

# Recherche du réservoir animal sauvage de *Trypanosoma* sp chez les mammifères de N'Djili-Brasseries à Kinshasa en République Démocratique du Congo (RDC)

M.W. KABAMBA MWAMBA<sup>1</sup>, G. TSHILENGE<sup>2</sup>, J. MALEKANI<sup>3</sup>

(Reçu le 20/02/2017; Accepté le 19/05/2017)

## Résumé

Durant 6 mois, 201 spécimens de mammifères sauvages représentant 7 espèces réparties en 6 genres, 4 familles et 3 ordres, dont 2 *Genetta angolensis*, 3 *Nandinia binotata*, 10 *Galagoides demidoff*, 35 *Protoxerus strangeri*, 73 *Funisciurus congicus*, 15 *Rattus rattus* et 63 *Rattus norvegicus*, ont été capturés dans le quartier N'Djili-Brasseries en vue d'identifier le réservoir animal sauvage des trypanosomes. La présente étude a montré par la méthode de la réaction de polymérisation en chaîne, ou Polymerase Chain Reaction (PCR), que de ces sept espèces, seule *Rattus rattus* et *Rattus norvegicus* capturées dans le secteur habité par l'homme avaient *Trypanosoma brucei gambiense* avec une prévalence de 13,3% pour *Rattus rattus* et 9,5% pour *Rattus norvegicus*, ce qui nous conduit à conclure que ces deux espèces seraient réservoirs de *Trypanosoma brucei gambiense*.

**Mots clés:** Réservoir, *Trypanosoma* sp, mammifères, N'Djili-Brasseries, Kinshasa

## Search for the wild animal reservoir of *Trypanosoma* sp in mammals of N'Djili-Brasseries (Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

### Abstract

During 6 months, 201 specimens of wild mammals representing 7 species divided into 6 genera, 4 families and 3 orders, of which 2 *Genetta angolensis*, 3 *Nandinia binotata*, 10 *Galagoides demidoff*, 35 *Protoxerus strangeri*, 73 *Funisciurus congicus*, 15 *Rattus rattus* and 63 *Rattus norvegicus*, were captured at N'Djili-Brasserie to identify the wild animal reservoir of trypanosoma. This study revealed by using the method of polymerase chain reaction (PCR) that among these seven species, only *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*, captured in the area inhabited by man, had *Trypanosoma brucei gambiense* with a prevalence of 13.3% for *Rattus rattus* and 9.5% for *Rattus norvegicus*. This lead us to conclude that these two species would be reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense*.

**Keywords:** Reservoir, *Trypanosoma* sp, mammals, N'Djili-Brasseries, Kinshasa

## INTRODUCTION

En Afrique, les infestations à trypanosomes causent une mortalité et une morbidité chez les hommes, les animaux domestiques et sauvages vivant dans une aire géographique où les glossines sont présentes (Njiokou et al., 2004).

A Kinshasa, en République Démocratique du Congo (RDC), la situation épidémiologique de la trypanosomiase humaine africaine (THA) est complexe. En 1903, Dutton a reporté une prévalence de 2,4 % de la THA chez les personnes apparemment en bonne santé à Kinshasa (Fournet et al., 2000). En 1960, la THA a été considérée comme éradiquée. Cependant en 1995, 50 nouveaux cas ont été reportés. Plus de 200 nouveaux cas ont été mis en évidence en 1996, 443 nouveaux cas en 1997 et 912 nouveaux en 1998 (Louis et al., 2003). Toutefois, entre 1996 et 2000, 2.451 nouveaux cas de THA parasitologiquement confirmés ont été déclaré dans la ville province de Kinshasa, dont 39 % résidaient dans la zone urbaine (Ebeja et al., 2003). Pour ce qui est de la trypanosomiase animale africaine (TAA), une étude sérologique réalisée par Sumbu et al. (2009) a trouvé une prévalence de 45 % chez les porcs kinois.

Le réservoir animal de la THA et de la TAA a été évoqué par plusieurs auteurs en RDC (Kageruka et al., 1977; Makumyaviri et al., 1989; Schares et Mehlitz, 1996). Greggio (1917) avait déjà suggéré le rôle des porcs dans l'épidémiologie de la THA dans la vallée de l'Ikinci, où

la maladie du sommeil avait ravagé plus de la moitié de la population dans un environnement peu propice pour le vecteur mais où l'élevage porcin était bien implanté. D'ailleurs selon Funk et al. (2013) le maintien de *T.b. gambiense* nécessiterait l'existence d'un réservoir animal (faune sauvage ou porc) d'où il serait transmis occasionnellement à l'homme.

