



HAL
open science

Recherche de parasites intestinaux, communément associés à un stade d'immunodéficience chez l'Homme, dans des populations de grands singes sauvages infectés ou non par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV)

Christelle Butel

► **To cite this version:**

Christelle Butel. Recherche de parasites intestinaux, communément associés à un stade d'immunodéficience chez l'Homme, dans des populations de grands singes sauvages infectés ou non par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV). Sciences du Vivant [q-bio]. 2012. dumas-01200980

HAL Id: dumas-01200980

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01200980>

Submitted on 17 Sep 2015

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.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS

Montpellier

MEMOIRE

présenté en vue d'obtenir

Le DIPLOME D'INGENIEUR CNAM

Spécialité : Sciences et techniques du vivant

Option : Génie biologique

par

Christelle BUTEL

Recherche de parasites intestinaux, communément associés à un stade d'immunodéficience chez l'Homme, dans des populations de grands singes sauvages infectés ou non par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV)

Soutenu le 14 juin 2012

JURY

PRESIDENT :

M. Philippe POCHART

Professeur CNAM-Paris

MEMBRES :

Mme Anne MARCILHAC

Maître de conférence à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes,
Responsable régionale de la filière Biologie CNAM-LR

M. David HUSSON

Enseignant en Biologie CNAM-LR

Mme Sabrina LOCATELLI

Chargée de Recherche à l'Institut de Recherche pour le
Développement, Montpellier

Mme Martine PEETERS

Directrice de Recherche à l'Institut de Recherche pour le
Développement, Montpellier

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée, soutenue, et encouragée pour la réalisation de ce mémoire :

Le Professeur Eric Delaporte, Directeur de l'UMI 233, pour m'avoir permis de réaliser mon stage d'ingénieur au sein de son unité.

Madame Martine Peeters, Directrice de Recherche à l'UMI 233, pour m'avoir proposé un sujet si intéressant. Je lui suis reconnaissante pour sa patience, sa disponibilité, la confiance qu'elle m'a accordée ainsi que ses judicieux conseils lors de la rédaction de ce mémoire.

Madame Sabrina Locatelli, Chargée de Recherche à l'UMI 233, pour son encadrement et pour le partage de son expérience dans la rédaction de ce manuscrit. Je la remercie également pour la disponibilité et la réactivité dont elle a fait preuve.

Les docteurs Pascal Drakulovski, Meja Rabodonirina et Jean Menotti pour nous avoir fournis les témoignages positifs ainsi que pour leur expertise dans le domaine de la parasitologie.

Madame Anne Marcilhac, maître de conférence à l'EPHE, mon professeur référent, pour ses indications et ses remarques pertinentes concernant la rédaction de mon mémoire ainsi que Monsieur Philippe Pochart, professeur au CNAM, et Monsieur David Husson, enseignant en Biologie au CNAM, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Madame Isabelle Gely, directrice partenariats et réseaux au CNAM, pour sa gentillesse et pour m'avoir si bien guidée tout au long de mon parcours.

Ce mémoire est l'aboutissement de cinq années d'études par le CNAM. Je voudrais ainsi exprimer ma reconnaissance envers mes amis d'ici, d'ailleurs et de toujours ainsi qu'envers mes collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ces années. Un grand merci à Céline pour son soutien absolu, Nicole pour ses connaissances en phylogénie (entre autres), Coralie pour son efficacité et sa bonne humeur, Amandine, Fatima, Laetitia et Audrey pour les discussions scientifiques ou non, qui ont contribué à alimenter ma réflexion ! Sans oublier les rares hommes de l'équipe, Ahidjo qui a patiemment répondu à mes innombrables questions, Steve et Florian ! Et nos thésards de passage ! Je remercie sincèrement Marjorie et Lucie qui m'ont supporté et motivé tout au long de ces années. J'ai une pensée particulière pour Valérie que j'ai souvent sollicitée lors de mes révisions, de l'écriture de ce mémoire et celui de l'entrée à l'école d'ingénieur, ses relectures et avis critiques ont été d'une grande aide et surtout, elle a toujours cru en moi !

Enfin, je remercie ma famille et mon époux Bertrand, qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'étude ce qui m'a permis de surmonter les contraintes liées aux cours du soir et à la rédaction de ce mémoire.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	4
Liste des figures et tableaux	6
Liste des principales abréviations	8
Synthèse bibliographique	9
1. Les primates non-humains sont porteurs de pathogènes	10
1.1 Les primates non-humains	10
1.2 Les agents de zoonoses	10
2. Les SIV infectent naturellement les PNH africains	11
2.1 Les SIV présentent une grande diversité.....	11
2.2 Deux sous-espèces de chimpanzés sont naturellement infectées par le SIV.....	13
2.3 Une sous-espèce de gorilles est naturellement infectée par le SIV	14
3. Les SIV sont à l'origine des VIH.....	15
3.1 Le SIV _{smm} est à l'origine du VIH-2.....	15
3.2 Les SIV _{cpz} sont à l'origine du VIH-1 groupes M et N	17
3.3 Le SIV _{gor} est proche du VIH-1 groupes O et P.....	17
3.4 L'Homme a été contaminé par contact avec les PNH infectés	19
4. La pathogénicité des SIV.....	20
4.1 Le SIV est non pathogène chez son hôte naturel.....	20
4.2 Chez le chimpanzé : la fin d'un dogme.....	20
5. VIH/SIV et infections opportunistes	22
5.1 Les infections opportunistes font partie du stade SIDA chez l'Homme.....	22
5.2 Les cryptosporidies, parasites classant du stade SIDA.....	24
5.3 Les microsporidies, parasites entéropathogènes.....	24
5.4 Les parasites opportunistes chez les PNH.....	25
Objectifs	27
Matériel et méthodes	29
1. Méthode de collecte non-invasive de fèces chez les grands singes	30
2. Site d'étude et échantillons collectés	32

3. Confirmation de l'espèce et de la sous-espèce de l'hôte à partir d'échantillons fécaux.....	33
3.1 Extraction d'ADN.....	33
3.2 Amplification et séquençage de l'ADN ribosomal des mitochondries.....	33
3.3 Analyses phylogénétiques.....	34
4. Génotypage de l'hôte	34
5. Détection d'anticorps anti-SIV dans les fèces de chimpanzés et de gorilles.....	37
6. Détection des parasites dans les échantillons fécaux	38
6.1 Extraction de l'ADN parasitaire.....	38
6.2 Amplification de l'ADN des cryptosporidies.....	38
6.3 Amplification de l'ADN des microsporidies.....	39
6.4 Séquençage des produits amplifiés.....	40
6.5 Analyses phylogénétiques des parasites amplifiés	41
Résultats	42
1. Échantillons collectés.....	43
2. Infection à SIV chez les chimpanzés et gorilles sauvages	45
2.2 Présence d'anticorps anti-SIV	45
2.3 Détermination du nombre d'individus SIV positifs.....	47
3. Recherche de parasites dans les échantillons fécaux	49
3.1 Présence de cryptosporidies	49
3.2 Présence de microsporidies	50
3.3 Individus infectés par cryptosporidies et microsporidies.....	51
4. Diversité génétique des parasites.....	54
4.1 Diversité génétique des cryptosporidies amplifiées	54
4.2 Diversité génétique des microsporidies amplifiées	56
Discussion	61
Conclusion et Perspectives.....	67
Glossaire	70
Bibliographie	71

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Aire de répartition des sous-espèces de chimpanzés en Afrique.....	13
Figure 2 : Aire de répartition des sous-espèces de gorilles en Afrique.....	14
Figure 3 : Les SIV des mangabeys enfumés sont à l'origine du VIH-2.	16
Figure 4 : Les SIV des chimpanzés et gorilles sont proches des VIH-1.....	18
Figure 5 : Caractéristiques virales et cellulaires de l'infection par le VIH.....	23
Figure 6 : Collecte de fèces des grands singes sauvages.....	31
Figure 7 : Carte du Cameroun et de la région autour du village de Mambélé.	32
Figure 8 : Arbre phylogénétique des espèces.	44
Figure 9 : Réactions au test de sérologie INNO-LIA™ dans des échantillons fécaux de chimpanzés.....	46
Figure 10 : Arbre phylogénétique des cryptosporidies.	55
Figure 11 : Photo de gel montrant une double amplification.	57
Figure 12 : Alignement des deux séquences amplifiées d'un même échantillon.....	57
Figure 13 : Arbre phylogénétique des microsporidies.	58
Figure 14 : Arbre phylogénétique d'échantillons avec différentes quantités de matériel de départ.	60
Tableau 1 : Liste des espèces de PNH naturellement infectées par un SIV.....	12
Tableau 2 : 8 genres et 14 espèces de microsporidies infectent l'Homme	25
Tableau 3 : Liste des amorces de génotypage par locus.	36
Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour amplifier <i>Cryptosporidium</i> spp.	38
Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour amplifier les genres <i>Encephalitozoon</i> et <i>Enterocytozoon</i>	39
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des espèces des échantillons fécaux.....	43
Tableau 7 : Présence d'anticorps anti-SIV dans les fèces de grands singes.	45
Tableau 8 : Identification des individus SIV positifs.....	48
Tableau 9 : Nombre d'échantillons de grands singes infectés par des cryptosporidies en fonction du statut sérologique.....	49
Tableau 10 : Nombre d'échantillons de grands singes infectés par des microsporidies en fonction du statut sérologique.....	50

Tableau 11 : Nombre de chimpanzés infectés par des cryptosporidies et des microsporidies en fonction du statut sérologique.....	51
Tableau 12 : Présence de parasites par individu SIV positif.....	52
Tableau 13 : Nombre de grands singes infectés par cryptosporidies et microsporidies en fonction du statut sérologique.....	53

Liste des principales abréviations

1

aLRT : Approximate Likelihood ratio

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BSA : Bovine serum albumin

CD4 : Cluster of differentiation 4

CHO : Cellules d'épithélium ovarien de hamster

CROI : Conference on retroviruses and opportunistic infections

ddNTP : Di-désoxyribonucléotide triphosphate

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

G.b.beringei : *Gorilla beringei beringei*

G.b.graueri : *Gorilla beringei.graueri*

G.g.diehli : *Gorilla gorilla diehli*

G.g.gorilla : *Gorilla gorilla.gorilla*

GPS : Global Positioning System

GTR : General Time Reversible

ITS : Internal Transcribed Spacer

LIA : Line Immunosorbent Assay

P.t.elliotti : *Pan troglodytes elliotti*

P.t.schweinfurthii : *Pan troglodytes schweinfurthii*

P.t.troglodyte : *Pan troglodytes troglodytes*

P.t.verus : *Pan troglodytes verus*

Pb : Paire de bases

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PNH : Primate non-humain

RCA : République Centrafricaine

RDC : République Démocratique du Congo

RPM : Revolution per minute

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SIV : Simian immunodeficiency virus

spp : Espèces

TI : Transcriptase inverse

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

¹ En noir : en français. En gris : en anglais.

