

Identification par Diagnostic moléculaire des Trypanosomes chez les Glossines dans les Zones endémiques de la Province du Sankuru en République Démocratique Congo

César Lokanga Ahoka¹, Jean Luamba Lua Nsembo², Dieudonné Mumba Ngoyi^{3,4}, Déogratias Mutambel' Hity Schie' Nkung'², Aristarque Mulonda Bulambo², Nyamangombe Lohandjola⁵, Jean-Claude KAMB TSHIJK² et Daddy Wangima Atila^{6*}

¹Département de Zootechnie et production animale, Institut Supérieur Pédagogique de Kibombo (ISP-KBBO), BP. 11 Kibombo, RD Congo.

²Département de Biologie, Université Pédagogique Nationale (UPN), BP. 8815 Kinshasa I, Ngaliema, RD Congo

³Département de parasitologie, Institut National de Recherche Biomédicale de Kinshasa (INRB)

⁴Faculté de Médecine, Université de Kinshasa (UNIKIN), BP.190 Kinshasa XI, RD Congo

⁵Département de Biologie, Université de Kinshasa (UNIKIN), BP.190 Kinshasa XI, RD Congo

⁶Université Pédagogique Nationale. Faculté des Sciences de la Santé. BP 8815 Kinshasa I. RD Congo.

^{6*}email: daddy.wangima@upn.ac.cd



Résumé – Cette étude a été menée dans la province du Sankuru en République Démocratique du Congo, dans trois zones de santé (Dikungu, Tshumbe et Wembo-Nyama) endémiques à la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA). Elle a visé de déterminer les espèces de trypanosomes africains infectant les glossines qui sévissent dans ces trois zones de santé. Au total 446 glossines ont été capturées à l'aide des pièges (BCT, Grémansin et Stop) ; 81 glossines vivantes étaient disséquées pour prélever le proboscis, les glandes salivaires et l'intestin moyen pour les observations microscopiques et le diagnostic moléculaire (qPCR et PCR) des espèces de trypanosomes.

Sur l'ensemble d'échantillons positifs, 95,1 % étaient déterminés par diagnostic moléculaire contre 4,9 % observés exclusivement en microscopie. Les analyses moléculaires impactent significativement ($P < 0,001 < 0,05$) sur la détection des trypanosomes (sensible et spécifique) par rapport à l'observation microscopique. En effet, elles sont lentes et coûteuses.

Les groupes taxonomiques de trypanosomes infectant les Glossina fuscipes fuscipes dans des zones étudiées sont Trypanosoma brucei gambiense (14,8 %), Trypanosoma congolense savane (3,7 %) et Trypanosoma congolense forêt (1,2 %). Il y a coexistence de la trypanosomiase africaine humaine et animale dans ce milieu d'étude. Le développement de nouvelles stratégies intégrant des mesures de lutte contre la trypanosomiase humaine et animale pourrait permettre l'élimination de la gTHA en tant que problème de santé publique d'ici 2030.

Mots clés – Microscopie, Diagnostic moléculaire, Trypanosome, Glossine, Sankuru.

Abstract – This study was carried out in the Sankuru province in the Democratic Republic of Congo, in three health zones (Dikungu, Tshumbe and Wembo-Nyama) endemic to Human African Trypanosomiasis (HAT). It aimed to determine the species of African trypanosomes infecting the tsetse flies prevalent in these three health zones. A total of 446 flies were captured using traps (BCT, Grémansin and Stop); 81 live flies were dissected to sample the proboscis, salivary glands and midgut for microscopic observations and molecular diagnosis (qPCR and PCR) of trypanosome species.

On the set of positive samples, 95,1 % were determined by molecular diagnosis compared to 4,9 % observed exclusively by microscopy. Molecular analyzes have a significant impact ($P < 0,001 < 0,05$) on the detection of trypanosomes (sensitive and specific) compared to microscopic observation. Indeed, they are slow and expensive.

The taxonomic groups of trypanosomes infecting *Glossina fuscipes fuscipes* in the areas studied are *Trypanosoma brucei gambiense* (14,8 %), *Trypanosoma congolense savannah* (3,7 %) and *Trypanosoma congolense forest* (1,2 %). There is coexistence of Human and Animal African Trypanosomiasis in this study environment. The development of new strategies integrating measures to combat human and animal trypanosomiasis could enable the elimination of gTHA as a public health problem by 2030.

Key words – Microscopy, PCR/qPCR, *Trypanosoma*, *Glossina*, Sankuru.

I. INTRODUCTION

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma* appartenant à la famille des *Trypanosomatidae* [1]. Ils sont des parasites des plantes (*Phytomonas*), et du sang, de la lymphe, des tissus ou des cavités de toutes les classes de vertébrés. Le cycle des trypanosomes des vertébrés inclut deux hôtes, un vertébré et un invertébré hématophage [2,3].

Des 125 espèces de trypanosomes connues, les plus étudiées sont celles responsables de maladies chez l'homme (maladie du sommeil en Afrique ou maladie de Chagas en Amérique du Sud) ou chez l'animal (Nagana en Afrique, Surra en Asie, Mal de caderas ou Murrina en Amérique, Dourine partout dans le monde). Ces espèces peuvent être réparties en deux groupes (*Stercoraria* et les *Salivaria*), selon leur mode de développement dans l'insecte vecteur et dans l'hôte [4]. Les trypanosomes africains provoquent chez les humains la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil et chez les animaux les Trypanosomoses Animales Africaines (TAA) ou Nagana [5,6].

