au nord de Gagnoa) ou à la frontière du Ghana. Depuis une dizaine d'années, on constate en effet une flambée épidémique de la THA dans ces régions (4, 5). Cependant, il est à noter que, malgré deux contextes épidémiologiques différents dans ces foyers, au Congo et en Côte d'Ivoire, la distribution des zymodèmes semble comparable. En effet, dans la région de la Bouenza au Congo (entre Brazzaville et Pointe Noire), zone de galeries forestières, les populations sont sédentaires et le nombre d'allogènes très faible. Le déplacement de populations s'effectuait de façon sporadique selon l'axe Brazzaville-Pointe Noire. Au contraire, le foyer épidémique de Bouaflé/Sinfra en Côte d'Ivoire est une zone de forêt dégradée avec de nombreuses plantations de café/cacao. Le nombre d'allogènes est important, en particulier dans les plantations, et il existe une importante circulation des individus, soit dans le foyer, soit dans le reste du pays. Si les zymodèmes endémiques du Congo et de la Côte d'ivoire sont différents, il est surprenant que le zymodème majeur épidémique soit le même au Congo et en Côte d'Ivoire. Quoi qu'il en soit, ces constatations confirment une grande stabilité dans le temps et dans l'espace de *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1 et le rôle majeur de l'homme dans la distribution et la propagation de la THA.

Au sein de *Trypanosoma brucei gambiense,* le groupe 1 est donc prédominant et regroupe 80 % des isolats humains d'Afrique de l'Ouest et Centrale (2). Les 20 % restants, dénommés *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 2, ou *Trypanosoma brucei* groupe « bouaflé » seront discutés par la suite. Au sein du groupe 1, une faible variabilité génétique a été constatée, quelque soit la technique d'identification utilisée, dans un même foyer et entre des foyers distants (3, 6-8). Cependant, au Cameroun et en Ouganda, et ce de façon très localisée, des gènes classiques de l'expression de la variation antigénique sont absents du répertoire génétique classique de *Trypanosoma brucei gambiense,* respectivement celui codant pour Litat 1.3 et pour AnTat 11.17 (9, 10). Au contraire, des zymodèmes identiques ont été identifiés en Côte d'Ivoire, au Congo, en Guinée et en Guinée Equatoriale (3,5). Il est fort probable que, pour le groupe 1 de *Trypanosoma brucei gambiense,* tous les zymodèmes aient un ancêtre commun, les quelques différences génétiques constatées étant le produit de mutations génétiques ponctuelles et localisées géographiquement. Le faible polymorphisme de ce groupe 1 rend le suivi de la propagation de la THA sommaire mais suffisant. Récemment, l'amplification de séquences d'ADN microsatellites a permis de détecter un polymorphisme plus important dans ce groupe 1, et deux génotypes différents ont pu être identifiés chez un même malade (11). Ces résultats reflètent la complexité de ces études, et la nécessité absolue de perfectionner les outils biomoléculaires pour identifier dans les liquides biologiques, sans culture in vitro initiale, les populations naturelles de trypanosomes circulant chez le patient.

En ce qui concerne *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 2, encore dénommé *Trypanosoma brucei* « bouaflé », il semblerait que ce ne soit qu'un cas très particulier à la Côte d'Ivoire puisque, à notre connaissance, ce groupe 2 n'a jamais été isolé dans un autre pays africain. Ce phénomène local a été également associé à des manifestations cliniques aiguës, type forme rhodésienne (4). Le groupe génétique le plus proche de ce groupe « bouaflé » est le groupe « bouaflé/Busoga » (12). Il est curieux de constater que Smith et Bailey (13) associaient à ce groupe une forme aiguë aussi, sachant que Busoga est un foyer d'Afrique de l'Est. La propagation de ces types particuliers de trypanosomes à travers l'Afrique est accompagnée de la persistance des manifestations cliniques. Ceci plaide encore en la faveur d'une grande stabilité génétique de *Trypanosoma brucei gambiense* dans le temps et l'espace. Ce type « bouaflé » est sans doute l'intermédiaire entre le vrai *Trypanosoma brucei gambiense* et le complexe *Trypanosoma brucei rhodesiense/Trypanosoma brucei brucei,* des parasites animaux qui seraient accidentellement transmis à l'homme chez lequel ils provoqueraient une forme aiguë de THA.