Synthèse bibliographique

1. Les primates non-humains sont porteurs de pathogènes

1.1 Les primates non-humains

Le terme primate non-humain (PNH) regroupe les prosimiens, les singes du nouveau monde et les singes de l'ancien monde, tous appelés communément « petits » singes, ainsi que les grands singes. Parmi les grands singes se trouvent les bonobos, les chimpanzés, les gorilles présents en Afrique ainsi que les orangs-outans vivants en Indonésie.

Les grands singes sont tous en voie de disparition (<http://primate-sg.org/diversity>). Les différentes causes sont le défrichement des forêts par l'exploitation forestière ou l'agriculture, la chasse pour la consommation de viande de brousse*², le commerce des animaux de compagnie ainsi que les maladies infectieuses qui peuvent décimer des populations entières de grands singes.

1.2 Les agents de zoonoses

La proximité génétique entre les PNH et l'Homme ainsi que la pression des populations humaines sur les habitats des grands singes tend à faciliter les échanges d'agents infectieux entre ces deux groupes (Gillespie et al. 2008). Les maladies causées par ces agents infectieux sont appelées des zoonoses. Les pathogènes transmis peuvent être des bactéries, des virus ou des parasites.

L'introduction d'un nouvel agent pathogène humain chez les populations de PNH peut avoir des conséquences désastreuses chez ces populations, comme des maladies respiratoires ou la transmission de bactéries gastro-intestinales (Goldberg et al. 2007; Köndgen et al. 2008; Rwego et al. 2008). À l'inverse, les différents agents pathogènes transmis du singe à l'Homme peuvent occasionner de graves problèmes de santé chez ce dernier, comme le virus Ebola, entraînant des fièvres hémorragiques (Leroy et al. 2004). Ainsi, le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'Homme est responsable de millions de morts chaque année, et a une origine zoonotique (<http://www.unaids.org/fr/>) (Hahn et al. 2000). L'agent étiologique du SIDA est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et provient de transmissions, du singe à l'homme, du virus de l'immunodéficience simienne (SIV).

² Voir glossaire en fin de mémoire.

2. Les SIV infectent naturellement les PNH africains

Comme le VIH, le SIV est un lentivirus appartenant à la famille des rétrovirus. Les lentivirus sont caractérisés par une évolution lente avant le développement de la maladie. Les rétrovirus se distinguent par la présence d'une transcriptase inverse, une enzyme virale responsable de la transcription inverse de leur génome d'ARN en ADN. Sur le plan évolutif, les rétrovirus présentent une grande variabilité génétique du fait notamment des fréquentes erreurs commises lors de la transcription inverse et d'une dynamique de réplication virale très élevée.

2.1 Les SIV présentent une grande diversité

Actuellement, parmi les 79 espèces de PNH qui sont répertoriées en Afrique (<http://primate-sg.org/diversity>), 45 espèces ont été testées et trouvées porteuses de SIV (Locatelli & Peeters 2012). Les infections SIV ont été identifiées par des tests sérologiques et pour l'instant, les virus ont été caractérisés au niveau moléculaire pour 80% des 45 espèces testées. Les virus caractérisés sont désignés par le sigle SIV suivi de trois lettres codant pour le nom commun anglais de l'espèce infectée (par exemple : SIVrcm pour red capped mangabey, le mangabey à collier blanc) (Tableau 1). D'une façon générale, une grande diversité génétique est observée au sein des SIV, mais habituellement chaque espèce de singe est infectée par un virus qui lui est spécifique. L'évolution des différentes lignées de SIV est très complexe, il y a de nombreux exemples de co-évolution entre ces virus et leur hôte, mais également des exemples de recombinaisons entre des SIV relativement distants, preuve de transmissions inter-espèces de virus entre les différents PNH. Ainsi, le virus du chimpanzé provient d'une recombinaison entre deux virus, le SIVgsn du singe hocheur et le SIVrcm du mangabey à collier blanc (Bailes et al. 2003; Cournaud et al. 2003). Le mandrill, quant à lui, est infecté par deux virus différents, SIVmnd-1 et SIVmnd-2, qui résultent de recombinaison avec des virus d'autres espèces de petits singes (Souquière et al. 2001).

Jusqu'à maintenant, des SIV ont uniquement été mis en évidence chez les singes et grands singes d'Afrique. Les PNH d'Asie ou d'Amérique du Sud ne semblent pas être naturellement infectés par un SIV, mais encore trop peu d'études ont été réalisées. Il n'a pas été trouvé non plus de SIV chez le bonobo (*Pan paniscus*), un grand singe endémique à la République Démocratique du Congo (RDC), (Van Dooren et al. 2002) (Ahuka-Mundeke et al., Poster #452, CROI 2011).

Tableau 1 : Liste des espèces de PNH naturellement infectées par un SIV.

Genre	Espèce sous-espèce	Nom commun français	Virus
<i>Pan</i>	<i>troglodytes troglodytes</i>	Chimpanzés d'Afrique centrale	SIVcpzPt
	<i>troglodytes schweinfurthii</i>	Chimpanzés d'Afrique de l'est	SIVcpzPts
<i>Gorilla</i>	<i>gorilla gorilla</i>	Gorille de l'ouest	SIVgor
<i>Colobus</i>	<i>guereza</i>	Colobe guéréza	SIVcol
	<i>satanas satanus</i>	Colobe noir de Bioko	SIVblc-bioko
<i>Piliocolobus</i>	<i>badius badius</i>	Colobe bai d'Afrique occidentale	SIVwrcpbb
	<i>badius temminckii</i>	Colobe bai de Temminck	SIVwrcpbt
	<i>tholloni</i>	Colobe bai de Thollon	SIVtrc
	<i>rufomitratu tephrosceles</i>	Colobe rouge d'Ouganda	SIVkrc
<i>Procolobus</i>	<i>verus</i>	Colobe vert	SIVolc
<i>Lophocebus</i>	<i>albigena</i>	Mangabé à joues grise/blanches	
	<i>aterrimus</i>	Mangabé huppé	SIVbkm
<i>Papio</i>	<i>anubis</i>	Babouin de Guinée	
	<i>cynocephalus</i>	Babouin jaune	SIVagm-Ver
	<i>ursinus</i>	Babouin chacma	SIVagm-Ver
<i>Cercocebus</i>	<i>atys</i>	Mangabey enfumé	SIVsmm
	<i>agilis</i>	Mangabey agile	SIVagi
	<i>torquatus</i>	Mangabey à collier blanc	SIVrcm
<i>Mandrillus</i>	<i>sphinx</i>	Mandrill	SIVmnd-1, mnd-2
	<i>leucophaeus</i>	Drill	SIVdrl
	<i>leucophaeus poensis</i>	Drill de Bioko	SIVdrl-bioko
<i>Allenopithecus</i>	<i>nigroviridis</i>	Singe des marais	
<i>Miopithecus</i>	<i>talapoin</i>	Talapoin du sud	SIVtal
	<i>oguensis</i>	Talapoin du nord	SIVtal
<i>Erythrocebus</i>	<i>patas</i>	Singe rouge/patas	SIVagm-sab
<i>Chlorocebus</i>	<i>sabaus</i>	Singe sabeus	SIVagm-Sab
	<i>aethiops</i>	Grivet d'Ethiopie	SIVagm-Gri
	<i>tantalus</i>	Cercopithèque tantale	SIVagm-Tan
	<i>pygerythrus</i>	Vervet	SIVagm-Ver
<i>Cercopithecus</i>	<i>diana</i>	Cercopithèque diane	
	<i>nictitans</i>	Singe hocheur	SIVgsn
	<i>albugularis</i>	Cercopithèque à diadème	SIVsyk
	<i>mitis</i>	Singe bleu	SIVblu
	<i>mona</i>	Cercopithèque mona	SIVmon
	<i>pogonias</i>	Cercopithèque pogonias	
	<i>campbelli</i>	Singe des palétuviers	
	<i>denti</i>	Singe mona de Dent	SIVden
	<i>wolfi</i>	Cercopithèque de Wolf	SIVwol
	<i>cephus</i>	Moustac	SIVmus
	<i>erythrotis</i>	Moustac à oreilles rousses	SIVery
	<i>erythrotis erythrotis</i>	Moustac à oreilles rousses de Bioko	SIVreg-bioko
	<i>ascanius</i>	Cercopithèque ascagne	SIVasc
	<i>solatus</i>	Cercopithèque à queue de soleil	SIVsun
	<i>preussi</i>	Cercopithèque de Preuss	SIVpre
	<i>preussi insularis</i>	Cercopithèque de Preuss de Bioko	SIVprg-bioko
<i>neglectus</i>	Cercopithèque de Brazza	SIVdeb	
<i>hamlyni</i>	Cercopithèque de Hamlyn		
<i>lhoest</i>	Cercopithèque de l'Hoest	SIVlho	

Pour chaque espèce de PNH est noté le genre, l'espèce et la sous-espèce, ainsi que le nom commun français. Les espèces dont seule une sérologie positive aux SIV a été mise en évidence sont présentées en gris.

2.2 Deux sous-espèces de chimpanzés sont naturellement infectées par le SIV

Les chimpanzés sont classés en 4 sous-espèces (Gagneux et al. 1999). Ils vivent dans des zones géographiques distinctes, séparées par des barrières naturelles comme les grands fleuves. Les *Pan troglodytes verus* (*Ptv*) se situent en Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Ghana, Guinée, Liberia, Mali, Sénégal et Sierra Léone), les *Pan troglodytes ellioti* (*Pte*) se trouvent au Cameroun (au nord du fleuve Sanaga) et au Nigéria, les *Pan troglodytes troglodytes* (*Ptt*) sont en Afrique centrale (sud du fleuve Sanaga du Cameroun, Guinée-équatoriale, Gabon, Congo, RCA, RDC) et les *Pan troglodytes schweinfurthii* (*Pts*) en Afrique de l'Est (Burundi, RCA, RDC, Rwanda, Soudan, Tanzanie et Uganda) (Figure 1).

Seules 2 sous-espèces de chimpanzé sont naturellement infectées par des SIVcpz, les *P.t.troglodytes* par le SIVcpzPtt (Gao et al. 1999) et les *P.t.schweinfurthii* par le SIVcpzPts (Santiago et al. 2003). À ce jour, aucune infection naturelle n'a été mise en évidence chez les sous-espèces de chimpanzés *P.t.verus* et *P.t.ellioti* (Prince et al. 2002; Switzer et al. 2005; Van Heuverswyn et al. 2007).