La THA constitue une grave menace pour la santé d'au moins 50 millions de personnes en Afrique subsaharienne. Ces dernières années, le nombre de cas est passé sous la barre de 1000, avec 977 cas recensés en 2018 selon l'OMS [7]. C'est une maladie parasitaire vectorielle transmise par les glossines (mouches tsé-tsé) en Afrique subsaharienne [8]. La maladie existe sous deux formes dues à deux parasites différents :

- la forme chronique provoquée par *Trypanosoma brucei gambiense* (gTHA), dans 24 pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale avec 98 % des cas dont 84 % en RD Congo ;
- la forme aigüe provoquée par *Trypanosoma brucei rhodesiense* (rTHA), dans 13 pays d'Afrique orientale et australe, avec 2 % des cas restant [9,10].

Au cours de la période 2011-2020, les cas de gTHA en RD du Congo ont diminué de manière substantielle et régulière, avec plus de 5 500 cas par an déclarés en 2011-2013, 613 cas en 2019 et 395 en 2020 [11]. Dans la feuille de route pour les maladies tropicales négligées 2021-2030, l'OMS a ciblé la gTHA (à chimiothérapie non préventive) pour éliminer sa transmission d'ici 2030 [12,13].

Les TAA sont des maladies animales dues à un complexe d'espèces : *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense* et *Trypanosoma brucei brucei* [14]. Elles sont responsables annuellement de plus de 3 millions de morts chez les bovins, avec un impact économique estimé à plus de 2 milliards d'euros pour les seuls bovins, et plus du double si on considère l'ensemble de l'élevage [15,16,17].

Les principaux piliers de la stratégie d'élimination de la THA sont : la détection active et passive des cas, la gestion des cas et la lutte antivectorielle afin de rompre la chaîne de transmission [18, 19,20]. Ce dernier pilier vise à réduire le contact humains/vecteurs en le maintenant pendant un nombre d'années (estimé à 4-5 ans, à cause de la durée de la maladie chez l'homme), pendant que simultanément, les équipes médicales traitent le réservoir humain des trypanosomes, les parasites pourraient disparaître du foyer [21].

La lutte antivectorielle devant s'orienter vers des techniques non polluantes. Dans ce domaine, la mise au point de pièges pour la capture des glossines contribuerait grandement à lutter contre la THA. Par sa simplicité et son faible coût, le piégeage constitue l'une des alternatives les plus adaptées pour la participation communautaire et le respect du milieu [22,23].

L'objectif poursuivi par cette étude est de déterminer les groupes taxonomiques de trypanosomes affectant les glossines dans les zones endémiques à la THA de la Province du Sankuru en République Démocratique du Congo.

II. METHODES

La Province du Sankuru est située à 3,4° latitude Sud, 24,42° longitude Est et 494,6 m d'altitude. Selon la classification de Köppen-Geiger, la Province du Sankuru est traversée par un climat tropical humide (AW₄) avec végétation de savane [24].

Dans cette étude, trois types de pièges ont été expérimentés :

- Piège BCT élaboré par le PNLTHA en 1993 [25] témoin ;
- Piège Grémansin proposé par Grébaut et Mansinsa en 2020 [26] et ;
- Piège Stop proposé par Lokanga, Luamba, Mumba et Mutambel en 2022.

Le Piège Stop est une adaptation et une amélioration du Piège DBS de Mukonkole Mulumba Jean Claude et Luamba Lua Nsembo Jean [27]. Dans les trois zones de santé (Dikungu, Tshumbe et Wembo-Nyama), 234 pièges ont été installés dans 15 aires de santé dont 26 villages, pendant quatre mois soit du 02 Janvier au 30 Avril 2023.

Pendant l'enquête entomologique, la visite de pièges se faisait une fois par jour entre 16 à 17 heures. Toutes les mouches collectées ont été identifiées morphologiquement, comptées et triées en mouches ténérales et non ténérales comme décrit ailleurs par Laveissière et ses collaborateurs [28]. Seules les glossines non-ténérales et vivantes étaient disséquées sous la loupe binoculaire en séparant soigneusement ses trois principaux organes (le proboscis, les glandes salivaires et l'intestin moyen) susceptibles d'héberger le trypanosome. Ces organes sont soumis à l'observation microscopique. Pour les besoins d'une caractérisation moléculaire ultérieure, les échantillons ont été suspendus séparément dans des tubes eppendorf de 1,8 ml contenant du DNA/RNA Shield. Le réactif DNA/RNA Shield de Zymo Research est une solution de stabilisation d'ADN et d'ARN était utilisé pour conserver les échantillons de glossines à température ambiante.

Le diagnostic moléculaire des Trypanosomes, l'ADN a été extrait des échantillons des trois principaux organes (proboscis, glandes salivaires et intestin moyen). L'extraction a consisté d'abord à broyer chaque organe dans 200 µl de CTAB 2 %, suivi de chauffage et différentes phases de centrifugation à 12 000 rpm avec chloroforme, Isopropanol et éthanol. Les extraits ont ensuite été séchés pendant 5 minutes à la température ambiante et suspendus dans l'eau stérile toute une nuit sur la paillasse ou ½ journée [29, 30,31]. Les extraits d'ADN ont enfin été conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation [28].

Tableau 1 Préparation de master mix pour la qPCR

Réactifs	Volumes (µl)	Canaux	Positif	Négatif
qSCRIPT XLT	10			
q18S2	1	Col fluor orange	≤35	>35
q177T	1	FAM	≤35	>35
qTgsGP	1	Cys	≤35	>35
Nucloase free water	2			
Volume s/total	15			
DNA extrait	5			
Volume total	20			

Pour la qPCR, on a utilisé deux types d'amorces (fragment d'ADN ou ARN servant de point de départ à une polymérisation [32]) ont été utilisés. Les q18S2 et q177T pour détecter de la famille de trypanosomidae, et le qTgsGP pour identifier l'espèce de *T. brucei gambiense*.