Trypanosoma brucei rhodesiense est plus hétérogène d'un point de vue génétique que *Trypanosoma brucei* gambiense (12). Les foyers qui ont été les plus étudiés en Afrique de l'Est sont la Lambwe valley au Sud-Ouest du Kenya (14), Busoga au Sud-Est de l'Ouganda (15), et la Luangwa valley au Nord-Est de la Zambie (16). La principale caractéristique de ces foyers est que les génotypes de trypanosomes isolés sont spécifiques de chacun des foyers. Même en période épidémique, comme ce fut le cas au même moment à Busoga et dans la Lambwe valley qui sont pourtant deux foyers géographiquement très proches, il n'y a pas eu de mélange de génotypes, et la spécificité de génotypes dans chacun des deux foyers est restée stable. Il y aurait donc eu à l'époque deux épidémies indépendantes, dont les origines auraient été elles aussi indépendantes (15). C'est sans aucun doute un modèle de propagation clonale épidémique, comme constaté pour *Trypanosoma brucei gambiense* (3), bien que les phénomènes de reproduction sexuée soient reconnus pour *Trypanosoma brucei rhodesiense.* De la même manière que pour *Trypanosoma brucei gambiense,* certains génotypes de *Trypanosoma brucei rhodesiense* sont très stables dans le temps, et semblent ainsi être bien adaptés à leurs hôtes humains. Comme pour *Trypanosoma brucei gambiense,* ceci n'empêche pas l'apparition de nouveaux génotypes en particulier pendant les épidémies. Cependant, des génotypes endémiques et épidémiques de *Trypanosoma brucei rhodesiense* peuvent être simultanément associés à des flambées épidémiques (17). L'apparition et la propagation de nouveaux génotypes pourraient alors s'expliquer soit par une adaptation à l'homme de parasites animaux (que nous avons précédemment évoquée), soit par le résultat d'échanges génétiques conduisant à l'apparition de nouveaux génotypes (18). La possibilité d'une préférence « hôte » de certains génotypes a d'ailleurs été suspectée, puisque des génotypes isolés de

l'animal ne l'étaient pas de l'homme et vice versa. Une autre explication pour justifier l'apparition de nouveaux génotypes est les échanges génétiques qui interviennent chez la glossine (19). Cependant, ces génotypes sont rarement isolés des hôtes vertébrés, en particulier pendant les périodes épidémiques, pour des raisons encore inconnues. Dans le cas de *Trypanosoma brucei rhodesiense,* le rôle de l'homme dans la propagation épidémique est moins important que pour la forme gambienne de THA (sauf dans le cas particulier des déplacements de réfugiés), en tant que réservoir, car le réservoir animal est prépondérant. Le déplacement ou la présence d'animaux réservoirs peut permettre la propagation ou le maintien de la THA, par exemple le bétail au Kenya et en Ouganda (14), dans ce contexte épidémiologique particulier de la THA en Afrique de l'Est.

Il est possible qu'entre les populations identifiées de trypanosomes isolées chez les glossines et chez l'hôte au même moment, des différences génétiques puissent exister. En effet, le délai entre la piqûre infectante et l'apparition des signes cliniques chez le malade est variable, de quelques mois pour *rhodesiense* à plusieurs années pour *gambiense*, du fait du type d'évolution aiguë ou chronique de la maladie. Encore faut-il que l'échantillonnage soit exhaustif, ou tout au moins représentatif des populations de trypanosomes responsables de l'épidémie ou de l'endémie concernée pendant une période donnée. Ces remarques renforcent l'idée de remettre en question les techniques d'isolement des parasites sur le terrain. De plus, elles confirment la nécessité de travailler, sur un long terme, grâce aux nouveaux outils biomoléculaires, directement sur les liquides biologiques des vertébrés sans biais age dû à l'inoculation de rongeurs ou à la mise culture des formes sanguicoles humaines ou animales. Ces outils, d'identification subspécifique, seront de plus absolument nécessaires dans les zones d'Afrique de l'Est où l'on trouve à la fois *Trypanosoma brucei gambiense* et *Trypanosoma brucei rhodesiense.* De la même manière, il est nécessaire, en particulier chez l'animal mais aussi chez le vecteur, de pouvoir distinguer *Trypanosoma brucei brucei* des deux autres espèces pathogènes pour l'homme.