La présente étude vise à identifier le réservoir animal sauvage de la THA et de la TAA chez les mammifères sauvages de N'Djili-Brasseries qui est l'un des foyers de la trypanosomiase à Kinshasa, afin d'élucider son rôle dans la persistance de cette maladie dans ce foyer.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Site d'études

Les investigations ont été réalisées durant la période allant de janvier à juin 2010 et ont été effectuées dans le quartier N'Djili-Brasseries (Figure 1) dans la Commune de la N'Sele, à 35 km du centre ville dans la périphérie Est de Kinshasa. N'Djili-Brasseries est un quartier où l'activité humaine y est intense et dont la population vit des cultures maraichères et vivrières, ainsi que de l'élevage dont le plus important est celui des porcs. La végétation de la zone est essentiellement constituée de la savane herbeuse parsemée d'arbustes, des galeries forestières dégradées ou conservées par endroit et des lambeaux forestiers marécageux. Il est drainé par la rivière N'Djili. Quant

<sup>1</sup> Université Pédagogique Nationale, Faculté de Médecine Vétérinaire, B.P. 8815 Kinshasa-Binza, Kinshasa, RDC. Email: willykabamba2005@yahoo.fr

<sup>2</sup> Laboratoire Vétérinaire de Kinshasa, B.P.8842 Kinshasa/Gombe, RDC.

<sup>3</sup> Université de Kinshasa, Faculté des Sciences, Département de Biologie, B.P. 190 Kinshasa XI, RDC.

aux analyses de laboratoire, elles ont été effectuées au Laboratoire Vétérinaire Central de Kinshasa.

### Capture et identification des espèces de mammifères sauvages

En collaboration avec la population locale et une équipe de chasseurs de la zone, les mammifères ont été capturés dans un lambeau forestier de 70 ha appartenant au Centre Féminin Maman MOBUTU à 314 m d'altitude, entre 4° 48' 08" de latitude Sud et 15°30'43" de longitude Est en milieu sauvage et à 1,4 km de là, en milieu habité, dans un rayon d'environ 400 m autour du point à 259,5 m d'altitude, entre 4°47'68" de latitude Sud et de 15°35'19" de longitude Est pour ce qui est d'une partie des rats capturés.

Les spécimens de mammifères capturés dans la nature ont été identifiés en utilisant des clés de détermination et de description trouvées dans certaines publications (Delvoy et al., 1952 ; Halternorth et Diller, 1985 ; Kingdom, 2010).

### Prélèvement d'échantillons

Après tranquillisation des animaux au chloroforme, le prélèvement sanguin en intra cardiaque s'est fait à l'aide d'une seringue, après dissection. Les sangs ont été mis sur les papiers filtres de marque Whatman portant le code de l'animal, le lieu et la date de prélèvement. Par la suite, les papiers filtres ont été séchés à l'air ambiant puis, ont été gardés dans des enveloppes au réfrigérateur en attendant les analyses.

### Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN s'est basée sur le protocole Chelex tel que décrit par Geysen et al. (2003) à partir des confettis de 3mm issus de papiers filtres. L'ADN a été conservé à moins 20°C, après extraction.

### PCR et Nested PCR

La PCR dite Nested PCR fait intervenir une seconde PCR réalisée en utilisant de nouvelles amorces situées à l'intérieur du fragment nucléotidique obtenu avec le premier couple d'amorces. Le fragment à amplifier lors de la seconde PCR est plus court, ce qui réduit par conséquent les hybridations non spécifiques (Maser et al., 1989 ; Viljoen et al., 2005). Cette étude a utilisée 3 amorces qui sont : 18ST nF2 (CAA CGA TGA CAC CCA TGA ATT GGG GA), 18ST nR3 (GTC TCT TGT CAC TGA CAT TCT AGT G) et 18ST nR3 (TGC GCG ACC AAT AAT TGC AAT AC) ciblant les gènes ribosomiales pour une recherche de variation intra spécifique (Geysen et al., 2003). La nested PCR a été effectuée en deux rounds : le premier round a été exécuté avec un volume réactionnel de 25 µl dont 5µl de l'extrait d'ADN de l'échantillon, 1,6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5 µl de 5X colorless Go Taq, 0,5 µl de chacun des 4 dNTP, 0,4 µl de 5U Go Taq DNA polymérase, 10,2 µl d'eau de biologie moléculaire, 0,4 µl de chaque primer (Herder et al., 2002; Geysen et al., 2003). Les échantillons ont été amplifiés dans un thermocycler Master cyclé gradient de marque Eppendorf en passant par les étapes suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 4 minutes, dénaturation à 92°C pendant 30 secondes, hybridation à 58°C pendant