Identification par Diagnostic moléculaire des Trypanosomes chez les Glossines dans les Zones endémiques de la Province du Sankuru en République Démocratique Congo

Le programme d'amplification dans le Thermocycleur Quantabio a commencé par une étape de dénaturation à 94 °C pendant 3 min suivie de 40 cycles d'amplification. Chaque cycle contient une étape de dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, une étape de recuit à 51 °C pendant 45 secondes et une étape d'extension à 72 °C pendant une minute suivie d'une extension finale à 72 °C pendant 5 min. La lecture des résultats est effectuée à l'aide du logiciel Quantabio.

Avant de préparer le Master mix pour la PCR, il faut homogénéiser les composants individuels avant utilisation et assembler tous les composants de la réaction sur la glace.

Tableau 2 Préparation de master mix pour la PCR conventionnelle

Réactif	Volume (µl)
Tampon standard	12,5
10 µM Amorce sens	0,5
10 µM Amorce anti-sens	0,5
ADN extrait	5
H ₂ O sans nucléases	6,5
Volume s/total	25

Le programme d'amplification dans le Thermocycleur Biometra T3000 durant 1h39' à 39 cycles. Une fois l'amplification PCR terminée, 10 µl de produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 5% pendant 30 minutes. A la suite de la migration des amplicons en fonction de leur taille, tremper dans un bassin contenant du bromure d'éthidium 6 %. A la fin de chaque électrophorèse, le gel a été visualisé sous lumière UV et une photo de chaque gel a été imprimée.

Le diagnostic moléculaire, les amorces pour l'identification des souches de *Trypanosoma congolense* type forêt, *Trypanosoma congolense* type savane et *Trypanosoma brucei gambiense* ont été utilisées [33,34,35].

Tableau 3 Caractéristiques des couples d'amorces utilisées pour la PCR

Spécificité	Séquence des amorces (5'→3')	T (°C)	Taille (pb)
<i>T. congolense</i> savane	TCS1: CGA-GAA-CGG-GCA-CTT-TGC-GA TCS2: GGA-CAA-ACA-AAT-CCC-GCA-CA	55	241
<i>T. congolense</i> forêt	TCF1: GGA-CAC-GCC-AGA-AGG-TAC-TT TCF2: GTT-CTC-GCA-CCA-AAT-CCA-AC	55	350
<i>T. brucei gambiense</i>	Tg19-F : GCT-GCT-GTG-TTC-GGA-GAGC Tg19-R : GCC-ATC-GTG-CTT-GCC-GCTC	63	310

Source : [33,4,35]

III. RESULTATS

Tableau 4 Taux d'infection détectée en microscopie et en diagnostic moléculaire (DM)

Zone de santé	Microscopie+		Microscopie-		DM+		DM-	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Dikungu	1	6,3	15	93,8	1	6,3	15	93,8
Tshumbe	0	0	13	100	1	7,7	12	92,3
Wembo-Nyama	3	5,8	49	94,2	15	28,9	37	71,1
Total	4	4,9	77	95,1	17	21	64	79,1

L'analyse des données sur le taux d'infection montre que :

- le taux d'infection détecté par microscopie et diagnostic moléculaire était 6,3 % à **Dikungu** ;
- aucune infection n'a été observée par microscopie à **Tshumbe**, mais le diagnostic moléculaire y a révélé un taux d'infection de 7,7 % **positifs** ;
- le taux d'infection observé par microscopie est de 5,8 % à **Wembo-Nyama** tandis que le diagnostic moléculaire a manifesté un taux d'infection plus élevé de 28,9 %.

Tableau 5 Taux d'infection révélé par site de capture

Site de capture	Microscopie+		Microscopie-		DM+		DM-	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Village	3	5,4	53	94,6	13	23,2	43	76,8
Point d'eau	1	4	24	96	4	16	21	84
Total	4	4,9	77	95,1	17	21	64	79

Le tableau 5 ci-haut présente les résultats selon les sites de captures :

- aux villages : 5,4 % des cas étaient positifs à la microscopie contre 94,6 % des cas négatifs ; tandis que le diagnostic moléculaire a révélé 23,2 % des cas positifs contre 76,8 % des cas négatifs ;
- aux points d'eau : 4 % des cas étaient positifs à la microscopie contre 96 % des cas négatifs ; tandis que 16 % des cas révélés positifs au diagnostic moléculaire contre 84 % des cas négatifs.

Tableau 6 Taux d'infection détecté des glossines par type de piège

Pièges	Microscopie+		Microscopie-		DM+		DM-	
	n	%	n	%	n	%	n	%
BCT	1	6,7	14	93,3	3	20	12	80
Grémansin	1	7,1	13	92,9	6	42,9	8	57,1
Stop	2	3,8	50	96,2	8	15,4	44	84,6
Total	4	4,9	77	95,1	17	21	64	79

Les données présentées le tableau ci-dessus indiquent que :

- Pour le piège **BCT**, 6,7 % des échantillons étaient positifs à la microscopie, tandis que 20 % étaient positifs au diagnostic moléculaire ;
- Pour le piège Grémansin, 7,1 % des échantillons étaient positifs à la microscopie, tandis que 42,9 % étaient positifs au diagnostic moléculaire ;
- Pour le piège Stop, 3,8 % des échantillons étaient positifs à la microscopie, tandis que 15,4 % étaient positifs au diagnostic moléculaire.

