



HAL
open science

Les méthodes de diagnostic des trypanosomiasés animales africaines : avantages, limites et nouvelles pistes d'amélioration

Magamba Tounkara, Alain Boulange, Frederic Bringaud, Magali Thonnus, Adrien Marie Gaston Belem, Zakaria Bengaly, Sophie Thevenon, David Berthier, Loïc Rivière

► To cite this version:

Magamba Tounkara, Alain Boulange, Frederic Bringaud, Magali Thonnus, Adrien Marie Gaston Belem, et al.. Les méthodes de diagnostic des trypanosomiasés animales africaines : avantages, limites et nouvelles pistes d'amélioration. Bulletin de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur, 2021, 63 (242), pp.31-38. hal-03225173

HAL Id: hal-03225173

<https://hal.science/hal-03225173>

Submitted on 12 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMIASES ANIMALES AFRICAINES : AVANTAGES, LIMITES ET NOUVELLES PISTES D'AMÉLIORATION

Magamba TOUNKARA^{1,2,3,4,5*}, Alain BOULANGÉ^{2,3,4}, Frédéric BRINGAUD¹, Magali THONNUS¹,
Adrien Marie Gaston BELEM⁶, Zakaria BENGALY⁵, Sophie THÉVENON^{2,3}, David BERTHIER^{2,3}, Loïc RIVIÈRE¹

Résumé

Les trypanosomiasés animales d'origine africaine représentent typiquement la maladie tropicale négligée. Elles sont causées par des parasites sanguicoles du genre *Trypanosoma* transmis par des insectes hématophages, de manière cyclique par les mouches tsé-tsé pour *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et *T. brucei brucei*, qui causent la nagana, de manière mécanique pour *T. evansi*, agent de la surra, et enfin par transmission sexuelle pour *T. equiperdum*, qui cause la dourine. La nagana est présente dans 38 pays d'Afrique subsaharienne où elle peut affecter de nombreuses espèces animales, sauvages et domestiques. Près de 55 millions de bovins vivent sous risque trypanosomien, sans compter les petits ruminants. Ces maladies détériorent la condition physique de l'animal, induisant une forte baisse de productivité. Dans les cas les plus sévères, et en l'absence de traitement, la mort survient en quelques semaines. L'impact socio-économique est estimé à 4,75 milliards de dollars de pertes annuelles, ce qui fait de ces maladies l'un des obstacles majeurs au développement de l'élevage en Afrique. Le contrôle de ces maladies se heurte à l'absence de vaccin, à des traitements dont les molécules sont peu nombreuses et contre lesquelles se développent de plus en plus de résistances de la part des parasites, et enfin à un diagnostic, moléculaire ou sérologique, dont la robustesse demande à être grandement améliorée. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques, le diagnostic parasitologique est souvent peu sensible, et les méthodes moléculaires ne sont pas applicables sur le terrain. Les méthodes d'immunodiagnostic sous forme de tests de diagnostic rapide sont les seules adaptées au terrain, mais les rares tests existants sont très peu accessibles (disponibilité, prix), et manquent de spécificité et/ou de sensibilité. Ici, nous traiterons des limites et des avantages comparatifs des méthodes actuelles de diagnostic et proposerons de nouvelles pistes d'amélioration de ces dernières pour un meilleur contrôle de la maladie.

Mots-Clés : Diagnostic, trypanosomiase animale africaine, *Trypanosoma*

DIAGNOSIS OF ANIMAL AFRICAN TRYPANOSOMIASES

Abstract

The animal trypanosomiasés of African origin are a rather typical example of a neglected tropical disease. They are caused by blood parasites of the *Trypanosoma* genus transmitted by haematophagous insects, cyclically by tsetse flies for *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei brucei*, which cause nagana, mechanically by *T. evansi*, the agent of surra, and finally by *T. equiperdum*, adapted to sexual transmission, which causes dourine. Nagana affects 38 African countries in the sub-Saharan region with 55 million cattle at risk, not counting small ruminants. These diseases deteriorate the animal's physical condition, leading to a sharp drop in productivity; in the most severe cases, and in the absence of treatment, the animal dies within a few weeks. The socio-economic impact is estimated at US\$ 4.75 billion in annual losses, making these diseases one of the major obstacles to livestock development in Africa. The control of these diseases is hampered by the lack of vaccines, a handful of molecules for treatment against which parasites are increasingly developing resistance, and finally, molecular or serological diagnostics whose robustness needs to be greatly improved. Clinical signs are not specific, parasitological diagnosis is often not very sensitive, and molecular methods are not applicable in the field. Immunodiagnostic methods in the form of rapid diagnostic tests are the only ones suitable for the field, but the few existing tests are poorly available and lack specificity and/or sensitivity. Here we address the advantages and limitations of current diagnostic methods and propose new ways of improving them for better disease control.

Keywords: Diagnosis, animal African trypanosomiasis, *Trypanosoma*

Les trypanosomiasés sont des maladies parasitaires qui affectent les humains ainsi que les animaux domestiques et sauvages. Elles sont causées par des parasites appartenant au genre *Trypanosoma* qui sont transmis principalement par des insectes hématophages. Chez l'homme, *Trypanosoma brucei gambiense*

et *T. b. rhodesiense* sont responsables de la trypanosomiase humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil. Chez les animaux, les trypanosomes causent plusieurs maladies : surra, dourine et nagana. La nagana ou trypanosomiase animale africaine (TAA) est transmise par la mouche tsé-tsé (ou glossine)

¹ Université de Bordeaux, CNRS, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, 33000 Bordeaux, France.

² CIRAD, UMR INTERTRYP, 34398 Montpellier, France.

³ INTERTRYP, Université de Montpellier, CIRAD, IRD, Montpellier, France.