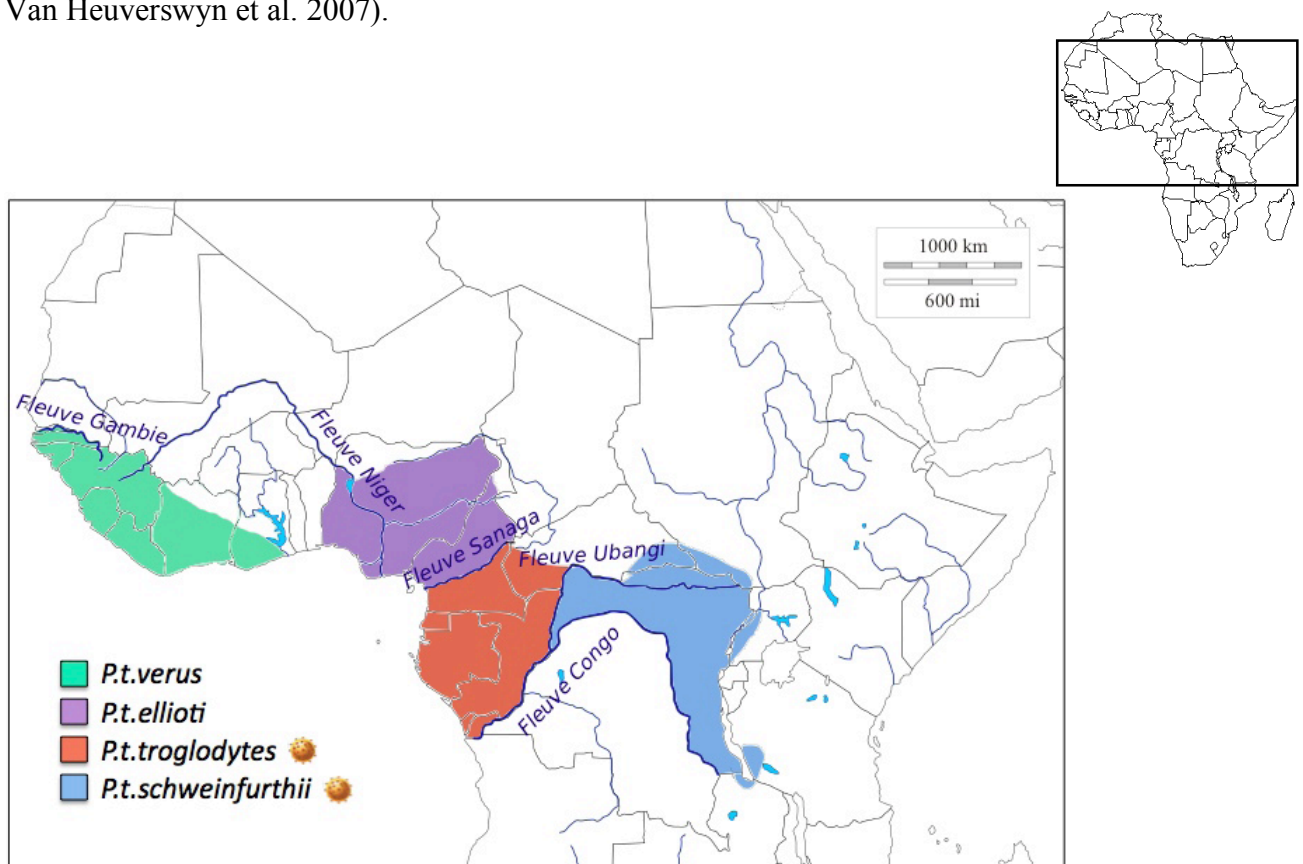


Figure 1 : Aire de répartition des sous-espèces de chimpanzés en Afrique.

La légende montre une couleur par sous-espèce de chimpanzés. Les virus dans la légende indiquent les sous-espèces infectées par le SIV. Les principaux fleuves délimitants les sous-espèces sont nommés sur la carte. Carte réalisée par Lucie Etienne.

2.3 Une sous-espèce de gorilles est naturellement infectée par le SIV

Les gorilles sont classés en 2 espèces, chacune divisée en 2 sous-espèces qui ont des localisations différentes (Groves 2001). À l'Ouest de l'Afrique subsaharienne se situent les *Gorilla gorilla diehli* (*Ggd*), au Nigéria et au Cameroun, et les *Gorilla gorilla gorilla* (*Ggg*) répartis entre Cameroun, Guinée-Équatoriale, Gabon, Congo et RCA. À l'Est se trouvent les *Gorilla beringei graueri* (*Gbd*) en RDC et les *Gorilla beringei beringei* (*Gbb*) en RDC, Ouganda et Rwanda (Figure 2).

Actuellement, seuls les gorilles de la sous-espèce *G.g.gorilla* sont naturellement infectés par un virus, le SIVgor (Van Heuverswyn et al. 2006). Cependant, aucune étude n'a été menée sur les gorilles des sous-espèces *G.b.diehli* et *G.b.beringei*, et seul un nombre limité de gorilles *G.b.graueri* a été testé (Neel et al. 2010).

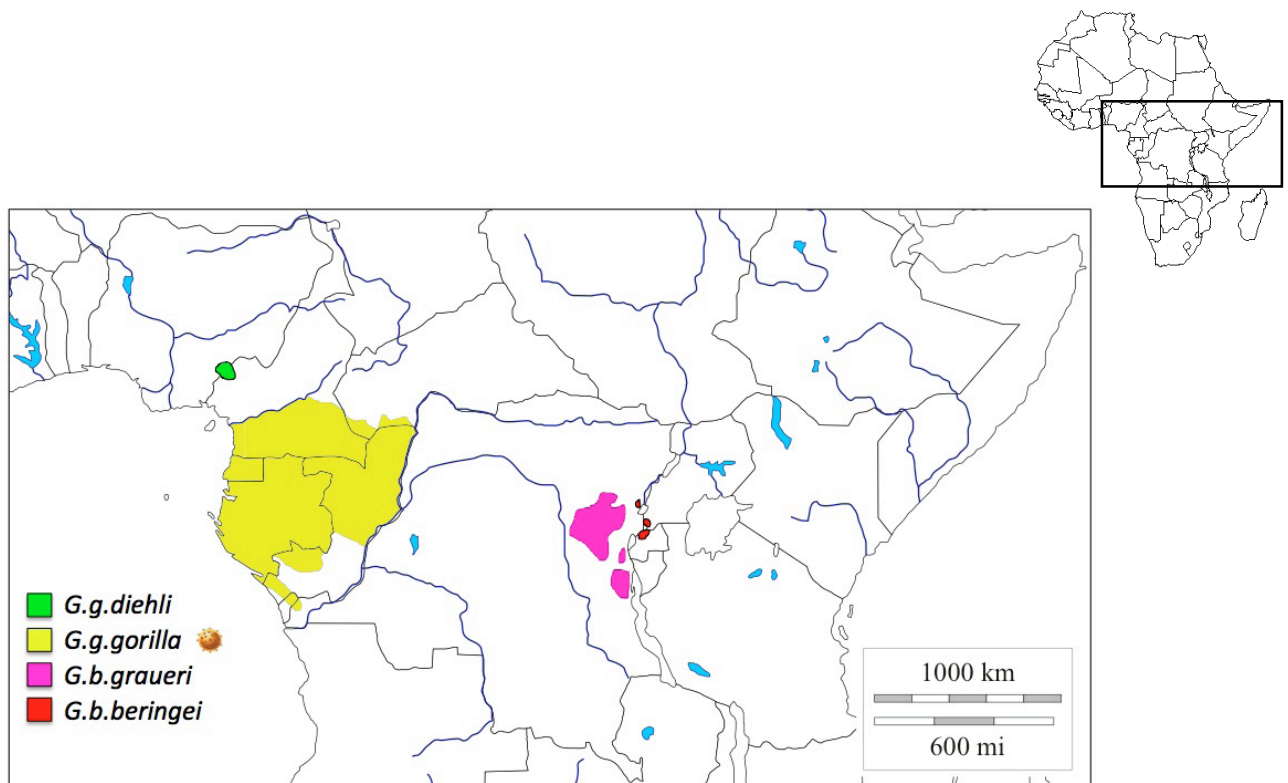


Figure 2 : Aire de répartition des sous-espèces de gorilles en Afrique.

La légende montre une couleur par sous-espèce de gorilles. Le virus dans la légende indique la sous-espèce infectée par le SIV. Carte réalisée par Lucie Etienne.

3. Les SIV sont à l'origine des VIH

Les SIV ont franchi la barrière d'espèce à plusieurs occasions pour devenir le VIH-1 et le VIH-2 chez l'Homme.

Le VIH-1 est composé de quatre groupes. Le groupe M, pour « Major », découvert en 1983 (Barré-Sinoussi et al. 1983) est responsable de la pandémie actuelle de SIDA. Le groupe O pour « Outlier » découvert en 1990 (De Leys et al. 1990) est endémique au Cameroun et aux pays limitrophes, il représente environ 1% des infections à VIH-1 (Vergne et al. 2003). Le groupe N pour « Non-M Non-O » identifié en 1998 (Simon et al. 1998) est présent chez seulement quelques individus au Cameroun (Vallari et al. 2010). Enfin, le groupe P a été identifié en 2009 chez une patiente Camerounaise (Plantier et al. 2009), et depuis, seulement chez une autre personne d'origine Camerounaise (Vallari et al. 2011).

Le VIH-2 est composé de huit groupes de A à H. Les groupes A et B sont responsables de l'épidémie, limitée à l'Afrique de l'Ouest, tandis que les groupes C à H n'infectent que peu d'individus (Ishikawa et al. 2001; Peeters et al. 2003; Sharp & Hahn 2010). C'est l'origine simienne du VIH-2 qui a été résolue en premier.

3.1 Le SIV_{smm} est à l'origine du VIH-2

En 1989, le SIV_{smm} a été identifié chez un petit singe, le mangabey enfumé (Hirsch et al. 1989). Des analyses phylogénétiques ont montré qu'il était très proche du VIH-2, découvert en 1986 (Clavel et al. 1986). De plus, une similarité dans l'organisation de leur génome a été démontrée avec un gène accessoire commun, *vpx*. Enfin, l'épidémie à VIH-2 est restreinte à l'Afrique de l'Ouest et coïncide avec l'aire de répartition des mangabeys enfumés. Ces observations ont prouvé que le virus SIV_{smm}, infectant le mangabey enfumé, était à l'origine du VIH-2 chez l'Homme.

Les analyses phylogénétiques ont montré que les huit groupes du VIH-2 correspondaient à huit transmissions inter-espèces indépendantes du mangabey à l'Homme (Figure 3).