Tableau 7 Taux d'infection des glossines à la microscopie selon le sexe

Sexe	Microscopie+		Microscopie-		Total		P-value
	n	%	n	%	N	%	
Femelle	3	6	47	94	50	61,7	1
Mâle	1	3,2	30	96,8	31	38,3	
Total	4	4,9	77	95,1	81	100	

Concernant le taux d'infection des glossines à la microscopie selon le sexe, les données dans le tableau 7 ci-haut montrent que **6 %** des femelles ont été testées positives pour la microscopie contre **3,2 %** des mâles sur un taux d'infection total est de **4,9 %**. La valeur $P > 0,05$ fournie par le test de Fisher appliqué à la table de contingence est de 1. Il n'y a donc pas un lien perceptible entre le taux d'infection des femelles par rapport et celui des mâles. Ainsi, l'hypothèse nulle ne peut être rejetée.

Tableau 8 Taux d'infection par diagnostic moléculaire (DM) selon le sexe

Sexe	DM+		DM-		Total		OR	IC (95 %)	
	n	%	n	%	N	%		Inf.	Sup.
Femelle	9	18	41	82	50	61,7	Réf	Réf	Réf
Mâle	8	25,8	23	74,2	31	38,3	0,63	0,24	2,40
Total	17	21	34	79	81	100			
Coefficient	Réf		-0,28						
E. standard	Réf		0,57						

Les analyses sur la prévalence du taux d'infection par diagnostic selon le sexe montrent qu'il y'a eu 18 % des cas positifs contre 82 % des cas négatifs des glossines femelles et 25,8 % des cas positifs contre 74,2 % des cas négatifs des glossines mâles.

L'Odds Ratio (OR) pour les mâles par rapport aux femelles est de 0,63, avec un intervalle de confiance à 95 % allant de 0,24 à 2,40. Le coefficient pour les mâles est de -0,28 avec une erreur standard de 0,57. La probabilité d'infection étant en moyenne de 0,28 unité se révèle plus faible chez les mâles que chez les femelles. Il n'y a pas un impact significatif entre les mâles et les femelles en termes de taux d'infection détecté par diagnostic moléculaire.

Tableau 9 Taux d'infection des glossines par organe

6	Microscopie+		Microscopie-		DM+		DM-	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Proboscis	0	0	0	0	0	0	0	0
GS	0	0	0	0	0	0	0	0
IM	4	4,9	77	95,1	17	21	64	79
Total	4	4,9	77	95,1	17	21	64	79

Les données du taux d'infection des organes sont consignées dans le tableau 9 indiquent que pour le proboscis et les glandes salivaires (GS), aucun échantillon n'était positif ni à la microscopie ni au diagnostic moléculaire ; par contre, pour l'intestin moyen (IM), 4,9 % d'échantillons positifs à la microscopie ; tandis que 21 % positifs au diagnostic moléculaire.

Tableau 10 Taux d'infection des glossines par stade du développement des trypanosomes

Stade	Organes		
	Proboscis	GS	IM
<i>Forme procyclique</i>	0	0	17 (100 %)
<i>Forme épimastigote</i>	0	0	0
<i>Forme trypomastigote</i>	0	0	0

Les données dans le tableau 10 ci-haut montrent que :

- la forme procyclique a été détectée uniquement dans l'intestin moyen (IM), avec un taux de 100 % ; tandis qu'aucune forme procyclique n'a été détectée dans le proboscis ni dans les glandes salivaires (GS) des glossines capturées.
- aucune forme épimastigote ou forme trypomastigote n'a été détectée.

Tableau 11 Comparaison diagnostic moléculaire versus microscopie

Microscopie	DM+		DM-		Total		P-value
	n	%	n	%	N	%	
Positif	4	100	0	0	4	4,9	0,001
Négatif	13	16,9	64	83,1	77	95,1	
Total	17	21	64	79	81	100	

Les données dans le tableau 11 illustrent que :

- **positif en microscopie et en diagnostic moléculaire** : 4 cas (soit 100 % des cas positifs en microscopie) où les deux techniques indiquent un résultat positif. Cela représente 4,9 % de l'ensemble des cas ;
- **négatif en microscopie mais positif en diagnostic moléculaire** : 13 cas (soit 16,9 % des cas négatifs en microscopie) où la microscopie a donné un résultat négatif, mais le diagnostic moléculaire a donné un résultat positif ;

- **négatif en microscopie et en diagnostic moléculaire** : 64 cas (soit 83,1 % des cas négatifs en microscopie) où les deux techniques indiquent un résultat négatif. Cela représente 95,1 % de l'ensemble des cas. La valeur P $0,001 < 0,05$ montre une différence significative observée entre les résultats obtenus par la microscopie et par le test moléculaire.

Tableau 12 Taux d'infection *Trypanosoma brucei gambiense*

Zone de santé	Positif		Négatif		Total		P-value
	n	%	n	%	N	%	
Dikungu	0	0	16	100	16	19,8	0,072
Tshumbe	1	7,7	12	92,3	13	16,0	
Wembo-Nyama	11	21,2	41	78,8	52	64,2	
Total	12	14,8	69	85,2	81	100	

Pour détecter *T. brucei gambiense* dans différentes zones de santé, la qPCR a fourni les résultats repris dans le tableau 9 ci-dessus :

- **Dikungu**: aucune amplification n'a été observée avec les amorces spécifiques (q18S2 et qTgsGP) contre 16 (100 %) négatifs ;
- **Tshumbe**: 1 (7,7 %) a amplifié positivement contre 12 (92,3 %) négatifs ;
- **Wembo-Nyama**: 11 (21,2 %) ont amplifié positivement contre 12 (92,3 %) négatifs.