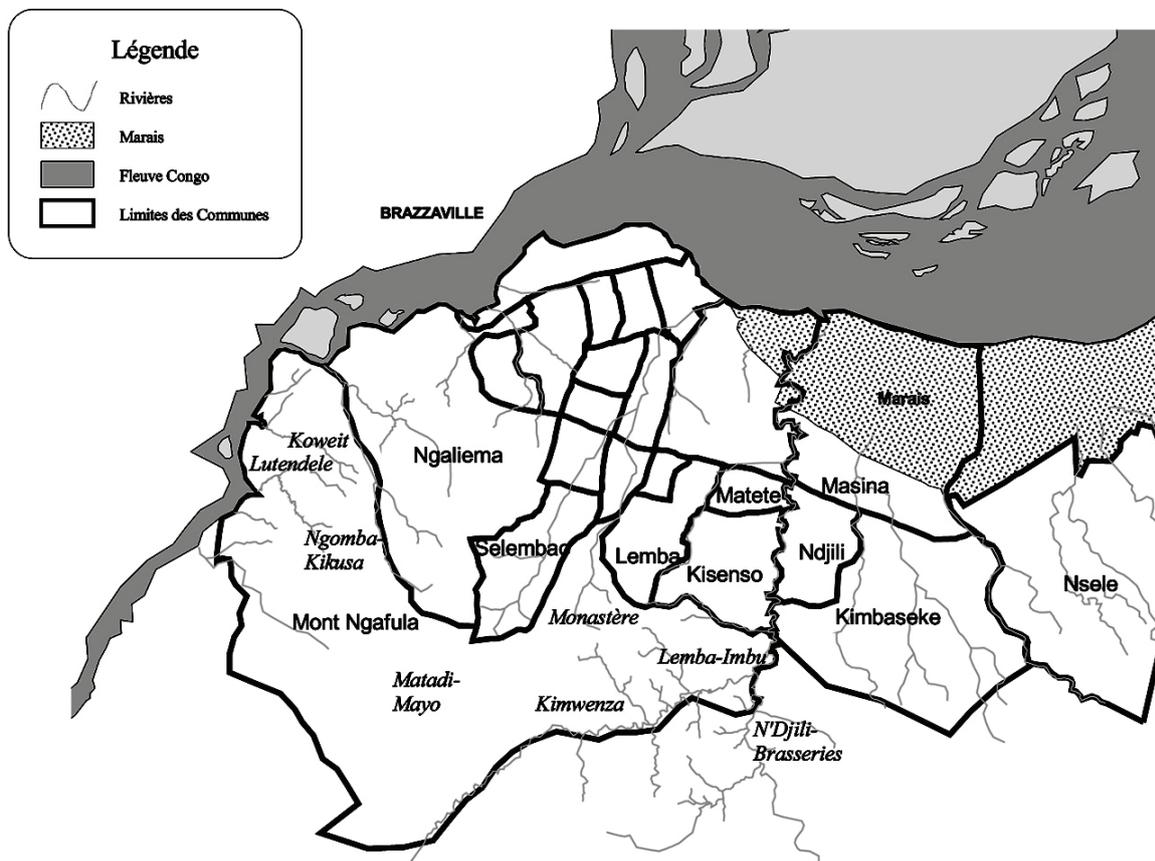


Figure 1: Carte géographique de Kinshasa

1 minute pour 39 cycles et une élongation finale à 72°C pendant 8 minutes. Après le premier round, une semi nested amplification a été réalisée en utilisant les amorces 18ST nF2 et 18ST nR2 avec un volume réactionnel de 24,5 µl auxquels on ajoute 0,5 µl de produits PCR du Premier tour (Geysen et al., 2003; Rotidi et Lehane, 2008). L'ITS-PCR développée par Desquesnes et al. (2001) permet la détection et l'identification simultanées des différentes espèces des trypanosomes affectant les animaux, en utilisant une paire d'amorces spécifiques ciblant la région 18S et 5n8S rDNA : Kin 1 (GCG TTC AAA GAT TGG GCAAT et Kin 2(CGC CCG AAA GTT CAC C). L'ITS-PCR a donc été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 5 µl de l'ADN de chaque échantillon, 50mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH : 8,3), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chaque dNTP, 20uM de chaque primer (Kin 1 et Kin 2) et 0,5 U de l'enzyme Taq polymerase, 50 µl d'huile minérale (Sigma) ont été ajoutés au volume réactionnel et placés dans le block de chauffage de thermocycler. Après dénaturation pendant 4 minutes à 94 °C, l'amplification a été faite pendant 40 cycles qui ont consistée à 94°C pendant 30 secondes de dénaturation, 59°C pendant 45 secondes d'hybridation et 1 minute d'élongation à 72°C suivi d'une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes. Ensuite, 5 µl de chaque produit PCR et 3µl de tampon de charge (Loading Dye 6x) ont été déposés sur gel agarose 2% (Bromure d'éthidium). La lecture a été faite sur une table ultra violette.

### Analyses statistiques

La proportion est le paramètre statistique qui a permis l'interprétation des données encodées en Excel. La proportion ou la prévalence est le rapport, exprimé en pourcentage, entre le nombre des cas sur le nombre d'individu à risque:  $\% = (X/\sum X)*10$ .

‰: Proportion ou Prévalence, X: Nombre des cas,  $\sum X$ : Nombre d'individus à risque