⁴ CIRAD, UMR INTERTRYP, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

⁵ Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

⁶ Université Nazi Boni (UNB), 01 BP 1091, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

* Correspondance : magamba.toukara@gmail.com, Université de Bordeaux, UMR 5234, 146 rue Léo Saignat - Bâtiment 3A 1er étage, 33076 Bordeaux Cedex, France, Tél. +33 5 57 57 16 44.

Tableau I. Caractéristiques des trypanosomiasés animales africaines [12, 43].

Trypanosomes	Vecteur	Distribution	Maladie	Préférence d'hôtes	Signes cliniques
<i>T. congolense</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne	Nagana	Bovins, petits ruminants (mouton, chèvre), cheval, chien, porc, sanglier	Anémie* , pyrexie, gonflements des ganglions lymphatiques et de la rate, ataxie, léthargie, cachexie* , œdèmes, immunosuppression, avortement et symptômes neurologiques
<i>T. vivax</i>	<i>Glossina sp.</i> , tabanidés et stomoxes	Afrique subsaharienne, Amérique latine		Bovins, chameau, petits ruminants (mouton, chèvre), cheval, buffle	
<i>T. b. brucei</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne		Bovins, petits ruminants, chameau, cheval , âne, chien, chat, porc, sanglier	
<i>T. suis, T. godfreyi, T. simiae</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne		Porc	
<i>T. evansi</i>	Tabanidés et stomoxes	Afrique subsaharienne, Afrique du Nord, Amérique latine et Asie	Surra	Chameau, cheval , petits ruminants, chameau de Bactriane , bovins, porc, chien et animaux sauvages (rhinocéros, buffle , chevreuil, sanglier, éléphant d'Asie)	
<i>T. equiperdum</i>	Transmission vénérienne	Monde entier	Dourine	Équidés (cheval , âne et mulet)	

Les animaux marqués en gras sont les plus affectés par l'espèce de trypanosomes. * Signes cliniques majeurs.

et est principalement causée par *T. congolense* et *T. vivax*, et dans une moindre mesure par *T. b. brucei*. C'est une maladie dévastatrice du bétail qui touche 38 pays africains de la région subsaharienne. Près de 55 millions de bovins sur une superficie de 10 millions de km² sont menacés [12, 14, 20]. Elle est endémique dans toutes les régions où la mouche tsé-tsé est présente. La surra est causée par *T. evansi* et est transmise par des vecteurs mécaniques tels les tabanidés et les stomoxes [12]. Quant à la dourine causée par *T. equiperdum*, elle est transmise de manière vénérienne. Du fait de leur mode de transmission, la surra et la dourine se sont répandues hors de leur zone d'origine, en Afrique du Nord, Asie et Amérique latine. Notons finalement que *T. vivax* peut être également transmis mécaniquement, ce qui explique sa présence en Amérique du Sud.

La plupart des animaux, domestiques comme sauvages, sont affectés à des degrés divers par les trypanosomiasés animales. La préférence d'hôtes est fonction de l'espèce de trypanosomes (Tableau I). La pathogénicité de la maladie dépend des espèces hôtes, des espèces et souches de trypanosomes ainsi que du statut nutritionnel des animaux [12, 43]. Les signes cliniques sont nombreux, mais non spécifiques. En général, l'anémie est la caractéristique physiologique et la conséquence pathologique la plus importante [43]. Toutefois, d'autres symptômes existent [17, 43] (Tableau I). La détérioration générale de condition des animaux liée à la TAA se traduit par une réduction drastique de la puissance de traction, et de la production de viande et de lait. Ces incidences socio-économiques graves font de la TAA l'une des contraintes majeures au développement de l'élevage en Afrique. Annuellement, près de trois millions de bovins meurent, et 35 millions de doses de trypanocides sont administrées en Afrique subsaharienne. Les pertes économiques dans la zone

endémique sont estimées à 4,75 milliards de dollars américains par an avec plus d'un milliard pour la production bovine [14].

Compte tenu de son importance épidémiologique et de la nécessité d'un choix adéquat pour le traitement, le diagnostic précis de la TAA est indispensable. Cette revue fournit un aperçu de l'ensemble des méthodes utilisées pour le diagnostic des trypanosomiasés animales (nagana, surra et dourine) (Tableau II). L'utilisation des outils moléculaires et sérologiques, notamment les protéines recombinantes et les *nanobodies*, est rapportée. Les nouvelles avancées dans le développement de test de diagnostic rapide (TDR) sont discutées. Enfin, une approche alternative est proposée pour améliorer la sensibilité, la spécificité et la standardisation des antigènes dans le test de diagnostic sérologique par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

1. Les méthodes de diagnostic de la TAA

Actuellement, aucun vaccin contre la TAA n'est disponible. Il constituerait pourtant la méthode de lutte offrant le meilleur rapport coût/efficacité [24]. Cependant, la capacité des trypanosomes à changer régulièrement les protéines de surface de leur manteau glycoprotéique, composé uniquement de VSG (*Variant Surface Glycoprotein*), phénomène connu sous le terme de variation antigénique [18], rend difficile la mise au point d'un vaccin classique. Qui plus est, des études immunologiques ont montré que l'immunosuppression induite par l'infection empêchait le maintien à long terme de cellules mémoires [41], rendant cette approche encore plus aléatoire. Le pilier de la lutte contre la TAA repose donc sur l'utilisation de trypanocides et la lutte antivectorielle (insecticides en pulvérisation (*pour-on*) sur animaux ou par épandage dans l'environnement, piégeage,