Au total, sur 81 (100 %) des échantillons analysés, 12 (14,8 %) ont amplifié positivement contre 69 (85,2 %) négatifs. La valeur P indiquée est de 0,072, ce qui suggère que les différences observées ne sont pas statistiquement significatives au seuil de 0,05.

Identification d'autres espèces de trypanosomes par PCR

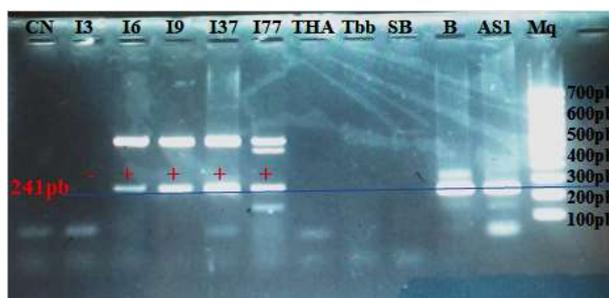


Fig. 1 Electrohorèse sur gel d'agarose 5 % des produits de PCR

Légende : CN = contrôle négatif, I3, I6, I9, I37 et I77 échantillons de l'intestin moyen, THA = amorce de *T. brucei gambiense*, B = contrôle positif, AS1 = contrôle positif, Mq = marqueur de poids moléculaire.

A la suite d'une amplification par les amorces spécifiques de *Trypanosoma congolense* savane, la lecture sur gel d'agarose des produits de PCR révèle que 4 échantillons (80 %) étaient positifs (migration d'ADN à 241 pb) contre 1 échantillon (20 %) négatifs (Fig. 1).

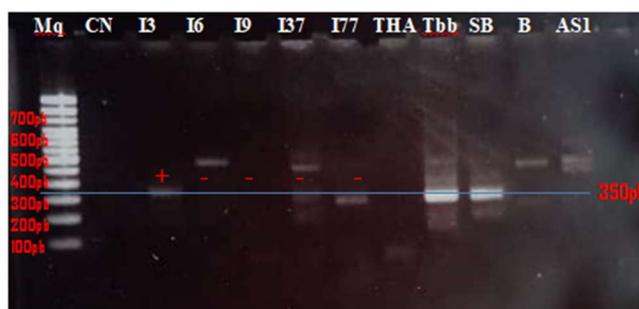


Fig. 2 Electrophorèse sur gel d'agarose 5 % des produits de PCR

Légende : Mq = marqueur de poids moléculaire, I3, I6, I9, I37 et I77 échantillons de l'intestin moyen, THA = contrôle positif, B = contrôle positif, AS1 = contrôle positif, CN = contrôle négatif.

Après une amplification par les amorces spécifiques *Trypanosoma congolense* forêt, la lecture sur gel d'agarose montre que 1 échantillon (20 %) positif (migration d'ADN à 350 pb) contre 4 échantillons (80 %) négatifs (Fig. 2).

Tableau 13 Espèces de trypanosomes selon les zones de santé

Espèce	Zones de santé		
	Dikungu	Tshumbe	Wembo-Nyama
<i>T. brucei gambiense</i>	-	+	+
<i>T. congolense savane</i>	+	-	+
<i>T. congolense forêt</i>	-	-	+

Les résultats des espèces de trypanosomes selon les zones de santé repris dans le tableau 13 ci-haut montrent que :

- *Trypanosoma brucei gambiense* est présent à Tshumbe et à Wembo-Nyama, mais absent à Dikungu ;
- *Trypanosoma congolense savane* est présent à Dikungu et à Wembo-Nyama par contre absent à Tshumbe et ;
- *Trypanosoma congolense forêt* est présent à Wembo-Nyama et absent à Dikungu et à Tshumbe.

IV. DISCUSSION

En microscopie tout comme en diagnostic moléculaire, le pourcentage des glossines infectées était plus élevé à Dikungu (6,3 %) qu'aux deux autres zones de santé (Tshumbe 0 % et Wembo-Nyama 5,8 %). Par contre, le diagnostic moléculaire montre Wembo-Nyama (28,9 %) à la première position suivi de Tshumbe (7,7 %) et Dikungu (6,3 %). Ces résultats d'infection sont proportionnels à la fréquence de capture par zone de santé.

Concernant les sites de capture, il a été remarqué que quelle que soit la technique utilisée, les glossines capturées dans les villages étaient plus infectées par rapport à celles des points d'eau. La disponibilité de sites de repos appropriés et de sources de nourriture permanentes fait que les glossines soient plus susceptibles d'entrer en contact avec des hôtes infectés dans les villages, ce qui pourrait augmenter leur taux d'infection [36].

Pour les deux techniques (microscopie et diagnostic moléculaire), le parasitisme des glossines capturées varie d'un type de piège à l'autre. Par ordre décroissant, on a : le **piège Grémansin** (7,1 % contre 42 %), le **piège BCT** (6,7 % contre 20 %) et le **piège Stop** (3,8 % contre 15,4 %). Il est possible que le type de piège influence les espèces et le nombre de glossines capturées, affectant ainsi à son tour à son tour le taux d'infection [37].

En comparant les proportions d'infection trypanosomienne selon le sexe, il s'ensuit que les femelles sont légèrement plus infectées que les mâles. Cela se justifierait par le fait que les femelles qui ne s'accouplent qu'une seule fois, ne quittent leur gîte de repos qu'à la recherche d'hôtes nourriciers. Par contre, les mâles se déplacent à la fois pour la recherche du

repas sanguin et du partenaire sexuel [6]. Et aussi les femelles ont plus besoin du sang pour la maturation des œufs et après larvoposition. Les femelles sont souvent capturées sous l'effet de leurre [38,39]. Le test Fisher pour la microscopie ($P>0,05$) et la régression logistique par diagnostic moléculaire l'OR pour les mâles par rapport aux femelles est de 0,63, avec un intervalle de confiance à 95 % allant de 0,24 à 2,40. Ces valeurs prouvent que le sexe n'a pas un lien perceptible sur l'infection des glossines. Chez le genre *Glossina*, les deux sexes sont hématophages, et donc vecteurs potentiels de la maladie du sommeil [5,20].