### RÉSULTATS

*Genetta angolensis*, *Nandinia binotata*, *Galagoides demidoff*, *Protoxerus strangeri*, *Funisciurus congicus*, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* (capturé dans le milieu sauvage) et *Rattus norvegicus* (capturé dans le milieu domestique)

sont les espèces de mammifères capturées dans le quartier N'Djili-Brasseries. *T. brucei gambiense* a été identifié chez les espèces capturées dans le secteur domestique ou habite l'homme. Il s'agit de *R. rattus* avec une prévalence de 13,3 % et *R. norvegicus* avec une proportion de 9,5 %. Par contre, *T. brucei brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. simiae*, *T. evansi*, *T. theileri* et *T. equiperdum* provoquant la TAA n'ont pas été mis en évidence. Cependant, certains trypanosomes n'ont pas pu être spécifiés chez *F. congicus* avec une prévalence de 1,3 %, *R. rattus* avec une proportion de 26,6 %, *R. norvegicus* avec une prévalence de 52,3 % (Tableau 1).

### DISCUSSION

Cette étude a mis en évidence *T. b. gambiense* chez *R. rattus* et *R. norvegicus* capturés dans le secteur habité par l'homme. Ces résultats ne corroborent pas avec ceux de Njiokou et al. (2005) qui ont confirmé que *Trypanosoma brucei gambiense* est effectivement présent chez *Cercoptes nictitans*, *Cephalophus dorsalis*, *Cephalophus monticola*, *Atherurus africanus*, *Cricetomys gambianus*, *Genetta servalina* et *Nandinia binotata* au Cameroun.

Van Hoof et al. (1942) ont été les premiers à suspecter le rôle de réservoir joué par les animaux domestiques comme le porc, la chèvre et le mouton en Côte d'Ivoire. Les travaux de Mehlitz (1985) confirment que *Trypanosoma brucei gambiense* est effectivement présent chez le porc en Côte d'Ivoire et au Libéria.

La présence de la THA seulement chez les rats capturés en milieu habité à N'Djili-Brasseries montre que l'homme joue un très grand rôle dans sa pérennisation, comme l'a démontré les investigations effectuées par Laveissiere et al. (1985) en zone de plantations de l'Afrique Occidentale sur le Guib harnaché (*Tragelaphus scriptus*), une antilope qui a une très nette tendance à vivre à proximité de l'homme, fournissant 46 % des repas sanguins aux *Glossina palpalis*, autant que l'homme dans les mêmes biotopes.