Tableau II. Diagnostic des trypanosomiasés animales [10, 35].					
MÉTHODE	PRINCIPE	INDICATIONS			AVANTAGES / DÉFAUTS
		Confirmation de statut	Identification d'espèce	Épidémiologie	
Diagnostic parasitologique : examen microscopique					
Frottis sanguin humide	Une goutte de sang frais entre lame-lamelle	++	Hypothétique (fonction de l'expertise)	+	Simple, rapide, économique / Faible sensibilité
Frottis sanguin fin	Étalement mince de sang, séché, fixé au méthanol et coloré (Giemsa) entre lame-lamelle	+++	Spécificité limitée au sous-genre (d'après la morphologie)	+	Simple et économique / Faible sensibilité, délai
Frottis sanguin épais	Goutte épaisse de sang séché et coloré (Giemsa) entre lame-lamelle	++	Peu spécifique	+	Simple et économique / Faible sensibilité, délai
Technique de Woo	Séparation des composants du sang par centrifugation en tube capillaire hépariné.	+++	Spécificité limitée au sous-genre (très difficile)	++	Peu sensible, rapide, couplé à l'hématocrite / Nécessité de réalisation rapide
Technique de Murray	Centrifugation du sang en tube capillaire hépariné. Examen du <i>buffy coat</i> entre lame-lamelle (en contraste de phase)	+++	Spécificité limitée au sous-genre (d'après la motilité)	+	Sensible / Délicat et dépend de l'expertise
Chromatographie d'échange d'anions	Séparation des trypanosomes des hématies en fonction de leur charge sur colonne de DEAE-cellulose	+	Spécificité limitée au sous-genre	-	Sensibilité élevée, isolement de parasites / Lent et coûteux
Inoculation à l'animal	Injection intrapéritonéale de sang frais à un rongeur immunodéprimé. Analyse de prélèvements au microscope	++	Spécificité limitée à l'espèce ou au sous-genre	-	Sensible / Peu pratique, très coûteux, diagnostic non immédiat, éthique
Diagnostic moléculaire : détection d'ADN					
PCR et dérivés	Amplification de séquence spécifique d'ADN et détection par électrophorèse sur gel d'agarose	++	Spécificité limitée à l'espèce ou au sous-genre	+++	Sensible, applicable à un grand nombre d'échantillons / Coûteux, délai, contamination facile
Diagnostic immunologique : détection des anticorps sériques					
IFAT ¹ (Fig. 3)	Détection d'anticorps anti-trypanosomes (IgG) par immunofluorescence	++	-	+ ⁵	Sensible / Coûteux, lent, réactions croisées entre espèces
CATT / <i>T. evansi</i> ²	Détection d'anticorps anti-trypanosomes (IgM) par agglutination	++	-	+++	Rapide, diagnostic actif / Réactions croisées possibles, faible sensibilité
CFT ³ (Fig. 1)	Détection d'anticorps anti-trypanosomes par fixation du complément couplée à un système hémolytique	++	- Uniquement <i>T. equiperdum</i>	+	Forte spécificité pour <i>T. equiperdum</i> / Complexe, coûteux, lent, expertise nécessaire, activité anti-complément
ELISA-Ac ⁴ (Fig. 4)	Détection d'anticorps anti-trypanosomes (IgG) par dosage immuno-enzymatique	-	-	+++ ⁶	Sensible, spécifique, standardisable / Réactions croisées, diagnostic non actif, équipements sophistiqués
Trypanolyse (Fig. 2)	Détection d'anticorps anti-VSG par fixation du complément aux complexes immuns lysant les trypanosomes vivants	++	- Spécificité limitée au genre	+	Rapide, diagnostic actif / Réactions croisées possibles, faible sensibilité

¹ Immunofluorescence indirecte ; ² Agglutination sur carte ; ³ Fixation du complément ; ⁴ Immuno-absorption enzymatique ; ⁵ Applicable à petite échelle ; ⁶ Applicable à grande échelle ; +++ Très adapté ; ++ Bien adapté ; + Peu adapté ; - Pas adapté.

écrans imprégnés, stérilisation des mâles) [17]. La détection des parasites est la première étape pour poser le diagnostic de la maladie ou estimer sa prévalence sur le terrain. Actuellement, le diagnostic de la TAA est basé sur différentes méthodes (Tableau II).

1.1. Diagnostic clinique

Les signes cliniques (Tableau I) sont les premiers soupçons d'infection par des trypanosomes chez les bovins. Cependant, aucun n'est spécifique [35], les mêmes signes cliniques en régions endémiques peuvent être retrouvés dans d'autres parasitoses (babésiose, hémochose et theilériose) et dans l'anaplasmose [11, 15]. Cependant, en présence de glossines dans ces zones endémiques de la maladie, les trypanosomiasés sont le plus souvent suspectés lorsque des signes tels que faiblesse, amaigrissement, perte d'appétit, pétéchie conjonctivale ou avortement sont observés.

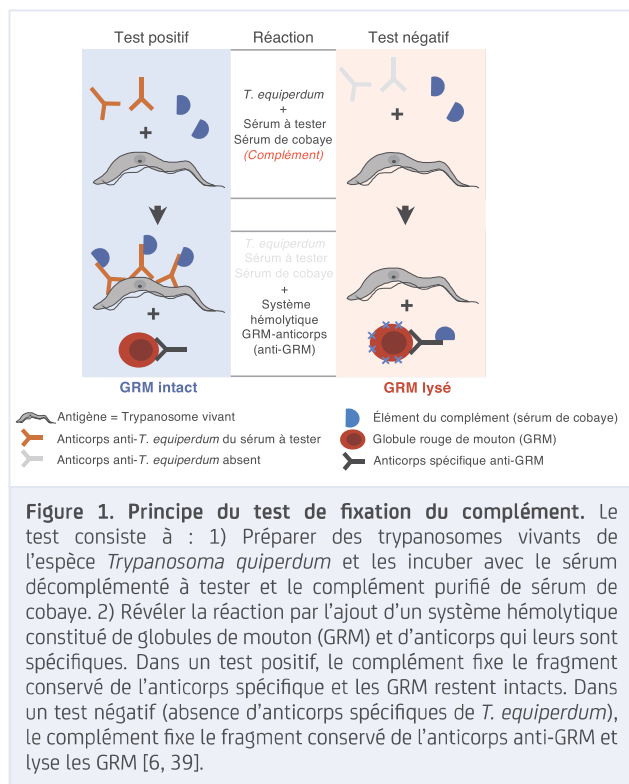
1.2. Diagnostic parasitologique (Tableau II)