Pour le taux d'infection des organes, aucun échantillon de proboscis et des glandes salivaires était positif ni à la microscopie, ni par diagnostic moléculaire. Par contre, l'intestin moyen représente 100 % du taux d'infection. Ce qui prouve que tous les trypanosomes étaient encore à la forme procyclique aucun pour les formes épimastigote et trypomastigote. Lorsqu'une glossine prend son repas sanguin sur un hôte infecté, les trypanosomes entrent dans son système digestif et passent par plusieurs stades de développement dans l'intestin moyen avant de migrer vers d'autres parties de l'organisme de la mouche, comme les glandes salivaires [40,41].

Sur tous les échantillons, 95,1 % étaient déterminés par diagnostic moléculaire contre 4,9 % observés en microscopie. Aucun échantillon n'a été testé positif en microscopie mais négatif en diagnostic moléculaire. La valeur $P 0,001<0,05$ suggère qu'il y a une différence significative entre les résultats obtenus par la microscopie et par le diagnostic moléculaire. Il s'ensuit que le test moléculaire est plus sensible et plus spécifique que l'observation microscopique pour détecter les trypanosomes [41].

Bien que la microscopie soit une méthode rapide et économique, elle présente une faible sensibilité et demeure aspécifique. D'autre part, le diagnostic moléculaire (PCR/qPCR), plus coûteux et lent, offre une sensibilité et une spécificité élevées, permettant d'identifier non seulement le genre, mais aussi l'espèce et la sous-espèce [31].

Sur l'ensemble d'échantillons analysés par qPCR, 14,8 % d'échantillons (21,2 % positifs à Wembo-Nyama, 7,7 % positifs à Tshumbe et 0 infection à Dikungu) ont amplifié positivement à l'espèce *Trypanosoma brucei gambiense* contre 85,2% d'échantillons non amplifiés. La couverture végétale importante avec des résidus forestiers et les rivières ont été identifiées à Wembo-Nyama comme types d'environnements présentant un plus grand risque de transmission de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense* [28]. La valeur $P 0,072>0,05$ ce qui suggère que les différences observées ne sont pas statistiquement significatives.

Concernant l'identification des autres espèces de trypanosomes, la lecture sur gel d'électrophorèse des produits de PCR a révélé que 80 % d'échantillons étaient positifs à l'espèce *Trypanosoma congolense* savane (migration d'ADN à 241 pb) contre 20 % d'échantillons positifs à l'espèce *Trypanosoma congolense* forêt (migration d'ADN à 350 pb).

Parmi les espèces de trypanosomes affectant les glossines selon les zones de santé, il a été identifié :

- *Trypanosoma brucei gambiense* à Tshumbe et à Wembo-Nyama, mais pas à Dikungu ;
- *Trypanosoma congolense* savane à Dikungu et à Wembo-Nyama mais absente à Tshumbe et ;
- *Trypanosoma congolense* forêt est présent à Wembo-Nyama et absente à Dikungu et à Tshumbe.

Ces différentes espèces de trypanosomes identifiées dans les zones endémiques de la maladie du sommeil au Sankuru indiquent la coexistence de la trypanosomiase africaine animale et humaine. Les résultats obtenus se rapprochent à ceux de la référence [17] et de ceux de la référence [36] en Côte d'Ivoire, et de la référence [28] à Kimpese en RD Congo.

V. CONCLUSION

L'étude a visé à déterminer les espèces de trypanosomes africains infectant les glossines sévissant dans les zones de santé endémiques à la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) de la province du Sankuru en RD Congo.

Des 446 glossines capturées dans les trois zones de santé (Dikungu, Tshumbe et Wembo-Nyama) à l'aide des pièges (BCT, Grémansin et Stop), 81 glossines vivantes ont été disséquées afin de prélever le proboscis, les glandes salivaires et l'intestin moyen pour des observations et analyses moléculaires. L'observation microscopique et le diagnostic moléculaire (qPCR et PCR) des espèces de trypanosomes sont des techniques qui ont été utilisées.

Sur tous les échantillons positifs, 95,1 % étaient déterminés par diagnostic moléculaire contre 4,9 % observés exclusivement en microscopie. Les analyses moléculaires impactent significativement ($P < 0,001 < 0,05$) sur la détection des trypanosomes (sensible et spécifique) par rapport à l'observation microscopique. En effet, elles sont lentes et coûteuses.

Les groupes taxonomiques de trypanosomes infectant les *Glossina fuscipes fuscipes* dans des zones étudiées sont les trois espèces suivantes *Trypanosoma brucei gambiense* (14,8 %), *Trypanosoma congolense* savane (3,7 %) et *Trypanosoma congolense* forêt (1,2 %). Il existe donc une coexistence de la Trypanosomiase africaine humaine et animale dans les trois zones de santé du Sankuru. Le développement de nouvelles stratégies intégrant des mesures de lutte contre la trypanosomiase humaine et animale pourrait permettre l'élimination de la gTHA en tant que problème de santé publique d'ici 2030.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos profondes gratitudee à Monsieur IMPONGE LOLEMA Joël, Superviseur du laboratoire de Biologie moléculaire de l'Institut National de Recherche Biomédicale, pour son assistance technique.

DIVULGATION DE CONFLIT D'INTERETS

Tous les auteurs ont été impliqués dans la conception de l'étude, la recherche expérimentale et la rédaction scientifique de l'article.