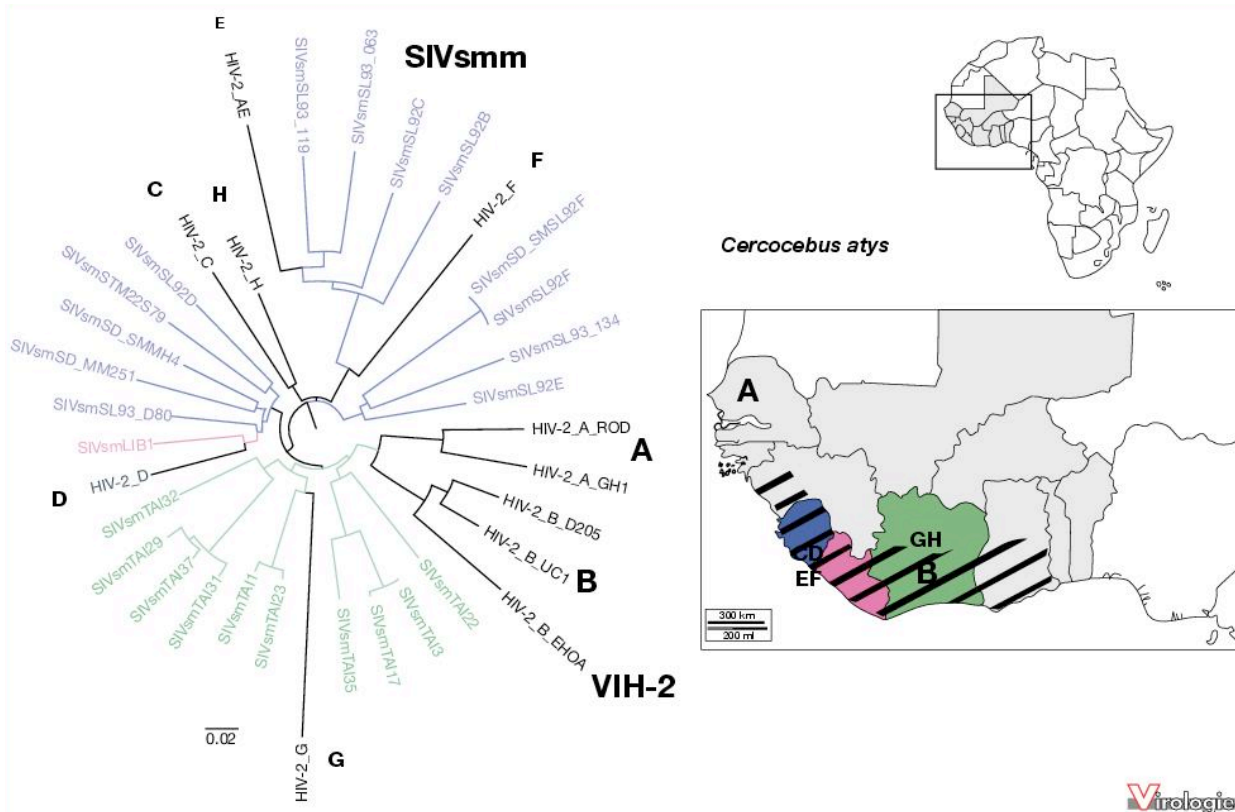


Figure 3 : Les SIV des mangabeys enfumés sont à l'origine du VIH-2.

Arbre phylogénétique réalisé par la méthode des plus proches voisins à partir d'un alignement de séquences dans le gène *env* de 741 pb des différents groupes du VIH-2 (en noir) et de SIVsmm (la couleur représente le pays d'origine). La barre d'échelle représente 0,02 substitution par site. Sur la carte géographique, la distribution du VIH-2 est colorée en gris avec les lettres correspondant aux différents groupes. L'habitat des mangabeys est indiqué en hachuré. Les codes couleurs pour la carte et l'arbre phylogénétique sont : bleu pour la Sierra Leone, rose pour le Libéria et vert pour la Côte-d'Ivoire. (Etienne & Peeters 2010)

3.2 Les SIVcpz sont à l'origine du VIH-1 groupes M et N

L'hypothèse selon laquelle le SIVcpz était à l'origine du VIH-1 a été émise en 1989 après la caractérisation d'un virus proche du VIH-1 chez deux chimpanzés *P.t.troglodytes* captifs du Gabon (Peeters et al. 1989). L'identification d'un troisième virus chez un chimpanzé *P.t.schweinfurthii*, également captif, a montré une divergence par rapport aux deux premiers virus caractérisés (Peeters et al. 1992). Cette diversité a pu s'expliquer en prenant en compte les différentes sous-espèces de chimpanzés. Il a ainsi été établi qu'à l'intérieur de la lignée SIVcpz sont présentes deux autres lignées, SIVcpzPtt et SIVcpzPts, spécifiques à la sous-espèce de leur hôte (Gao et al. 1999). La confirmation que le SIVcpz était bien l'ancêtre du VIH-1 ne s'est imposée qu'en 2006 suite à de nombreuses études sur des chimpanzés sauvages par une méthode de collecte non-invasive de leurs fèces (Santiago et al. 2002, 2003; Keele et al. 2006).

Les analyses phylogénétiques ont indiqué que tous les SIVcpzPts formaient un groupe à part des VIH-1 chez l'Homme. En revanche, les groupes M et N du VIH-1 se branchent à l'intérieur de la lignée SIVcpzPtt. Ainsi, l'ancêtre du groupe M appartient à la lignée qui provient de chimpanzés vivants dans le sud-est du Cameroun et le groupe N provient d'une autre lignée infectant les animaux du centre du Cameroun (Keele et al. 2006; Van Heuverswyn et al. 2007) (Figure 4).

3.3 Le SIVgor est proche du VIH-1 groupes O et P

Le virus SIVgor a été identifié en 2006 chez les gorilles sauvages du Cameroun, de la sous-espèce *G.g.gorilla* (Van Heuverswyn et al. 2006). Les analyses phylogénétiques ont montré que ce virus est proche du VIH-1 groupe O mais ne semble pas en dériver directement (Takehisa et al. 2009). Cependant, le SIVgor est plus proche du VIH-1 groupe P, récemment découvert. Ainsi, le SIVgor est probablement l'ancêtre de ce groupe P (Figure 4).

Les analyses phylogénétiques indiquent également que les SIVgor, infectant les gorilles, forment un groupe monophylétique* à l'intérieur de la lignée des SIVcpz suggérant que les gorilles ont été contaminés par les chimpanzés (Van Heuverswyn et al. 2006; Takehisa et al. 2009).

Ainsi, le VIH-1 correspond à quatre transmissions inter-espèces indépendantes des grands singes à l'Homme.

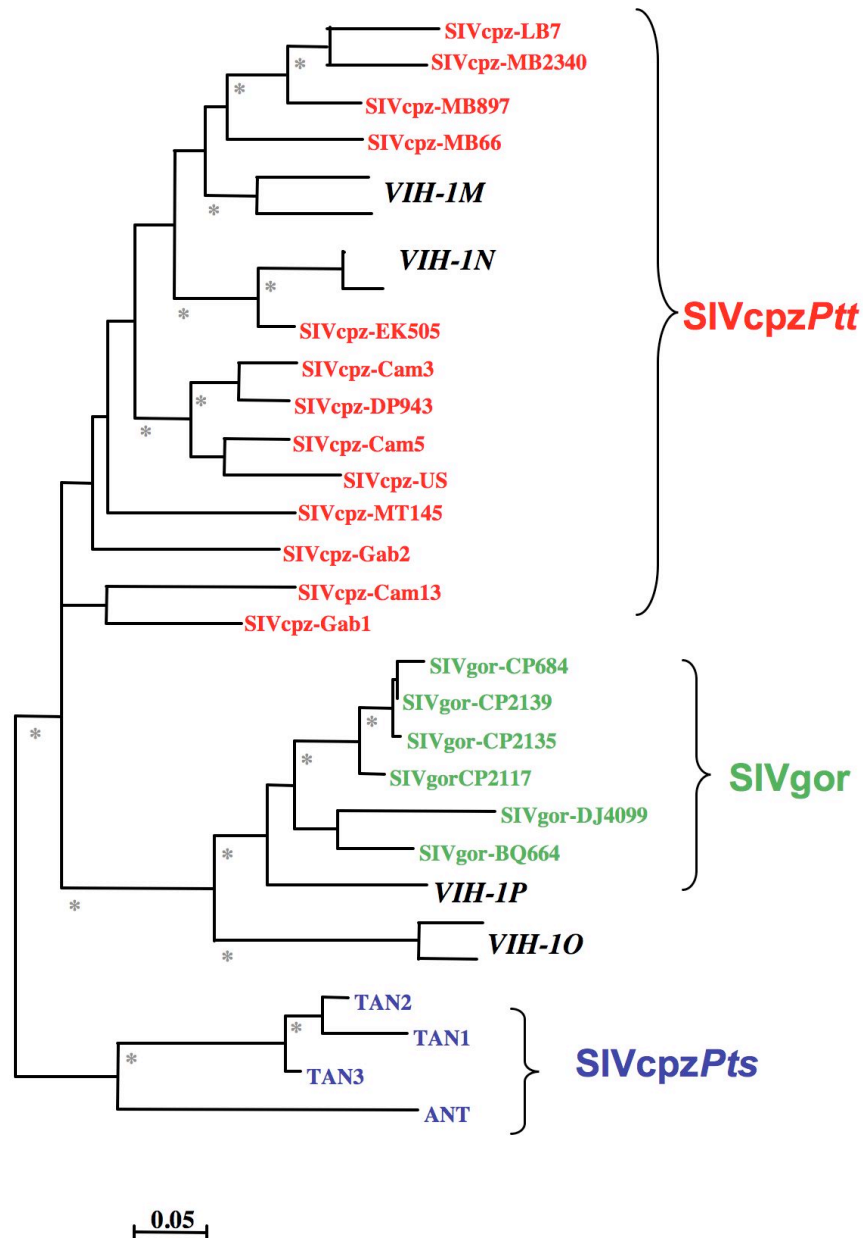


Figure 4 : Les SIV des chimpanzés et gorilles sont proches des VIH-1.

Arbre phylogénétique montrant les relations d'évolution entre les différentes lignées de SIV et les quatre groupes du VIH-1. Les SIVcpzPtt sont en rouge, les SIVcpzPts en bleu et les SIVgor en vert. Analyses phylogénétiques par la méthode bayésienne* sur un alignement de 510 pb dans le gène *pol*. Les étoiles représentent le pourcentage de probabilités postérieures supérieures à 95%. La barre d'échelle représente 0,05 substitution par site.

3.4 L'Homme a été contaminé par contact avec les PNH infectés

Les transmissions inter-espèces sont dues à l'exposition de l'Homme aux tissus et fluides biologiques de PNH infectés. Des risques d'infections sont possibles lors de morsures par des singes captifs, mais aussi lors de contacts avec du sang et des tissus contaminés qui pourraient avoir lieu lors de la chasse, du dépeçage et de la préparation de la viande de brousse. Cette pratique est courante en Afrique de l'Ouest et centrale, étant une source primaire de protéines mais aussi un commerce qui ne cesse de s'intensifier. En 2002, les recherches montrent clairement que l'homme est exposé à une quantité et une diversité importante de SIV lors de la chasse et de la consommation de la viande de brousse (Peeters et al. 2002). Un des facteurs augmentant le risque de transmissions inter-espèces est la prévalence et la fréquence d'exposition. Une étude de 2009 réalisée sur la viande de brousse au Cameroun montrait des prévalences hétérogènes suivant les sites et les espèces allant de 0% à 50%, les plus faibles taux étant observés chez les espèces les plus chassées (Aghokeng et al. 2010). Cependant, au centre de la RDC, la prévalence du SIV chez les petits singes a été estimée à environ 20% et les plus forts taux d'infection ont été trouvés chez les espèces les plus souvent chassées (Ahuka-Mundeke et al. 2011).