En raison de l'absence de symptômes spécifiques, les analyses de laboratoire sont nécessaires au diagnostic étiologique. Il repose sur deux principes : la détection du parasite lui-même (parasitologie) ou de ses constituants (ADN ou protéines), et la détection de la réponse immunitaire de l'hôte (sérologie). La méthode de première ligne est la microscopie [46]. Elle consiste à visualiser directement le parasite dans des échantillons biologiques. Elle est surtout efficace pendant la phase aiguë d'une infection précoce où la parasitémie est élevée. Cependant, l'observation microscopique prend du temps, est très peu sensible en phase chronique, peu fiable pour les infections mixtes, et dépend beaucoup de l'expertise de l'opérateur [46]. Des méthodes de concentration sont nécessaires pour améliorer la sensibilité de l'examen microscopique, en particulier lorsque la parasitémie est faible. L'échantillon est alors enrichi avant examen microscopique par centrifugation en utilisant la technique de Woo, couplée à la détermination de l'hématocrite (*haematocrit centrifugation technique*) [47] ou la technique de Murray (*buffy coat technique*) [35]. Les trypanosomes concentrés à la jonction de la couche leucocytaire et du plasma sont ainsi observés au microscope optique ou en contraste de phase [35]. La chromatographie échangeuse d'anions sur résine de diéthylamino-éthyle (DEAE) est également utilisée pour concentrer et séparer les trypanosomes des éléments figurés du sang à partir d'un échantillon de volume plus important [5]. L'inoculation à des rongeurs de sang d'animaux suspects peut être utilisée lorsqu'une infection est suspectée mais que la parasitémie est indétectable [42], ou encore pour affiner le diagnostic d'espèces ou de sous-espèces de trypanosomes. Cette technique d'amplification du parasite est plus sensible que les méthodes de concentration, mais dépend des espèces de trypanosomes, toutes n'étant pas infectieuses pour les rongeurs. De plus, elle achoppe sur le coût, l'éthique et l'aspect pratique, et le diagnostic n'est pas immédiat [46].

1.3. Diagnostic moléculaire (Tableau II)

Pour les enquêtes épidémiologiques ainsi que l'identification des trypanosomes, les techniques moléculaires ont grandement amélioré la sensibilité par rapport à l'examen parasitologique.

Basées sur la détection de l'ADN du parasite, elles permettent d'identifier les espèces et sous-espèces de trypanosomes dès cinq jours après l'infection aussi bien chez l'insecte que chez l'hôte mammifère [28]. Plusieurs techniques ont été développées. L'utilisation de sondes marquées par un composé radioactif ou chimique a été la première technique employée [46]. Cependant à cause de sa lourdeur, cette technique a été abandonnée il y a bien longtemps. Les méthodes les plus utilisées de nos jours sont l'amplification en chaîne par polymérase (PCR, pour *Polymerase Chain Reaction*) et la qPCR (*quantitative PCR*). Pour ces techniques, un fragment de l'ADN extrait du parasite, situé généralement dans une région répétée et spécifique du génome, est ciblé par un couple d'amorces et amplifié par une polymérase. En fonction de la séquence ciblée, on distingue les PCR multispécifiques (détection d'un fragment commun à tous les trypanosomes) des PCR monospécifiques (détection d'un fragment spécifique à une espèce ou sous-espèce). En raison de leur présence en copies multiples dans le génome des trypanosomes, l'espaceur interne transcrit 1 (ITS1) de l'ADN ribosomal et les ADN satellites sont les cibles privilégiées. L'ITS1 est une courte séquence d'ADN conservée au sein d'une même espèce, répétée 200 à 500 fois [11, 34]. L'amplification de l'ITS1 permet non seulement de détecter l'ensemble des trypanosomes (diagnostic pan-trypanosome), mais aussi de distinguer les espèces selon la taille des fragments amplifiés, en particulier *T. congolense*, *T. vivax*, et des trypanosomes appartenant au sous-genre Trypanozoon (*T. evansi* et *T. equiperdum*, *T. brucei* spp.). Les ADN satellites, quant à eux, sont des séquences répétées 10 000 à 20 000 fois dans le génome [11]. Leur amplification permet de détecter et d'identifier *T. vivax*, plusieurs sous-groupes de *T. congolense* (savane, forêt et kilifi), *T. godfreyi*, *T. simiae* et les Trypanozoon [11]. La distinction des espèces au sein du sous-genre Trypanozoon est plus délicate. En effet, il n'existe pas d'amorces spécifiques à proprement parler. Contrairement aux sous-espèces *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* qui chez l'homme peuvent être discriminées respectivement avec les amorces Tbs-GP [11] et Tbrc [40], il n'y a pas d'amorces spécifiques pour *T. b. brucei* chez l'animal. Ainsi, on considère un échantillon positif à *T. b. brucei* lorsque, à la fois, 1) la PCR avec les amorces TBR (permettant de détecter tous les Trypanozoon) est positive et 2) les PCR avec les amorces Tbs-GP et Tbrc sont négatives. Distinguer *T. evansi* de *T. equiperdum* par PCR est tout autant problématique. Le couple d'amorces actuellement utilisé cible le gène RoTat 1.2 (*Rode Trypanozoon antigenic type* 1.2, de *T. evansi* type A) qui est absent chez les espèces *T. brucei* s.l., *T. equiperdum*, et chez *T. evansi* de type B. Cependant, ce gène existe en copie unique, ce qui limite la sensibilité de la PCR. Il existe en outre certaines souches de *T. equiperdum* pour lesquelles les PCR RoTat 1.2 sont positives [7, 33]. De ce fait, l'ADN mitochondrial ou kinétoplastique (kDNA) est proposé par plusieurs auteurs comme cible pour distinguer *T. evansi* de *T. equiperdum* et de *T. brucei*. Le kinétoplaste contient des milliers de copies d'ADN circulaire dites mini- ou maxi-cercles en fonction de leur taille, contenant à leur tour des séquences nucléotidiques répétées et spécifiques de chaque espèce. *T. evansi* et *T. equiperdum* sont dépourvus de maxi-cercles et les souches bien connues de *T. evansi* disposent de mini-cercles