REFERENCES

- [1] OMS, 2013 : *Trypanosomiase humaine africaine*. Série de rapports techniques n° 984, Genève, 255 p.
- [2] Mpanya A, Hasker E, Kwete J, 2012 : Should I Get Screened for Sleeping Sickness? A Qualitative Study in Kasai Province, Democratic Republic of Congo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (e1467) : pp 1-9.
- [3] Laveissière C, Grébaud P, Herder S et Penchenier L, 2000 : *Les glossines vectorielles de la Trypanosomiase humaine*. Éditions IRD : Bondy, France, 246 p.
- [4] Milocco C, 2009 : *Identification des trypanosomes circulant chez les rongeurs et les bovins en Asie du sud-est*. CNRS, CIRAD, Université de Kasetsart, Thaïlande, 39 p.
- [5] Solano P, Sidibe I et Rotureau B. Les Glossines (Diptera : Glossinidae). In Duvallet G, Fontenille D et Robert V, 2017 : *Entomologie médicale et vétérinaire*. IRD Éditions, Paris, pp. 367-389. DOI : 10.4000/books.irdeditions.21923.
- [6] Bosson V, Acapovi G, Kaba D, Dofini F, Coulibaly B, N'dri L et Kone M, 2012. Infection de *glossina palpalis palpalis* par les trypanosomes le long du fleuve Comoé dans la région d'Abengourou (Côte d'Ivoire). *Journal des sciences pharmaceutiques et biologiques*, 13(1) : pp 31-37.
- [7] SoAP, 2021 : *Maladies parasitaires endémiques en Afrique*. Manuel de Société Africaine de Parasitologie, Éditions AVENIR, Tome 1, Abidjan, 739 p.
- [8] Duvallet G, Fontenille D et Robert V, 2017 : *Entomologie médicale et vétérinaire*. IRD Éditions, Paris, 688 p. DOI : 10.4000/books.irdeditions.21923.
- [9] Ndung'u JM, Boulangé A, Picado A, Mugenyi A, Mortensen A, Hope A, Guihini B, Bucheton B, Wamboga C, Waiswa C, Kaba D, Matovu E, Courtin F *et al.* 2020 : Trypa-NO! contribue à l'élimination de la trypanosomiase humaine africaine gambiense en combinant la lutte contre la tsé-tsé avec « dépister, diagnostiquer et traiter » à l'aide d'outils et de stratégies novateurs, *Plos Neglected Tropical Diseases*, pp 1-9. DOI : 10.1371/journal.pntd.0008738.
- [10] Calon J, 2016 : *La lutte contre les maladies tropicales négligées*, Thèse doctorat en Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, Hauts-de-France, 99 p.
- [11] PLTA, 2022 : *Lutte antivectorielle et élimination de la trypanosomiase humaine africaine (THA) à gambiense*. Série de rapports de réunion du PLTA/numéro 1, FAO/OMS, Rome, 68 p.
- [12] Mbo F, Valverde O, Wamboga C, Douzima P.M, Laku R et Kande V, 2023 : *Bulletin d'information N°22*. Plateforme régionale de recherche clinique, Edition spéciale, Kinshasa, 40 p.