Bien que les grands singes soient des espèces protégées, la chasse pour la consommation de viande de brousse continue et s'est même intensifiée suite au développement des concessions forestières et minières qui amènent un plus grand nombre de personnes à devoir se nourrir. Les grands singes sont également chassés pour la pratique de rites et de médecine traditionnelle (Alves et al. 2010). La prévalence du SIVcpzPtt est de 5,9% en moyenne, variant de 0 à 32% selon les régions géographiques (Keele et al. 2006; Van Heuverswyn et al. 2007). Les taux de prévalence sont les plus élevés dans les sites où les ancêtres du VIH-1 groupes M et N circulent. La prévalence du SIVcpzPts varie aussi de 0 à 40% dans l'ouest de la Tanzanie (Rudicell et al. 2011) (Li et al., Poster #440, CROI 2010), cependant ces virus ne sont pas transmis à l'Homme peut-être parce que les *P.t.schweinfurthii* vivent dans des zones où la chasse pour la viande de brousse est moins courante. Les prévalences du SIVgor sont beaucoup plus faibles que celles observées chez les chimpanzés. Elles sont de 1,6% en moyenne et vont de 0 à 4,6% selon les sites de collectes (Neel et al. 2010).

4. La pathogénicité des SIV

4.1 Le SIV est non pathogène chez son hôte naturel

Jusqu'à très récemment, les scientifiques croyaient que les SIV n'induisaient pas d'immunodéficience chez leurs hôtes naturels, en se basant sur le principe que le virus et son hôte avaient co-évolué depuis des milliers d'années (Silvestri et al. 2007). Cette absence de pathogénicité a été étudiée en détail chez les mangabeys enfumés et les singes verts dont l'espérance de vie et l'état immunitaire ne sont pas affectés lors d'infections SIV malgré une virémie* très élevée (Silvestri et al. 2003). Toutefois, des cas d'immunodéficience ont pu être mis en évidence chez certains singes lorsque l'individu était infecté depuis très longtemps et souvent à un âge qui n'est pas atteint en milieu sauvage, mais ces cas restent des exceptions (Ling et al. 2004).

D'autres cas d'immunodéficience qui ont pu être mis en évidence sont le résultat de transmissions inter-espèces. Ainsi, des études ont montré que le SIVsmm, infectant naturellement les mangabeys enfumés, était pathogène chez d'autres espèces lors d'infections expérimentales par du SIVsmm chez le singe Macaque d'Asie mais aussi chez le mangabey huppé (Apetrei et al. 2004, 2005).

Cependant, pour la majorité des espèces naturellement infectées, les données sur la pathogénicité ne sont pas disponibles. En effet, il n'y a pas d'animal suivi en captivité et il est difficile de réaliser ces études en milieu sauvage. De plus, le virus est un lentivirus, connu pour provoquer des maladies à évolution lente, il faut donc pouvoir suivre des animaux sur de longues périodes.

4.2 Chez le chimpanzé : la fin d'un dogme

Ce paradigme généralisant la non-pathogénicité des SIV chez leurs hôtes naturels vient d'être remis en cause par une étude chez les chimpanzés sauvages de la sous-espèce *P.t.schweinfurthii* (Keele et al. 2009). En effet, l'infection par le virus SIVcpzPts aurait un impact négatif sur la santé des animaux infectés ainsi que sur leur reproduction et leur espérance de vie. Cette étude portait sur 94 individus du Parc National de Gombé en Tanzanie appartenant à une communauté habituée à l'Homme depuis quarante ans et dont le statut

sérologique a été testé régulièrement pendant neuf ans sur des échantillons de fèces. Les résultats montrent, de manière significative, que les individus infectés par le SIV meurent plus jeunes que les individus non infectés. Les femelles séropositives semblent trois fois moins fécondes que les femelles séronégatives. Enfin, des analyses post-mortem effectuées sur cinq chimpanzés (trois infectés et deux non infectés) ont montré une diminution des lymphocytes CD4+ chez les trois chimpanzés infectés, symptôme caractéristique d'une immunodéficience.

Une autre étude récente sur un chimpanzé de la sous-espèce *P.t.troglodytes*, infecté naturellement par le SIVcpzPtt, suggère une progression de maladie similaire au SIDA (Etienne et al. 2011). En effet, ce chimpanzé mâle a été confisqué au Cameroun en 2003, à l'âge d'un an et demi. Durant sa période de quarantaine, il a été dépisté SIV positif par un test sérologique. Le suivi biologique de l'animal a été réalisé pendant 7 ans et a montré divers symptômes confirmant une immunodéficience, comme une baisse des lymphocytes T CD4, une thrombocytopenie* sévère ainsi que de multiples infections bactériennes et parasitaires, plus fréquentes que chez des chimpanzés séronégatifs.

Ces deux études ont démontré que les SIVcpz peuvent être pathogène pour leur hôte naturel. Comme les gorilles semblent avoir été contaminés par les chimpanzés, il est possible que le SIVgor soit également pathogène pour son hôte.

5. VIH/SIV et infections opportunistes

5.1 Les infections opportunistes font partie du stade SIDA chez l'Homme

Le VIH cause une maladie lente et dégénérative chez l'Homme évoluant en trois phases : une infection aiguë, une période de latence plus ou moins longue, asymptomatique, enfin une progression de la maladie vers le stade SIDA (Figure 5).

La première phase de cette maladie est la primo-infection. Elle survient 2 à 6 semaines après la contamination. Lors de cette phase, la réplication virale est intense et la perte des lymphocytes T CD4 est importante. Cette phase prend fin au bout de quelques semaines, lorsque le système immunitaire parvient en partie à contrôler l'infection.

Il s'installe ensuite une phase d'infection chronique caractérisée par l'absence de symptôme. Les lymphocytes T CD8 vont se multiplier et entraîner une diminution de la virémie plasmatique. Les anticorps anti-VIH sont produits en grande quantité et resteront à un niveau élevé pendant cette phase de latence. La durée de cette phase est variable d'un individu à l'autre, pouvant aller de quelques mois à plusieurs dizaines d'années, avec une moyenne entre 7 et 10 ans sans traitement. L'émergence de virus mutants, qui échappent à la réponse immunitaire, et la destruction graduelle des lymphocytes T CD4 va conduire peu à peu le patient au stade SIDA.

Le stade SIDA regroupe alors un ensemble de maladies opportunistes infectieuses et de tumeurs, entraînant des problèmes pulmonaires, digestifs, neurologiques, dermatologiques et oculaires.

Parmi les atteintes digestives, la diarrhée est un symptôme fréquent et le plus souvent d'origine parasitaire. En effet, le tube digestif est l'organe le plus riche en cellules immunocompétentes de l'organisme et donc une cible privilégiée au cours de l'infection à VIH (Girard et al. 2011).

Les principaux agents infectieux digestifs chez les malades au stade SIDA sont les cryptosporidies, avec 20% de prévalence en moyenne, et les microsporidies dont les prévalences varient de 2 à 30% suivant l'espèce du parasite (Girard et al. 2011).

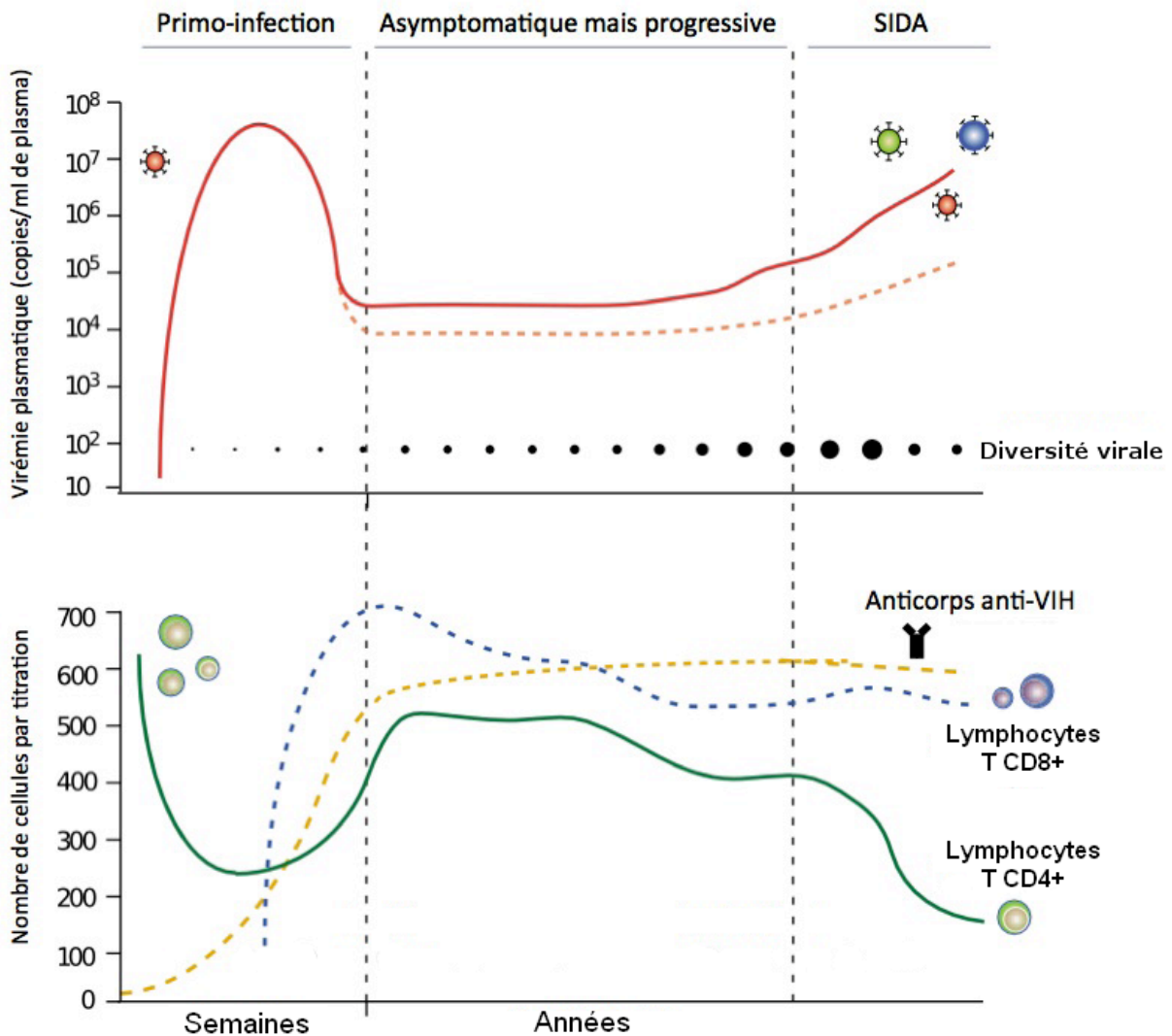


Figure 5 : Caractéristiques virales et cellulaires de l'infection par le VIH.