très différents (type A et type B). Et dernière difficulté, plusieurs souches de *T. evansi* sont dépourvues de kDNA [2]. Dernièrement, la technique LAMP (*Loop-mediated isothermal Amplification* pour amplification isothermique à médiation par boucle) a été développée pour détecter les trypanosomes. Elle est présentée comme étant rapide, spécifique, sensible et relativement simple. Elle nécessite peu de matériels de laboratoire et les résultats sont faciles à lire. Toutefois, technique sujette à contamination, des résultats faussement positifs sont fréquemment observés. Pour le moment, son usage n'a pas été approuvé pour le diagnostic de la TAA, bien qu'un kit ait été développé pour détecter les Trypanozoon dans le contexte de la THA [29].

Cibler l'ADN du parasite par PCR fait donc de cet outil un diagnostic plus sensible, plus spécifique et signant une infection active (durée de vie de l'ADN parasitaire estimée à 48 h) [21]. De plus, les tests moléculaires sont adaptés aux enquêtes à grande échelle [46]. Néanmoins, en cas de parasitémie très faible (<1 trypanosome/mL), les méthodes basées sur la PCR peuvent échouer [36].

1.4. Diagnostic immunologique : détection des anticorps sériques

Du fait de la persistance des anticorps dans la circulation pendant plusieurs mois suivant la guérison spontanée ou après traitement, leur détection ne signe pas une infection active, mais simplement le contact, présent ou passé, avec le parasite. Pour cette raison, le sérodiagnostic est surtout employé dans les études épidémiologiques.

Plusieurs tests ont été approuvés par l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) (Tableau II). Leur spécificité est limitée au

genre *Trypanosoma* [35, 36]. Le choix d'un test particulier est guidé par différents facteurs : son objectif (diagnostic individuel ou à l'échelle du troupeau), facteur économique, expertise [35].

Le test CATT/*T. evansi* (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis), basé sur l'agglutination directe des parasites par des immunoglobulines spécifiques de type M (IgM), met en évidence une infection à *T. evansi*. Une préparation pure de *T. evansi*, exprimant un antigène variable prédominant (VSG RoTat 1.2) a été préalablement déposée sur une carte et colorée. L'agglutinat, résultant de la liaison des IgM présents dans le sérum ou le sang d'un animal infecté, aux antigènes parasitaires fixés sur la carte, est visible à l'œil nu [35, 36]. D'exécution rapide et facile sur le terrain, le test CATT/*T. evansi* est adapté à la confirmation de l'infection active d'un individu. Commercialisé sous forme de kit, il ne nécessite que peu d'expertise si on le compare aux autres tests sérologiques [46].

Le test de fixation du complément (CFT, Complement Fixation Test) (Fig. 1) détecte une infection à *T. equiperdum* [42].

Le test de trypanolyse est basé sur la lyse cellulaire par le système du complément (Fig. 2). Il permet de détecter les anticorps reconnaissant un seul épitope multicopie du variant VSG RoTat 1.2 de *T. evansi* de type A. La lyse des trypanosomes, en présence de complément, est observée au microscope [44].

Les tests CFT et de trypanolyse, indiqués pour le diagnostic individuel, nécessitent de bonnes installations de laboratoire et une expertise préalable.

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFAT, Indirect Fluorescent Antibody Test) (Fig. 3) est privilégié dans les enquêtes à petite échelle [23]. Malgré la facilité d'obtention des antigènes, l'IFAT peut cependant prendre du temps et nécessite un microscope à fluorescence, matériel coûteux à l'achat. En plus, il ne permet pas le diagnostic de l'espèce en cause [46].

Le test ELISA [26, 35] (Fig. 4) est le « *gold standard* » du diagnostic sérologique de la TAA. Les anticorps sont détectés indirectement en utilisant le plus souvent des antigènes totaux solubles de *Trypanosoma* [26, 35], ou une protéine recombinante [3, 15, 16, 37].

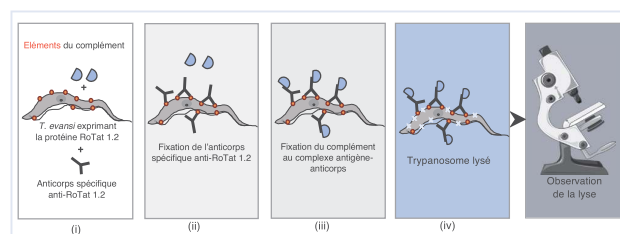


Figure 2. Principe du test de trypanolyse. Il est basé sur la capacité du complément à se fixer sur le complexe antigène-anticorps provoquant la lyse des trypanosomes. 1) Des trypanosomes vivants de la souche *Trypanosoma evansi* RoTat 1.2 (exprimant le variant RoTat 1.2 de glycoprotéines variables de surface) sont mis en contact avec du sérum, du plasma ou du sang d'un animal et du complément purifié de sérum de cobaye. 2) L'anticorps anti-RoTat 1.2 fixe la protéine RoTat 1.2 sur la surface du trypanosome. 3) Le complément se lie par la suite au complexe anticorps-antigène et 4) induit la lyse du parasite. Le test est positif lorsque le pourcentage de lyse est supérieur à 50 % [44].