En conclusion, le rôle de l'hôte vertébré dans la distribution et la propagation de la THA a pu être confirmé grâce à l'identification génétique des trypanosomes qui apparaît être un outil indispensable. Cependant, bien que les techniques biomoléculaires soient de plus en plus performantes, il est impératif d'effectuer ces identifications sur les réelles populations naturelles de trypanosomes qui circulent dans les liquides biologiques de l'hôte et chez le vecteur. La sélection de populations par isolement *in vivo* ou *in vitro* étant maintenant un phénomène démontré, l'amélioration des protocoles techniques devrait permettre dans un très proche avenir de savoir enfin quelles sont réellement les populations ou ensembles de clones qui circulent et se multiplient dans les différents liquides humains ou animaux (sang, lymphe, et LCR) et chez le vecteur. Ceci permettra sans doute de progresser dans le dépistage, le diagnostic, la compréhension de l'évolution clinique et des échecs au traitement de la THA.

REFERENCES

1 - TRUC P., CUNY G. Apport de la biologie moléculaire à l'identification des trypanosomes responsables de la Trypanosomiase Humaine Africaine ou maladie du sommeil. *Med. Trop.* 2000 ; **60** : 115-119.

2 - GIBSON W.C.. Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up ? *Parasitol. Today* 1986 ; **2** : 255-257.

3 - TRUC P., TIBAYRENC M.. Population genetics of *Trypanosoma brucei* in Central Africa : taxonomic and epidemiological significance. *Parasitology* 1993 ; **106** : 137-149.

4 - TRUC P., FORMENTY P., DIALLO P. B. et Coll. - Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting patients and wild mammals in Côte d'Ivoire : suspected difference in pathogenicity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1997 ; **91** : 951-956.

5 - JAMONNEAU V., N'GUESSAN P., N'DRI L., SIMARRO P., TRUC P. - Exploration of the distribution of *Trypanosoma brucei* ssp. in West Africa, by multilocus enzyme electrophoresis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2000 ; **94** : 643-649.

6 - GODFREY D.G., SCOTT C.M., GIBSON W.C. et Coll. - Enzyme polymorphism and the identity of *Trypanosoma brucei gambiense. Parasitology* 1987 ; **94** : 337-347.

7 - STEVENS J.R., LANHAM S.M., ALLINGHAM R., GASHUMBA J.K.. A simplified method for identifying subspecies and strain groups in Trypanozoon by isoenzymes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1992 ; **86** : 9-28.

8 - GIBSON W. C., STEVENS J.R., TRUC P. - Identification of trypanosomes : from morphology to molecular biology. In « Progress in Human African Trypanosomiasis sleeping sickness». Springer Publ. ed., Paris, 1999, pp 7-29.

9 - DUKES P., GIBSON W.C., GASHUMBA J.K. et Coll. - Absence of the Litat 1.3 (CATTantigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop.* 1992 ; **51** : 123-134.

10 - ENYARU J.C., ALLINGHAM R., BROMIDGE T. et Coll. - The isolation and the genetic heterogeneity of *Trypanosoma brucei gambiense* from north-west Uganda. *Acta Trop.* 1993 ; **54** : 31-39.

11 - TRUC P., RAVEL S., JAMONNEAU V. et Coll. - Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense* : evidence of the circulation of different genotypes in Human African Trypanosomiasis patients in Côte d'Ivoire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001 (sous presse).

12 - STEVENS J.R., GODFREY D.G. - Numerical taxonomy of Trypanozoon based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitology* 1992 ; **104** : 75-86.

13 - SMITH D.H., BAILEY J.W.. Human African Trypanosomiasis in southeastern Uganda : clinical diversity and isoenzymes profiles. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1997 ; **91** : 851-856.

14 - GIBSON W.C., WELLDE B.T. - Characterisation of Trypanozoon stocks from the South Nyanza sleeping sickness focus in Western Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985 ; **79** : 671-676.

15 - GIBSON W.C., GASHUMBA J.R. - Isoenzyme characterisation of some Trypanozoon stocks from a recent trypanosomiasis epidemic in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1983 ; **77** : 114-118.

16 - GIBSON W.C., MARSHALL T.F.DE C.., GODFREY D.G. - Numerical analysis of enzyme polymorphism : a new approach to the epidemiology and taxonomy of trypanosomes of the subgenus Trypanozoon. *Ad. Parasitol.* 1980 ; **18** : 175-246.

17 - MIHOK S., OTIENO L.H., DARJI N.. Population genetics of *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of human sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology* 1990 ; **100** : 219-233.

18 - CIBULSKIS R.E. - Genetic variation in *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology* 1992 ; **104** : 99-109.

19 - JENNI L., MARTI S., SCHWEIZER J. et Coll. - Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 1986 ; **322** : 173-175.