La primo infection se caractérise par une virémie élevée (courbe rouge), l'absence d'anticorps anti-VIH (courbe en pointillés jaunes) et une diminution des lymphocytes T CD4 (courbe verte). Pendant la deuxième phase, asymptomatique, les lymphocytes T CD8 (courbe en pointillés bleus) se multiplient et la virémie retombe à un niveau variable selon les individus (courbe rouge pleine ou en pointillés). L'évolution vers le stade SIDA survient lorsque la diversité génétique du virus augmente (points noirs) et que le taux de lymphocytes T CD4 retombe (courbe verte). Adaptée de (Simon et al. 2006).

5.2 Les cryptosporidies, parasites classant du stade SIDA

Les cryptosporidies, responsables des cryptosporidioses, sont des protozoaires intracellulaires obligatoires appartenant au phylum des *Apicomplexa*. Ces parasites produisent des oocystes* qui sont éliminés avec les selles des hôtes infectés et sont immédiatement contaminants. Les oocystes sont fréquemment véhiculés par les eaux où ils gardent leur pouvoir infectieux jusqu'à deux mois (Fayer 2004). Les cryptosporidies parasitent une grande partie du règne animal (poissons, reptiles, oiseaux et mammifères). À l'heure actuelle, il existe 19 espèces confirmées par des données morphologiques, biologiques et moléculaires. Les autres espèces, par manque d'analyses, sont recensées sous le terme de génotype, suivi du nom de l'hôte chez qui le parasite a été découvert (par exemple *Cryptosporidium* génotype du cheval) (Fayer 2010). Il existe des hôtes de prédilection pour chaque espèce du genre *Cryptosporidium*, mais la spécificité n'est pas stricte (Xiao & Fayer 2008).

L'infection à cryptosporidies chez les patients VIH positifs est chronique et peut engager le pronostic vital. Le lien avec le SIDA est si fort que la cryptosporidiose est devenue l'un des critères définissant du stade SIDA (CDC 1993). Les espèces les plus fréquemment rencontrées chez le patient sidéen sont *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis* (Fayer et al. 2000).

5.3 Les microsporidies, parasites entéropathogènes

Les microsporidies sont des eucaryotes, parasites intracellulaires obligatoires qui appartiennent au règne des champignons. La forme de résistance et de dissémination dans l'environnement est la spore, éliminée par voie fécale. Les microsporidies appartiennent à un phylum comprenant environ 1200 espèces connues et sont capables de parasiter pratiquement tout le règne animal (insectes, poissons, mammifères) ainsi que l'environnement (piscines, rivières, eaux usées) (Didier 2005; Mathis et al. 2005). À ce jour, 14 espèces sont connues pour infecter les mammifères dont l'Homme (Didier & Weiss 2006) (Tableau 2).

Les microsporidies les plus couramment retrouvées chez les personnes positives au VIH sont *Enterocytozoon bieneusi* puis, *Encephalitozoon intestinalis* (Girard et al. 2011) et moins fréquemment *Encephalitozoon cuniculi* et *hellem* (Sokolova et al. 2011).

Les microsporidies ont été identifiées en particulier chez les malades du SIDA mais aussi chez les enfants ou les personnes âgées ou chez des personnes immunocompétentes comme les voyageurs chez qui la maladie est auto résolutive (Sobottka et al. 1995; Raynaud et al. 1998).

Tableau 2 : 8 genres et 14 espèces de microsporidies infectent l'Homme

Genre	Espèce
<i>Anncaliia</i>	<i>algerae</i>
	<i>connori</i>
	<i>vesicularum</i>
<i>Encephalitozoon</i>	<i>cuniculi</i>
	<i>hellem</i>
	<i>intestinalis</i>
<i>Enterocytozoon</i>	<i>bieneusi</i>
<i>Microsporidium</i>	<i>africanum</i>
	<i>ceylonensis</i>
<i>Nosema</i>	<i>ocularum</i>
<i>Pleitosphora</i>	<i>ronneafiei</i>
<i>Trachipleitosphora</i>	<i>anthropoptera</i>
	<i>hominis</i>
<i>Vittaforma</i>	<i>corneae</i>

En vert, 4 espèces de microsporidies les plus fréquemment retrouvées chez les patients immunodéprimés.

5.4 Les parasites opportunistes chez les PNH

Parmi les parasites opportunistes retrouvés chez les patients au stade SIDA, certains peuvent être recherchés chez les PNH. Ainsi, un grand nombre de parasites digestifs commensaux ou opportunistes ont déjà été décrits comme pouvant infecter la plupart des groupes de PNH. Ces derniers peuvent contaminer leur environnement par l'émission dans leurs selles de kystes, d'oocystes ou de spores, dont la transmission à leurs congénères se fait par voie oro-fécale.

Dans un souci de surveillance de l'état de santé des grands singes, des études ont été réalisées afin de détecter la présence de parasites gastro-intestinaux (Murray et al. 2000; Sleeman et al. 2000; Petrzeková et al. 2010; Howells et al. 2011). Une étude récente menée sur la recherche de ces parasites présents dans 78 échantillons fécaux de petits singes sauvages et 47 échantillons fécaux de singes de compagnie a montré une prévalence de 77% d'infection par des helminthes* et 36% par des amibes* (Pourrut et al. 2011). De nombreux œufs de vers et kystes de protozoaires ont également été décrits dans les selles de 150 chimpanzés du Parc National de Gombé en Tanzanie. La prévalence de vers et protozoaires retrouvés variait de 2% pour une espèce de protozoaire jusqu'à 100% pour une espèce de nématode (Gillespie et al. 2010).

La recherche spécifique de cryptosporidies chez les grands singes a montré des prévalences hétérogènes suivant les sites d'enquêtes. Au Gabon, une étude menée sur 95 échantillons de gorilles de la sous-espèce *G.g.gorilla* a mis en évidence des oocystes de cryptosporidies par fluorescence directe. Les résultats étaient fonction du niveau d'activité humaine ; 19% d'infection dans les sites avec beaucoup de contact avec l'homme et aucune infection dans un parc national protégé (van Zijll Langhout et al. 2010). En Uganda, des recherches ont été effectuées afin de trouver des cryptosporidies dans une communauté de gorilles de la sous-espèce *G.g.beringei*, habitués à l'Homme. Ainsi, *Cryptosporidium parvum* a été caractérisé par PCR dans 4 échantillons de fèces sur 100 (Graczyk et al. 2001). Une étude de 2009 a recherché des oocystes de cryptosporidies par microscopie à fluorescence dans 134 échantillons de gorilles et chimpanzés vivants soit dans un parc national (Cameroun, Congo et RCA) soit dans une forêt exploitée par une concession. Pour les deux sites, aucun échantillon n'a montré la présence de cryptosporidies (Gillespie et al. 2009).

Les microsporidies ont été très peu étudiées chez les PNH, et seulement 2 enquêtes ont été menées chez les grands singes. En 2002, une étude réalisée chez 42 petits singes sauvages au Cameroun a consisté à chercher par microscopie puis par PCR des microsporidies de l'espèce *Enterocytozoon bieneusi*, mais aucune infection n'a été démontrée (Pourrut et al. 2002). Chez des gorilles de la sous-espèce *G.g.beringei*, habitués à l'Homme, une équipe en Uganda a mis en évidence la présence d'*Encephalitozoon intestinalis* dans 4 échantillons fécaux sur 100 (Graczyk et al. 2002). Une seconde étude, plus récente, a consisté à rechercher des microsporidies par PCR chez des grands singes, 150 chimpanzés, 53 gorilles et 14 bonobos, vivant au contact de l'Homme dans treize zoos européens et deux sanctuaires africains (au Cameroun et au Kenya). Les résultats ont montré que les gorilles et les bonobos étaient infectés par *Encephalitozoon cuniculi* à respectivement 39% et 21% de prévalence. Les chimpanzés étaient infectés par différentes espèces d'*Encephalitozoon* comme *cuniculi* (30%) et *hellem* (1,3%) et par *Enterocytozoon bieneusi* (2,6%) (Sak et al. 2011a).

Objectifs

L'étude sur des chimpanzés sauvages de la sous-espèce *P.t.scheinfurthii*, habitués à l'Homme, et infectés par le virus SIVcpzPts ainsi que l'étude d'un chimpanzé captif de la sous-espèce *P.t.troglodytes* naturellement infecté par un SIVcpzPtt, nous ont éclairé sur la pathogénicité du SIVcpz (Keele et al. 2009; Etienne et al. 2011).

Cependant, aucune étude à large échelle sur le SIVcpzPtt infectant les chimpanzés sauvages de la sous-espèce *P.t.troglodytes* n'a été effectuée alors que ce virus est l'ancêtre direct du VIH-1 chez l'Homme. Nous ne possédons pas non plus d'information sur la pathogénicité du SIVgor chez les gorilles sauvages. En effet, il n'existe pas de communautés de chimpanzés *P.t.troglodytes*, ni de gorilles *G.g.gorilla*, habitués à l'Homme. Il faut donc étudier ces animaux dans leur environnement naturel.

Les méthodes non-invasives ont permis d'identifier la présence de virus dans les fèces de PNH sauvages, en revanche, par cette méthode, il est impossible de suivre leur état immunologique, comme la diminution des lymphocytes T CD4. Afin de constater une immunodéficience, il faut donc trouver un autre moyen. Or, nous savons que le VIH chez l'Homme entraîne un SIDA caractérisé entre autres, par l'apparition de maladies opportunistes comme les parasitoses digestives. Ainsi la comparaison de parasites retrouvés chez les individus SIV positifs avec ceux retrouvés chez les individus SIV négatifs serait un élément de réponse à la pathogénicité des SIV chez leur hôte naturel.

L'objectif de ce mémoire est d'étudier l'éventuelle pathogénicité du SIVcpzptt chez les chimpanzés et du SIVgor chez les gorilles sauvages du Cameroun en détectant la présence concomitante d'infections opportunistes.

Les objectifs spécifiques ont été de :

- Identifier le statut SIV des grands singes sauvages.
- Rechercher, chez des grands singes sauvages, les microsporidies et les cryptosporidies qui sont associées chez l'Homme à une progression vers un stade SIDA.
- Étudier la diversité génétique des microsporidies et les cryptosporidies retrouvés chez les grands singes sauvages et les comparer avec ceux décrits chez l'Homme.