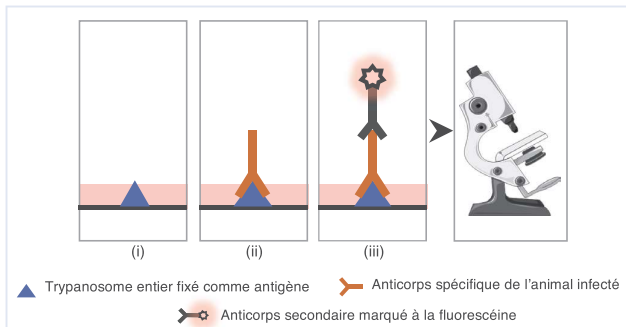


Figure 3. Principe du test de détection d'anticorps par immunofluorescence indirecte. La détection d'anticorps par immunofluorescence se fait selon le principe suivant : 1) Des trypanosomes en suspension ou dans un prélèvement sanguin sont fixés entre lame et lamelle. 2) Le sérum à tester est mis en contact avec les trypanosomes ; s'il contient des anticorps anti-trypanosomes, ils se lient aux trypanosomes. 3) Un anticorps conjugué à la fluorescéine fixe spécifiquement l'anticorps anti-trypanosomes et la fluorescence émise à une certaine longueur d'onde (après excitation du fluorochrome) est observée au microscope dit d'épifluorescence [9, 23, 46].

Le test ELISA de détection d'anticorps (ELISA-Ac) utilisant comme antigène la fraction soluble d'un extrait brut de parasites était l'un des seuls tests ELISA existants pour la TAA [4]. Les antigènes totaux, issus de trypanosomes du sang de rongeurs infectés, sont purifiés par chromatographie échangeuse d'anions DEAE-

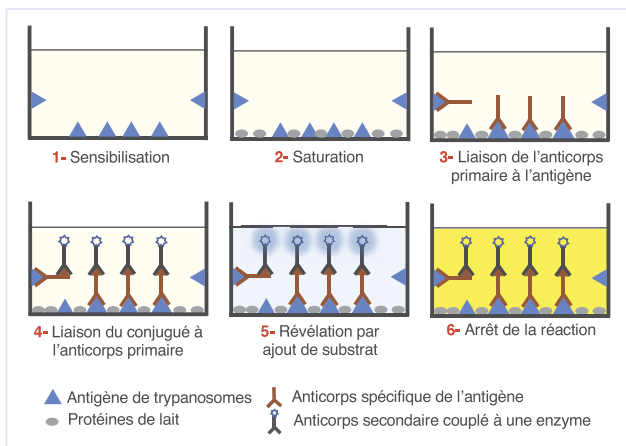


Figure 4. Principe du test de détection d'anticorps par immuno-absorption enzymatique (ELISA-Ac). La détection d'anticorps se fait en cinq étapes principales : 1) Sensibilisation de la plaque avec une préparation d'antigène (lysats totaux ou antigène recombinant). 2) Saturation de puits sur la plaque avec des protéines non spécifiques (lait ou albumine de sérum bovin). 3) Liaison des anticorps spécifiques (à l'antigène), provenant du sérum de l'animal. 4) Liaison de l'anti-sérum conjugué à une enzyme (peroxydase le plus souvent). 5) Révélation de la réaction antigène-anticorps par l'ajout d'un composé chromogène, substrat de l'enzyme : l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) ou le 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) et mesure de la densité optique (DO). L'étape 6 est optionnelle, elle permet de mieux apprécier la coloration de la réaction.

cellulose [25] puis lysés. Cette production d'antigènes est assez difficile, et n'est pas standardisée [19]. De plus, le sacrifice d'un nombre important de rongeurs pour la préparation de larges quantités d'antigènes est éthiquement discutable.

Pour surmonter ces difficultés, plusieurs protéines recombinantes ont été produites et utilisées comme antigènes [13]. Des glycoprotéines invariantes de surface de *T. congolense* et de *T. vivax* ont été testées ce qui a permis de développer un TDR pour *T. vivax* [15, 16]. Plus récemment, un test ELISA-Ac de *T. vivax* et *T. congolense* (VerYDiag® par CEVA) a été introduit sur le marché sous forme de TDR [4, 37]. Malgré son manque de sensibilité dans les infections très précoces ou au contraire à un stade très tardif, il renforce la spécificité et élimine le problème de standardisation. Pour l'espèce *T. evansi*, la glycoprotéine variante de surface RoTat 1.2 a été la plus étudiée [33]. Cependant, l'antigène non variable (rrISG75) s'est également révélé hautement spécifique et sensible pour la détection de *T. evansi* chez les chameaux [45]. Le problème commun à ces TDR est qu'ils restent peu accessibles notamment à cause d'une faible diffusion et de leur coût élevé.

L'inconvénient principal de ces techniques de détection d'anticorps est que les anticorps de type IgG, contrairement aux IgM, perdurent plusieurs mois après guérison. Ces tests ELISA ne sont donc pas indiqués pour le diagnostic d'une infection active. Ils ne sont pas spécifiques d'espèce. Par contre, de sensibilité élevée, l'ELISA est la méthode privilégiée dans les enquêtes à grande échelle [9].

1.5. Détection d'antigènes

La détection d'antigènes circulants de trypanosomes, preuve directe d'une infection active, devrait permettre une amélioration significative de la spécificité du diagnostic de TAA [31, 32]. Les premiers tests utilisaient des anticorps monoclonaux spécifiques de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* pour la détection d'antigènes invariants et circulants, par ELISA de capture. Ils montrent une faible sensibilité pour la détection de *T. vivax*, et une faible spécificité (forte proportion de faux positifs), associée à une réactivité croisée pour *T. congolense* et *T. b. brucei* [1, 8, 46]. Ces échecs, liés notamment à la faible quantité d'antigènes libres circulants, ont conduit à les abandonner temporairement [8]. Par la suite, des épreuves sur bandelettes réactives [22] et un test LAT (*Latex Agglutination Test*) permettant de détecter spécifiquement *T. evansi* [30] ont été développés.