Par contre aucun trypanosome causant la TAA n'a été mis en évidence. Ces résultats ne corroborent pas avec ceux de Njiokou et al. (2004) qui ont confirmé que *T.b. brucei* est effectivement présent chez *Cercocebus torquatus*,

**Tableau 1: Espèces animales capturées et proportion des trypanosomes mis en évidence à N'Djili-Brasseries**

Espèce animale	Effectif	Nombre et espèce de trypanosome mis en évidence (%)								
		T.b.g	T.b.b.	T.c.	T.v	T.s.	T. ev.	T.t.	T. eq	T. sp
<i>Genetta angolensis</i>	2	0 (0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Nandinia binotata</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Galagoides demidoff</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protoxerus strangeri</i>	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Funisciurus congicus</i>	73	0	0	0	0	0	0	0	0	1(1,3%)
<i>Rattus rattus</i>	15	2 (13,3%)	0	0	0	0	0	0	0	4(26,6%)
<i>Rattus norvegicus*</i>	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rattus norvegicus#</i>	42	4 (9,5%)	0	0	0	0	0	0	0	22(52,3%)
Total	201	6 (2,9%)	0	0	0	0	0	0	0	27(13,4%)

Légende : T.b.g. : *T. brucei gambiense*, T.b.b. : *T. brucei brucei*, T.c. : *T. congolense*, T.v. : *T. vivax*, T.s. : *T. simiae*, T.ev. : *T. evansi*, T.t. : *T. theileri*, T.eq. : *T. equiperdum*, T.sp : Trypanosomes non spécifiés, \* : du secteur sauvage et # : du secteur domestique.

*Cercocebus albigena*, *Colobus guereza*, *Cercopithecus nictitans*, *Cercopithecus mona*, *Cercopithecus cephus*, *Miopithecus talopoin*, *Perodicticus potto*, *Arctocebus calabarensis*, *Cephalophus dorsalis*, *Cephalophus monticola*, *Tragelophus spekei*, *Atherurus africanus*, *Cricetomys gambianus*, *Crossarchus obscurus*, *Genetta servalina* et *Nandinia binotata*; que *T. congolense* se trouve effectivement présent chez *Colobus guereza*, *Cercopithecus nictitans*, *Perodicticus potto*, *Arctocebus calabarensis*, *Cephalophus dorsalis*, *Cephalophus monticola*, *Atherurus africanus*, *Heliosciurus rufobrachium* et *Cricetomys gambianus*; que *T. simiae* est effectivement présent chez *Cercocebus albigena*, *Cercopithecus nictitans*, *Cercopithecus mona*, *Cephalophus dorsalis*, *Cephalophus monticola*, *Atherurus africanus* et *Cricetomys gambianus* et que *T. vivax* est effectivement présent chez *Cercocebus torquatus*, *Cercocebus albigena*, *Cercopithecus neglectus*, *Colobus guereza*, *Cercopithecus nictitans*, *Cercopithecus mona*, *Cercopithecus cephus*, *Miopithecus talopoin*, *Perodicticus potto*, *Cephalophus dorsalis*, *Cephalophus monticola*, *Tragelophus spekei*, *Atherurus africanus*, *Cricetomys gambianus*, *Genetta servalina* et *Nandinia binotata* au Cameroun.

Cette absence des trypanosomes est probablement due à des traitements préventifs et curatifs entrepris par les éleveurs.

Pour ce qui est des trypanosomes qui n'ont pas pu être spécifiés, il se pourrait qu'il s'agisse de *T. lewisi* rencontré chez les rats, mais qui n'est pas pathogène et pour lequel les amorces n'ont pas été disponibles pour la confirmation.

## CONCLUSION

Au quartier N'Djili-Brasseries à Kinshasa, l'homme semble jouer un rôle important dans la pérennisation de la THA suite à la mise en évidence de *T. b. gambiense* chez les rats du secteur habité, mais pas chez ceux du milieu sauvage. Il devient alors impératif de procéder régulièrement à un dépistage actif et systématique des trypanosés, suivie de leur prise en charge, que de se contenter d'un dépistage passif; comme c'est le cas actuellement pour espérer contrôler la THA.