Matériel et méthodes

1. Méthode de collecte non-invasive de fèces chez les grands singes

Les grands singes étant des espèces protégées vivant dans des forêts tropicales reculées, il est difficile de les étudier. C'est donc la mise au point en 2002 de méthodes non-invasives, qui a permis d'obtenir des informations sur ces animaux sauvages à partir d'échantillons fécaux (présence de virus, détection d'anticorps, génotypage de l'hôte, ...) (Santiago et al. 2002).

Des primatologues accompagnés de préleveurs expérimentés effectuent des missions de collectes de fèces dans les forêts du Cameroun. Ils cherchent la présence des grands singes dans leur habitat naturel grâce aux vocalisations, aux empreintes au sol et aux restes de fruits ou de végétaux mangés.

Les fèces sont ainsi, le plus souvent, trouvées et collectées près des nids ou sur un site d'alimentation des chimpanzés et des gorilles. L'espèce du grand singe est définie selon des critères visuels comme la forme et la consistance de l'excrément, ainsi que sur l'expérience des préleveurs. Environ 20 g de fèces sont mis dans un tube de 50 mL contenant 20 mL de RNAlater™. Ce produit préserve les acides nucléiques de la dégradation pour la durée de la mission et pour un maximum d'un mois. Le mélange est conservé à température ambiante sur le terrain avant d'être ramené à Yaoundé, puis envoyé au laboratoire de Montpellier et conservé dans des congélateurs à - 80°C.

La date de prélèvement, le lieu de collecte et les coordonnées GPS, la fraîcheur estimée, l'espèce supposée ainsi que des remarques sont notés pour chaque échantillon. D'autres données peuvent être prises en compte selon l'objectif de l'étude : les types de fruits entamés qui permettent de déduire le régime de ces animaux, la taille des échantillons fécaux afin d'estimer l'âge des individus, ou le comptage des nids permettant d'estimer le nombre d'individus adultes dans un groupe.

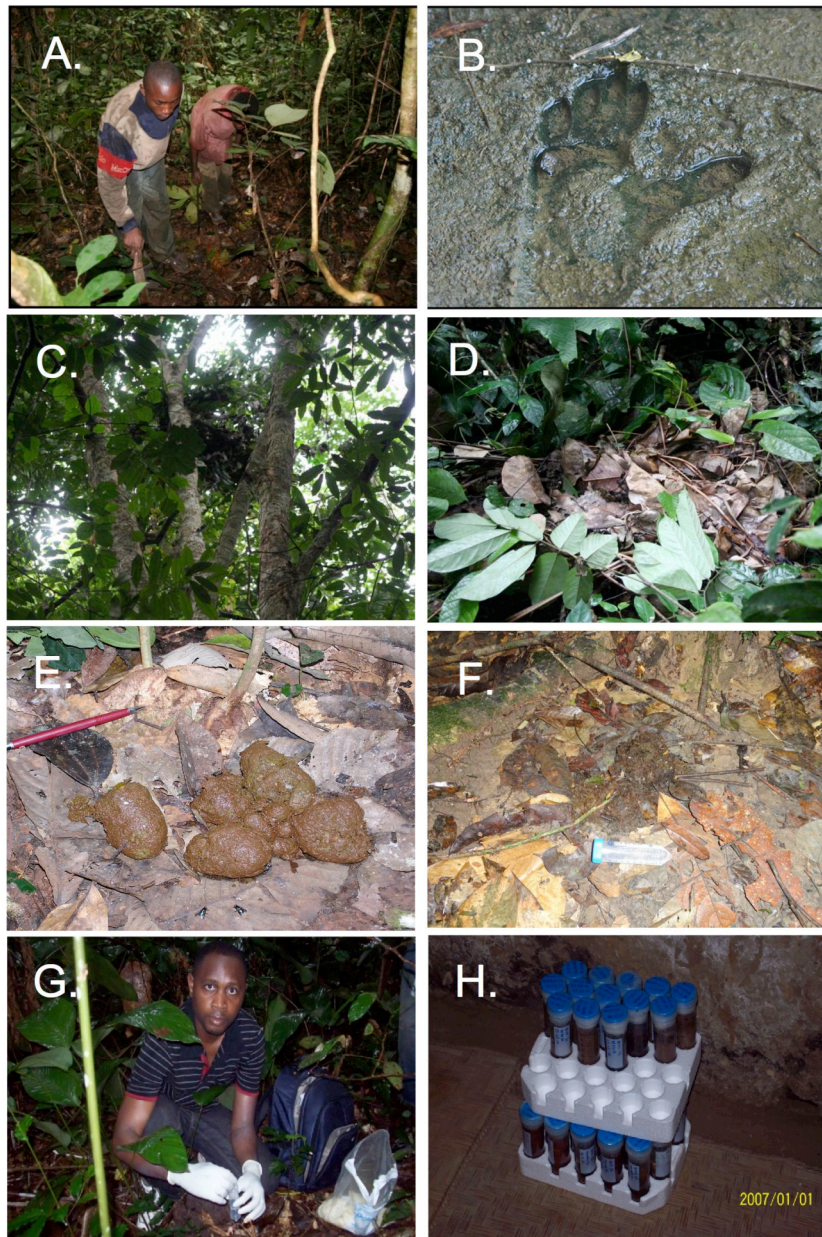


Figure 6 : Collecte de fèces des grands singes sauvages.

A. Pisteurs suivant les traces des grands singes ; B. Empreinte de chimpanzé ; C. Nid de chimpanzé dans les arbres ; D. Nid de Gorille au sol ; E. Fèces de gorille ; F. Fèces de chimpanzé ; G et H. Collecte des fèces dans des tubes contenant du RNALaterTM.

Photos de Florian Liégeois, Steve Ahuka-Mundeke et Vanina Boué.

2. Site d'étude et échantillons collectés

Les fèces de chimpanzés et de gorilles de notre étude ont été collectées dans la région sud-est du Cameroun, aux alentours du village de Mambélé (Figure 7).



Figure 7 : Carte du Cameroun et de la région autour du village de Mambélé.

La région autour du village de Mambélé, où les échantillons de notre étude ont été collectés, est représentée par le cercle rouge et le sigle MB.

Pour cette étude, nous avons travaillé sur 296 échantillons de fèces, 220 identifiés sur le terrain comme provenant de chimpanzés et 76 de gorilles.

Les collectes des fèces de chimpanzés sont réparties sur 6 missions réalisées entre 2003 et 2011 et celles de gorilles proviennent de 5 missions effectuées entre 2005 et 2011.

Entre 2005 et 2011, il y a eu plus de 500 fèces de gorilles collectées dans la région de Mambélé en même temps que les fèces de chimpanzés. Nous avons donc sélectionné des échantillons provenant des mêmes secteurs que ceux des chimpanzés mais nous avons choisi un représentant par groupe de nids et par point GPS donné afin de sélectionner des individus différents.

3. Confirmation de l'espèce et de la sous-espèce de l'hôte à partir d'échantillons fécaux

3.1 Extraction d'ADN

L'ADN fécal a été extrait à l'aide du kit d'extraction « QIAamp® Stool DNA Mini Kit » (QIAGEN) sur l'automate QiaCube (QIAGEN) (Keele et al. 2006). Le surnageant contenant le RNAlater™ est éliminé en centrifugeant 2 mL de fèces à 3000 g pendant 15 minutes. Le tampon de lyse a été ajouté au culot puis vortexé et centrifugé. Le surnageant a été traité avec des tablettes inhibitEX® qui adsorbent les impuretés. Après centrifugation, le surnageant est déposé dans l'automate QiaCube pour la suite de l'extraction selon les recommandations du fabricant. L'ADN a été suspendu dans 200 µL de tampon d'élution.

3.2 Amplification et séquençage de l'ADN ribosomal des mitochondries

Les espèces des échantillons collectés ont été confirmées en séquençant un fragment de 386 pb de l'ADN ribosomal des mitochondries de l'hôte (12SrRNA). Cette partie permet ainsi de déterminer de nombreuses espèces d'animaux, ainsi que les sous-espèces de chimpanzés et de gorilles. Pour l'amplification par PCR, les amorces utilisées sont les suivantes : 12S-L1091 (5'-AAA AAG CTT CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT-3') et 12S-H1478 (5'-TGA CTG CAG AGG GTG ACG GGC GGT GTG T-3') (van der Kuyl et al. 1995).

Nous avons ajouté 5 µL d'ADN au mélange réactionnel qui comprend, à une concentration finale : 1X de tampon de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,2 µg/µL de BSA, 0,4 pmol/µL d'amorces et 0,05 U/µL d'enzyme Qbiogen pour un volume total de 50 µL.

L'amplification d'ADN a été effectuée sur un thermocycleur (Biometra). Le programme comprend une première dénaturation de 2 min à 92°C, suivi de 35 cycles comprenant chacun les étapes de dénaturation de 15 s à 92°C, d'hybridation de 30 s à 52°C, et d'extension de 30 s à 72°C, puis une extension finale de 5 min à 72°C.

Le produit d'amplification a été purifié en utilisant le kit GeneClean Turbo (Qbiogen) et séquencé directement par la méthode de Sanger avec le kit ABI PRISM BigDye Terminators (Applied Biosystems). La méthode de Sanger utilise des ddNTPs (Di-désoxynucléotide triphosphate) caractérisés par l'absence de groupement OH en 3'. Lorsque la polymérase va synthétiser un brin d'ADN, à chaque base, elle a le choix d'incorporer un dNTP

(Désoxyribonucléotide triphosphate) et de continuer sa synthèse ou d'incorporer un ddNTP et de s'arrêter. À la fin de la réaction, on obtient un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été arrêtée. Les 4 ddNTPs sont marqués par un fluorophore différent. Le séquenceur automatique 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) permet de faire migrer par électrophorèse les différents fragments sur un polymère d'acrylamide et de détecter la fluorescence. La vérification et l'assemblage des séquences ont été effectués sur le logiciel Seqman (DNASTar).

3.3 Analyses phylogénétiques

Les nouvelles séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal X 2.0 (Thompson et al. 1997) contre des séquences de références provenant du laboratoire et de la Genbank³. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode des « plus proches voisins » (Neighbor-Joining), puis visualisé à l'aide du logiciel NJplot (Perrière & Gouy 1996). Le test des « bootstraps » a été utilisé afin de vérifier la robustesse de l'arbre. Les groupes supportés par des valeurs de bootstraps supérieures à 70-80% sont considérés comme fiables.

4. Génotypage de l'hôte

Sur le terrain, il n'est pas possible de savoir à quel individu appartient l'échantillon collecté. En revanche, au laboratoire nous pouvons déterminer le nombre d'individu, par génotypage, en analysant les séquences de microsatellites.

Les microsatellites sont des répétitions en tandem d'un motif court, de un à six nucléotides généralement (exemple : TGTG). Ces répétitions sont très abondantes dans l'ADN génomique et leur nombre est variable d'un individu à l'autre. Nous avons sélectionné des loci dont le polymorphisme allélique est élevé, ce qui en fait un très bon marqueur génétique pour l'identification des individus.