Récemment, un test de détection de la pyruvate kinase de *T. congolense* a été développé. Il s'agit d'un ELISA sandwich utilisant des *nanobodies* [38]. Ces anticorps propres aux Camelidae ont un domaine unique dix fois plus petit que celui d'une immunoglobuline classique. Chez les bovins expérimentalement infectés par *T. congolense*, ce nouveau test montre une sensibilité de 79 % et une spécificité de 91 %.

2. Quel avenir pour le diagnostic sérologique de la TAA ?

2.1. Nouveaux progrès dans l'immunodiagnostic

Bien que la TAA soit une maladie négligée par les industriels, des études innovantes sont menées pour l'amélioration de son diagnostic. Elles portent, notamment sur la standardisation de la production de l'antigène parasitaire, et sur la spécificité, en

particulier en ce qui concerne le diagnostic d'infections actives. Cette dynamique doit se poursuivre. Par exemple, au lieu d'utiliser une seule protéine recombinante comme unique antigène dans le test d'ELISA-Ac, la combinaison de plusieurs peptides immunogènes de différentes protéines doit être examinée. Une telle association pourrait permettre d'améliorer à la fois la sensibilité et la spécificité des tests. Ceci pourrait s'inscrire dans le cadre d'une collaboration d'industriels et d'instituts par le financement de projet de synthèse de protéines chimériques facilement standardisables.

2.2. Quelle solution pour le diagnostic de terrain ?

Il existe un cahier des charges à respecter pour qu'un test puisse être utilisé dans des conditions de terrain. Ces critères sont définis par le terme ASSURED : « *Affordable by those at risk of infection, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid, Equipment-free, Delivered to those who need it* » (en français, abordable pour les personnes à risque d'infection, sensible, spécifique, convivial, rapide, sans équipement, livré à ceux qui en ont besoin) [27]. Dans le diagnostic de la TAA, les méthodes moléculaires, y compris la PCR et nouvellement la LAMP, ne répondent pas aux critères « ASSURED ». Bien que très sensibles et très spécifiques, elles ne peuvent pas être utilisées sur le terrain, car elles nécessitent un laboratoire équipé, une expertise technique élevée et se prêtent difficilement au passage sous forme de TDR. À l'inverse, les tests de détection d'anticorps ou d'antigènes peuvent répondre aux critères « ASSURED » et, dans leur stade final de développement, être accessibles sous forme de TDR. Ainsi, en raison de la difficulté d'utilisation de la microscopie, le diagnostic de terrain de la TAA serait basé sur le test sérologique (sous forme de TDR) adapté pour les études de grande envergure (surveillance, étude de prévalence et contrôle de mesures de lutte). L'accessibilité de ces nouveaux outils tout comme la réduction de leur coût restent toutefois un challenge à relever.

Conclusion

Les trypanosomiasés animales, en particulier la nagana, sont des maladies qui, par leur impact socio-économique élevé en Afrique, peuvent être qualifiées de négligées. En l'absence de vaccin, outre la lutte antivectorielle, le contrôle de la maladie passe par le diagnostic et la chimiothérapie. Le diagnostic s'appuie sur la détection du parasite lui-même ou de ses constituants, ou sur la détection des anticorps produits par l'hôte. Le diagnostic parasitologique est souvent peu sensible et les méthodes moléculaires ne répondent pas aux conditions du terrain. Les tests immunodiagnostiques sous forme de TDR sont les mieux adaptés, et peuvent encore être améliorés. Peu de TDR sont cependant accessibles. Ainsi, dans l'attente de tests de capture d'antigènes, dont l'utilisation des *nanobodies* va permettre le développement, et qui constituent le Graal du diagnostic de terrain, deux recommandations majeures peuvent être formulées dans le but d'améliorer le diagnostic existant de la TAA : 1) développer un algorithme précis de diagnostic. Cet algorithme pourrait consister à l'emploi séquentiel de méthodes existantes : TDR en première ligne sur le terrain, suivi de la microscopie pour la confirmation des TDR positifs, puis du diagnostic moléculaire pour les identifications d'espèces ; 2) améliorer les tests existants pour faciliter la mise en place de cet algorithme. Ainsi la deuxième recommandation, qui constituera la première étape, va consister à travailler au développement de tests moléculaires plus sensibles, peut-être avec le test LAMP déjà utilisé pour le diagnostic de la THA, et des tests sérologiques plus spécifiques et standardisés, l'utilisation de chimères protéiques rassemblant les épitopes immunodominants de plusieurs antigènes constituant une option à privilégier.

Références

1. Bengaly Z, Kanwe A, Duvallat G. Evaluation of an antigen detection-ELISA test for the diagnosis of trypanosomiasis in naturally infected cattle. *Trop Med Parasitol*. 1995, **46**, 284-86.
2. Borst P, Fase-Fowler F, Gibson WC. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987, **23**, 31-38.
3. Boulangé A, Katende J, Authie E. *Trypanosoma congolense*: Expression of a heat shock protein 70 and initial evaluation as a diagnostic antigen for bovine trypanosomiasis. *Exp Parasitol*. 2002, **100**, 6-11.
4. Boulangé A, Pillay D, Chevtzoff C, et al. Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomiasis. *Vet Parasitol*. 2017, **233**, 32-38.
5. Camara M, Camara O, Ilboudo H, et al. Sleeping sickness diagnosis: Use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health* 2010, **15**, 796-9.
6. Cauchard J, Soldan A, Madeline A, et al. Inter-laboratory ring trials to evaluate serological methods for dourine diagnosis. *Vet Parasitol*. 2014, **205**, 70-76.
7. Claes F, Radwanska M, Urakawa T, et al. Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2004, **3**, 3.
8. Desquesnes M. Comparison of the sensitivity of the Woo test and a test for detecting antigens to *Trypanosoma vivax* in 2 sheep experimentally infected with a Guyanese strain of the parasite. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1995, **48**, 247-53.
9. Desquesnes M. Standardisations internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques : méthodes, intérêts et limites. *Rev Sci Tech*. 1997, **16**, 809-23.