Par contre, aucun trypanosome à intérêt vétérinaire n'a été trouvé ni dans le milieu habité ni dans le milieu sauvage. Cette absence des trypanosomes est probablement due à des traitements préventifs et curatifs entrepris par les éleveurs.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Coopération Technique Belge pour avoir financé cette étude.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Delvoy G., Dartevelle E., Laurent R., Coodeman J., Burgeon L. (1952). Encyclopédie du Congo belge, Tome II, Ed. Bievelde, Bruxelles, 668 p.
- Desquesnes M., Mc Laughlin G., Zoungrana A., Davilla A. (2001). Detection and identification of trypanosome of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of ADN, *International journal of parasitology* 31: 610-614.
- Ebeja A., Lutumba P., Molisho D., Kegels D., Miaka mia Bilenge C. Boelaert M. (2003). Sleeping sickness in the region of the town of Kinshasa: a retrospective analysis during the surveillance period 1996-2000, *Trop. Med. Int., Health* 8: 949-955.
- Fournet F., Traore S., Cadot E., Hervouet J.P. (2000). Impact of development of agriculture land on the transmission of sleeping sickness in Daloa, Cote d'Ivoire, *Ann Trop Med Parasitol.* 94: 113-121.
- Funk S., Nishuira H., Heesterbeek H., Edmunds W.J., Checchi F. (2013). Identifying transmission cycle at the human-animal interface: the role of animal reservoir in maintaining Gambiense human African trypanosomiasis, *PLoS Comput. Biol.*, 9: e1002855.
- Haltenorth T., Diller H. (1985). Mammifères d'Afrique et de Madagascar, Ed. Delachaux et Niestle, Paris, 397 p.
- Kingdom J. (2010). The kingdom field guide to African mammals, Ed. Academic press, London, 476 pp.
- Geysen D., Delespau V., Geerts S. (2003). PCR-RFLP using Ssu rDNA amplification as a easy method for species specific diagnostic of *Trypanosoma* species in cattle, *Veterinary Parasitology* 110: 171-180.
- Greggio G. (1917). Trypanosomose des porcs : relation des porcs avec la trypanosomose humaine dans la vallée de Inkissi (Moyen Congo Belge), *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales* 10: 113-117.
- Herder S., Simo G., Nkinin S., Njiokou F. (2002). Identification of trypanosomes in wild animals from southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR), *Parasite* 9: 345-349.
- Kareguka P., Coelart J., Nkulu N., Bengaly Z., Sidibe I., Ganaba R., Boly H., Sawadogo L. (2002). Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: Clinical observations and haematological changes, *Veterinary Parasitology* 108, 1-19.
- Laveissiere C., Couret D., Staak C., Hervouet J.P. (1985). *Glossina palpalis* et ses hôtes en secteur forestier de Cote d'Ivoire. Relations avec l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. Parasitol.*, XXIII, 297-303.
- Louis F.J., Mia Bilenge C.N., Simarro P.P., Meso V.K., Lucas P., Jannin J. (2003). Trypanosomose Humaine Africaine en milieu urbain : une problématique émergente ?, *Bull Soc Pathol Exot*, 96: 205-208.
- Makumyaviri A., Mehlitz D., Kageruka P., Kazyumba G.L., Molisho D. (1989). Le réservoir animal de *Trypanosoma brucei gambiense* au Zaïre : infections trypanosomiennes dans deux foyers du Bas-Zaïre, *Tropical Medicine and Parasitology* 40; 259-261.

- Melhitz D. (1985). Das Tierreservoir des Gambiense Schlafkrankheit. Habilitationsschrift. *Fachbereich Veterinar-mezizin, Fele Universitat*, Berlin.
- Maser D.P., Cook G.A. Ochs D.E., Bailey C.P., Mc Kane M.P., Donelson J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei subspecies* by DNA amplification using a modified heteroduplex PCR based method, *Acta Tropica*, 91; 117-120.
- Njiokou P., Simo G., Nkinin S., Laveissiere C., Herdes S. (2004). Infection rate *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. vivax*, *T. congolense* forest type and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroun, *Acta tropica*, 136-146.
- Njiokou P., Laveissiere C., Simo G., Nkinin S., Grebaut P., Cuny G., Herder S. (2005). Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon, *Acta Tropica*, 231-237.
- Roditi I., Lehane M.J. (2008). Interaction between trypanosomes and tsetse flies, *Curr. Opin. Microbiolol.* 11: 345-351.
- Schareres G., Mehlitz D. (1996). Sleeping sickness in Zaire : a nested polymerase chain reaction improves the identification of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense* by specific kinetoplast DNA probes, *Tropical Medicine and International Health* 1: 59-70.
- Sumbu J., De Deken R., Deckers N., Mpiana S., Kabambi P., Tshilenge G., Boelaert M. (2009). Variation spatiale du risque pour les porcs de contracter la trypanosomose dans la zone periurbaine de Kinshasa, *Parasite* 16: 153-159.
- Van Hoof L.M.J., Henrard C. et Peel E. (1942). Irrégularité de la transmission du *Trypanosoma gambiense* par *Glossina palpalis*. *Rec. Trav. Sci. Méd. Congo Belge*, 1: 53-58.
- Viljoen G.J. Nel L.H., Crowther J.R. (2005). Molecular diagnostic PCR Handbook, AIEA/FAO, Springer, Netherland.