- [13] Mbo F, Valverde O, Wamboga C, Douzima P.M, Laku R, Kande V, 2022 : *Bulletin d'information N°21*. Plateforme régionale de recherche clinique, Kinshasa, 32 p.
- [14] Desquesnes M, Bengaly Z, Berthier D, Bossard G, Cene B, Hamidou I et Jamonneau V, 2017: *Recueil des protocoles standardisés des techniques de Diagnostic des trypanosomoses animales d'origine africaine*. CIRAD, OIE, CIRDES, France, 108 p.
- [15] Abro Z, Kassie M, Muriithi B, Okal M, Masiga D and Wanda G, 2021 : The potential economic benefits of controlling trypanosomiasis using waterbuck repellent blend in sub-Saharan Africa. *PLoS One*, 16 : e0254558.
- [16] Büscher P, Bart J, Boelaert M, Bucheton B, Cecchi G, Chitnis N *et al.*, 2018 : Do Cryptic Reservoirs Threaten Gambiense-Sleeping Sickness Elimination? *Trends in parasitology*, 34 : pp 197-207.
- [17] Djohan V, Kaba D, Rayaissé J-B, Salou E, Coulibaly B, Dofini F, Kouadio K.A.M, Solano P et Menan H, 2015 : Diversité spatio-temporelle des glossines le long du fleuve Comoé en Côte d'Ivoire. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 68 (1) : pp 39-44.
- [18] PLTA, 2011. *Bulletin d'information sur les glossines et les trypanosomoses*. Partie 2, Volume 33, Rome, 166p.
- [19] Mathu J, Boulangé A et Picado A, 2020 : Trypa-NO! contribue à l'élimination de la trypanosomiase humaine africaine gambiense en combinant la lutte contre la tsé-tsé avec « dépister, diagnostiquer et traiter » à l'aide d'outils et de stratégies novateurs, *Plos Neglected Tropical Diseases*, 1-9. DOI : 10.1371/journal.pntd.0008738.
- [20] Anonyme, 2016 : *Utilisation des "Mini écrans" pour lutter contre les glossines dans les foyers de maladie du sommeil à T. gambiense: Manuel de procédures*. Edition LSTM, 32 p.
- [21] Aksoy S, 2003 : Control of tsetse flies and trypanosomes using molecular genetics. [Lutte contre les glossines et les trypanosomes au moyen de la génétique moléculaire]. *Veterinary Parasitology*, 115 (2) : pp 125-145.
- [22] Dia M.L, Desquesnes M, Hamadou S, Bouyer J, Yoni W et Gouro A.S, 2008. Piège *Tétra* : Evaluation d'un modèle de petite taille pour la capture des vecteurs des trypanosomoses animales. *Revue Médecine vétérinaire*, 159 (1) : pp 17-21.
- [23] Belda M, Holtanová E, Halenka T and Kalvová J, 2014 : Climate classification revisited: from Köppen to Trewartha ». *Climate Research*, 59: 1–13. DOI: 10.3354/cr01204.
- [24] Laveissière C et Penchenier L, 2005 : *Manuel de lutte contre la maladie du sommeil*. Editions IRD, Marseille, 366 p. DOI : 10.4000/books.irdeditions.10497.
- [25] Mwamba E, 2021 : *Rapport annuel 2020*. PNLTHA, Kinshasa, 47 p.
- [26] Mukonkole JC et Luamba J, 2005 : *Efficacité des pièges DBS de fabrication artisanale dans la capture des Glossines*. 3^{èmes} Journées scientifiques sur les Trypanosomoses africaines à Kinshasa du 21 au 23 novembre 2005 : *La situation des trypanosomoses et des Glossines en RD Congo*. Mémoire Licence, Biologie et Sciences de la santé, IPN Kinshasa, 45p.
- [27] Simo G, Silatsa B, Flobert N, Lutumba P, Mansinsa P, Madinga J, Manzambi E, Deken R and Tazoacha A, 2012: Identification of different trypanosome species in the mid-guts of tsetse flies of the Malanga (Kimpese) sleeping sickness focus of the Democratic Republic of Congo. *Parasites & Vectors*, 5(201) : pp 1-9. DOI : 10.1186/1756-3305-5-201.
- [28] Boris E, 2016 : *Caractérisation génétique de glossina pallicera pallicera circulant dans le foyer de la maladie du sommeil de campo du sud forestier camerounais*. Mémoire de Master, Université de Dschang, Cameroun, 67p.
- [29] Dayo G.K, Rayaisse J.B, Ilboudo H, Salou E, Konkobo M, Yoni W, Ravel S et Solano P, 2015 : *Utilisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction) pour la Diagnose de trois espèces de glossines*. Fiche technique N° 45, CIRDES, URBIO, Burkina Faso.
- [30] Dyer N.A, Lawton S.P, Ravel S, Choi K.S, Lehane M.J, Robinson A.S, Okedi L.M, Hall M.J.R, Solano P and Donnelly M.J, 2008 : Molecular phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on mitochondrial (COI, 16S, ND2) and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the *Palpalis* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1) :pp 227-239.

- [31] Daniel L et Elizabeth W, 2003. *Génétique – Les grands principes*. 3^e Edition DUNOD, Paris, 609 p.
- [32] N’djetchi M, 2020 : *Diversité génétique de Trypanosoma brucei sensu lato chez les animaux domestiques et implication épidémiologique dans la transmission de la Trypanosomose Humaine Africaine (THA) dans les foyers du Centre-Ouest de la Côte d’Ivoire*. Université Jean Lorougnon GUEDE. Thèse de doctorat en Ecologie, Biodiversité et Evolution, Abidjan, 182 p.
- [33] Yoni W, Bila C, Bouyer J, Desquesnes M et Kaboré I, 2005 : *Etude des Glossines : la dissection des Glossines ou mouches tsé-tsé*. Fiche technique N° 23, Burkina Faso : Santé animale en Afrique de l’Ouest, 12 p.
- [34] Morlais I, 1998 : *Identification des trypanosomes chez les Glossines en zones endémiques de trypanosomose humaine au Cameroun*, Thèse de doctorat. Université Montpellier II, Cameroun, 208 p.
- [35] Nekpeni E.B, Eouzan J.P et Dagnogo M, 1991 : Infection de *Glossina palpalis palpalis* (Diptera, Glossinidae) par les trypanosomes en zone forestière de Gagnoa en Côte d’Ivoire. *Tropical medicine and parasitology*, 42 : pp 399-403.
- [36] Bouyer J, Desquesnes M, Kaboré I, Lamine M, Gilles J, Yoni W et Cuisance D, 2005. Le piégeage des insectes Vecteurs. *Santé animale en Afrique de l’Ouest*, Fiche N° 20, Burkina Faso, 12 p.
- [37] PLTA, 2015 : *Bulletin d’information sur les glossines et les trypanosomoses*. FAO, Rome, 137 p.
- [38] Kazadi J.M, Losson B et Kageruka B, 2000 : Compétence vectorielle des mouches non ténérales de *Glossina morsitans morsitans* (Souche Mall) infectées par Trypanosoma (nannomonas) congolense IL 1180. *Bulletin de la Société Pathologique Exotique* ; 93(2) : pp25-28.
- [39] Cren-Travaillé C et Rotureau B, 2019 : *A la découverte des glossines, hôtes vecteurs des trypanosomes africains*. HAL open science, 12 p.
- [40] Zinga C.R, Mbang O.A, Acapovi G, Shango M, M’batchi B et Mavoungou J.F, 2015 : Etude préliminaire de l’infestation des glossines par les trypanosomes dans le baï de Momba (Nord-Est Gabon). *Agronomie Africaine*. 27 (2) : pp 95–104.
- [41] Grébaut P, Bena J-M, Manzambi E, Mansinsa P, Khande V, Ollivier G, Cuny G and Simo G, 2009 : Characterization of Sleeping Sickness Transmission Sites in Rural and Periurban Areas of Kinshasa (RD Congo). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(6) : pp 631-636. DOI: 10.1089/vbz.2008.0118.