10. Desquesnes M. Compendium of standard diagnostic protocols for animal trypanosomiasis of African origin. *CIRAD* 2017, pp. 1-106
11. Desquesnes M, Davila A. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: A review and perspectives. *Vet Parasitol.* 2002, **109**, 213-31.
12. Desquesnes M, Holzmuller P, Lai DH, *et al.* *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed Res Int.* 2013, **2013**, 194176.
13. Eysen LE, Vather P, Jackson L, *et al.* Recombinant and native TviCATL from *Trypanosoma vivax*: Enzymatic characterisation and evaluation as a diagnostic target for animal African trypanosomiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2018, **223**, 50-54.
14. FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Programme de lutte contre la trypanosomose africaine (PLTA) | La maladie. 2021. www.fao.org/paat/the-programme/the-disease/fr.
15. Fleming JR, Sastry L, Crozier TW, *et al.* Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for *Trypanosoma congolense*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014, **8**, e2936.
16. Fleming JR, Sastry L, Wall SJ, *et al.* Proteomic identification of immunodiagnostic antigens for *Trypanosoma vivax* infections in cattle and generation of a proof-of-concept lateral flow test diagnostic device. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016, **10**, e0004977.
17. Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, *et al.* The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: A review. *Parasitol.* 2016, **143**, 1862-89.
18. Horn D. Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2014, **195**, 123-9.
19. Ijagbone I, Staak C, Reinhard R. Fractionation of trypanosome antigens for species-specific sero-diagnosis. *Vet Parasitol.* 1989, **32**, 293-99.
20. Ilemobade A. Tsetse and trypanosomiasis in Africa: The challenges, the opportunities. *Onderstepoort J Vet Res.* 2009, **76**, 35-40.
21. Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infect Immun.* 1998, **66**, 3783-87.
22. Kashiwazaki Y, Snowden K, Smith DH, *et al.* A multiple antigen detection dipstick colloidal dye immunoassay for the field diagnosis of trypanosome infections in cattle. *Vet Parasitol.* 1994, **55**, 57-69.
23. Katende J, Nantulya V, Musoke A. Comparison between bloodstream and procyclic form trypanosomes for serological diagnosis of African human trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987, **81**, 607-08.
24. Kristjanson PM, Swallow BM, Rowlands G, *et al.* Measuring the costs of African animal trypanosomiasis, the potential benefits of control and returns to research. *Agric Syst.* 1999, **59**, 79-98.
25. Lanham SM, Godfrey D. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp Parasitol.* 1970, **28**, 521-34.
26. Luckins A. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Health Prod.* 1977, **9**, 53-62.
27. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, *et al.* Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol.* 2004, **2**, 231-40.
28. Matovu E, Mugasa CM, Ekangu RA, *et al.* Phase II evaluation of sensitivity and specificity of PCR and NASBA followed by oligochromatography for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples from D.R. Congo and Uganda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010, **4**.
29. Mitashi P, Hasker E, Ngoyi DM, *et al.* Diagnostic accuracy of Loopamp *Trypanosoma brucei* detection kit for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013, **7**, e2504-e04.
30. Nantulya V. Suratex: a simple latex agglutination antigen test for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections (surra). *Trop Med Parasitol.* 1994, **45**, 9-12.
31. Nantulya V, Lindqvist K. Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. Congolense* and *T. Brucei* infections in cattle. *Trop Med Parasitol.* 1989, **40**, 267-72.
32. Nantulya V, Musoke A, Rurangirwa F, *et al.* Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei*. *Parasite Immunol.* 1987, **9**, 421-31.
33. Ngaira JM, Olembo NK, Njagi EN, *et al.* The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol.* 2005, **110**, 30-8.
34. Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, *et al.* The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res.* 2005, **95**, 186-92.
35. OIE. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2018, Ch. 3.4.16, pp. 1222-35.
36. OIE. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2018, Ch. 3.1.21, pp. 660-74.
37. Pillay D, Izotte J, Fikru R, *et al.* *Trypanosoma vivax* GM6 antigen: A candidate antigen for diagnosis of African animal trypanosomiasis in cattle. *PLoS One* 2013, **8**, e78565.
38. Pinto Torres JE, Goossens J, Ding J, *et al.* Development of a nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections. *Sci Rep.* 2018, **8**, 9019.
39. Potts A, Human M, Theron R, *et al.* SAVLSF Harmonized serology SOP for Dourine complement fixation test. *South African Veterinary Laboratory Scientific Forum.* 2013, **2**, pp. 1-27.
40. Radwanska M, Chamekh M, Vanhamme L, *et al.* The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002, **67**, 684-90.
41. Radwanska M, Guirnalda P, De Trez C, *et al.* Trypanosomiasis-induced B cell apoptosis results in loss of protective anti-parasite antibody responses and abolishment of vaccine-induced memory responses. *PLoS Pathog.* 2008, **4**, e1000078.
42. Schoening H. Trypanosomiasis in camels: Its detection by complement fixation. *J Infect Dis.* 1924, 608-13.
43. Taylor K, Authié EM-L. Pathogenesis of animal trypanosomiasis. In Maudlin I, Holmes PH et Miles MA (eds), « The Trypanosomiasis ». *CABI Publishing, Wallingford*, 2004, pp. 331–353.
44. Tehseen S, Jahan N, Qamar MF, *et al.* Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasit Vectors.* 2015, **8**, 415.
45. Tran T, Claes F, Verloo D, *et al.* Towards a new reference test for surra in camels. *Clin Vaccine Immunol.* 2009, **16**, 999-1002.
46. Uilenberg G, Boyt W. A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomiasis. *Food & Agriculture Org.*, 1998.
47. Woo P. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica* 1970, **27**, 384-6.