³ La GenBank est une base de données internationale en libre accès de toutes les séquences nucléotidiques publiquement disponibles.

Ces microsatellites ont été détectés en effectuant une PCR du locus contenant la séquence répétée suivie d'une migration sur un séquenceur avec un marqueur de poids moléculaire qui permet de situer les allèles en fonction de leur taille.

À partir de l'ADN extrait des fèces selon le protocole décrit p.33, les échantillons ont été génotypés sur 8 loci (D18s536, D4s243, D10s676, D9s922, D2s1326, D2s1333, D4s1627, D9s905) (Keele et al. 2006). Pour la détermination du genre, nous avons amplifié la région du gène de l'amélogénine qui contient une délétion dans le chromosome X mais pas dans le chromosome Y (Sullivan et al. 1993). Chaque locus a été localisé grâce à un couple d'amorces dont l'amorce sens est marquée par un fluorochrome. Au total, trois fluorochromes ont été employés : Fam (signal bleu), Hex (signal vert), Dragon Fly Orange (signal noir) (Tableau 3).

Les PCR ont été effectuées en multiplex ; une PCR pour le genre et les loci D18s536, D4s243, D10s676, D9s922 et une PCR pour les loci D2s1326, D2s1333, D4s1627, D9s905.

Le mélange réactionnel est le même pour chaque PCR, il comprend à une concentration finale : 1X de tampon de PCR avec MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,2 µg/µL de BSA, 0,4 pmol/µL d'amorces et 0,05 U/µL d'enzyme Qbiogen pour un volume total de 50 µL. La quantité d'ADN utilisée varie de 4 à 10 µL.

L'amplification a été effectuée sur un thermocycleur (PTC-200). Le programme comprend une première dénaturation de 3 min à 95°C, suivi de 40 cycles de 20 s à 95°C, de 45 s entre 53°C et 60°C (suivant les températures d'hybridation des amorces), et de 45 s à 72°C, puis une extension finale de 5 min à 72°C.

Les PCR sont répétées au moins trois fois lors de l'obtention de motifs hétérozygotes et au moins quatre fois lors de motifs homozygotes afin de s'assurer que le profil obtenu n'est pas le résultat d'un « allelic drop out ». Ceci est un phénomène d'amplification d'un seul allèle, fréquent lors d'analyse de matériel de mauvaise qualité comme dans le cas d'ADN extrait de fèces (Navidi et al. 1992; Taberlet et al. 1996).

Le résultat de l'amplification a été analysé avec un marqueur de taille fluorescent (GS400HD, Applied Biosystems) sur un séquenceur automatique 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems). Le logiciel Genemapper version 3.7 (Applied Biosystems) a été utilisé pour la lecture des profils obtenus.

Tableau 3 : Liste des amorces de géotypage par locus.

Locus	Amorces	Fluorochrome	Séquence de l'amorce	Taille du fragment (pb)
Amélogénine	Amel A	Dragon fly orange	5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3'	106 (femelle)
	Amel B	/	5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'	106 et 112 (mâle)
D18s536	HUM05262-F HUM05263-R	Fam /	5'-ATTATCACTGGTGTAGTCCTCTG-3' 5'-CACAGTTGTGTGAGCCAGTC-3'	140 à 170
D4s243	MGS02609-F HUM05263-R	Fam /	5'-TCAGTCTCTCTTTCTCCTTGCA-3' 5'-TAGGAGCCTGTGGTCTGT-3'	190 à 250
D10s676	HUM05148-F HUM05149-R	Hex /	5'-GAGAACAGACCCCAATCT-3' 5'-ATTCAGTTTTACTATGTGCATGC-3'	170 à 190
D9s922	HUM09025-F HUM09026-R	Hex /	5'-TCAGAGGACCACTGCCTAAG-3' 5'-CTGATGGGATTTGTGCCTAT-3'	290 à 310
D2s1326	HUM09373-F HUM09374-R	Fam /	5'-AGACAGTCAAGAATAACTGCCC-3' 5'-CTGTGGCTCAAAGCTGAAT-3'	230 à 280
D2s1333	HUM12880-F HUM12880-R	Fam /	5'-CTTTGTCTCCCAGTTGCTA-3' 5'-TCTGTCATAAACCGTCTGCA-3'	295 à 340
D4s1627	HUM05068-F HUM05069-R	Hex /	5'-AGCATTAGCATTGTCTGG-3' 5'-GACTAACCTGACTCCCCTC-3'	210 à 250
D9s905	HUM07339-F HUM07330-R	Hex /	5'-GTGGGAAAATTGGCCTAAGT-3' 5'-CTTCTGAGCCTCACACCTGT-3'	270 à 290

Le géotypage est effectué sur 9 loci dont une région du gène de l'amélogénine afin de déterminer le genre. Pour chacun des 9 loci sont notés le nom, la séquence des amorces utilisées, le fluorochrome employé, ainsi que la taille du fragment attendu.

Le travail de géotypage sur les échantillons de chimpanzés SIV positifs et négatifs a été effectué en collaboration avec le laboratoire de l'Université d'Alabama à Birmingham.

Les échantillons de gorilles n'ont pas été géotypés, mais lors du tri des 76 fèces, nous avons choisi un échantillon par groupe de nids et par points GPS donné afin d'avoir plus de chance de travailler sur des individus différents.

5. Détection d'anticorps anti-SIV dans les fèces de chimpanzés et de gorilles

Les fèces sont conservées dans du RNAlaterTM et ce produit contient beaucoup de sels qui peuvent inhiber la recherche d'anticorps en formant un complexe avec les immunoglobulines. Il est nécessaire de traiter les échantillons afin de solubiliser ce complexe, nous avons ainsi pratiqué une dialyse au préalable. Pour cela, 2 mL fèces ont été diluées dans 7 mL de solution PBS/Tween-20 et inactivées par chauffage (1 heure à 60°C). Après une centrifugation de 10 min à 4500 RPM afin de clarifier le mélange, celui-ci a été incubé avec du PBS toute la nuit à 4°C (Keele et al. 2006; Van Heuverswyn et al. 2006). Le dialysat obtenu peut maintenant être utilisé pour des tests sérologiques.

Il n'existe pas d'outils de diagnostic spécifique pour la détection directe des anticorps anti-SIV chez les PNH. Nous avons donc utilisé le test commercial sérologique INNO-LIATM (Innogenetics) qui est un test de confirmation pour le VIH. La sensibilité et la spécificité de ce test ont été validées sur des échantillons fécaux de chimpanzés captifs (Keele et al. 2006). La sensibilité est de 92% et la spécificité de 100%. La validation du test n'a pas été effectuée pour les gorilles car il n'y en a pas en captivité avec un statut SIV positif.

Le test INNO-LIATM se compose de protéines recombinantes et de peptides synthétiques du VIH-1 et du VIH-2, adsorbés sur une bandelette de nylon. Les anticorps spécifiques anti-SIVcpz/gor éventuellement présents vont réagir de manière croisée avec les antigènes du VIH-1 et former un complexe révélé par colorimétrie.

Afin que le résultat du test soit validé, il faut que les bandes contrôles, présentes sur chaque bandelette, apparaissent. Ensuite, la lecture des échantillons est différente de celle pour le VIH et nous considérons un échantillon de fèces comme positif lorsqu'au moins une bande colorée apparaît (VIH-1 ou VIH-2).

6. Détection des parasites dans les échantillons fécaux

6.1 Extraction de l'ADN parasitaire

Afin de détecter par PCR la présence de parasites intestinaux dans les fèces de grands singes, il a été nécessaire d'adapter le protocole d'extraction d'ADN. Ainsi, nous sommes parti du mélange fèces/RNALater™ auquel nous avons ajouté le tampon de lyse et nous avons chauffé le mélange 10 minutes à 95°C. En effet, les cellules de l'hôte peuvent être lysées à température ambiante, mais la paroi des oocystes ou des spores parasites nécessite une température de lyse plus élevée. La suite du protocole est identique à l'extraction de l'ADN de l'hôte p. 33. L'ADN a été suspendu dans 200 µL de tampon d'élution.

6.2 Amplification de l'ADN des cryptosporidies

Les amorces utilisées dans ce travail nous ont permis d'amplifier toutes les espèces du genre *Cryptosporidium* (Tableau 4) (Xiao et al. 1999). L'ADN amplifié correspond à un fragment de 820 pb du gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal.

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour amplifier *Cryptosporidium* spp.

Amorce	Étape de PCR	Séquence
Crypto F-sens	1 ^{re}	5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'
Crypto R-anti sens	1 ^{re}	5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'
Crypto NF-sens	2 ^{de}	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'
Crypto NR-anti sens	2 ^{de}	5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'

La PCR nichée a été effectuée avec 10 µL d'ADN pour la 1^{re} étape et 5 µL du produit obtenu pour la 2^{de} étape.

Un témoin positif d'ADN de l'espèce *Cryptosporidium parvum* a été acheté sur le site de l'American Type Culture Collection (ATCC <http://www.lgcstandards-atcc.org/>).

Pour les deux étapes de PCR, le mélange réactionnel comprend à une concentration finale : 1X de tampon de PCR avec MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,2 µg/µL de BSA, 0,6 pmol/µL d'amorces et 0,05 U/µL d'enzyme Qbiogen pour un volume total de 50 µL.

L'amplification d'ADN a été effectuée sur un thermocycleur (Biometra) avec un programme en « gradient de température décroissant » pour les 2 étapes.

1^{re} étape : 3 min à 94°C, suivi de 20 cycles de 45 s à 94°C, 45 s à 45°C, et 1min30 à 72°C. Puis 25 cycles de 45 s à 94°C, 45 s à 55°C, et 1min30 à 72°C. Enfin, une extension finale de 5 min à 72°C.

2^{de} étape : 3 min à 94°C, suivi de 10 cycles de 45 s à 94°C, 45 s à 55°C moins 0,5°C par cycle, et 1 min à 72°C. Puis 35 cycles de 45 s à 94°C, 45 s à 55°C, et 1 min à 72°C. Enfin, une extension finale de 5 min à 72°C.

6.3 Amplification de l'ADN des microsporidies

Afin d'amplifier les 3 espèces du genre *Encephalitozoon*, ainsi que l'espèce *Enterocytozoon bieneusi*, nous avons utilisé des amorces spécifiques précédemment décrites (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996) (Tableau 5). Le fragment comprend une partie du gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 18S, la région intergénique non transcrite (ITS) et une partie de la grande sous-unité de l'ARN ribosomal 28S. La longueur du fragment est environ de 300 pb pour le genre *Encephalitozoon*, et dépend de l'espèce amplifiée, et de 500 pb pour le genre *Enterocytozoon*.

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour amplifier les genres *Encephalitozoon* et *Enterocytozoon*.

Amorce	Étape de PCR	Séquence
Msp1-sens †*	1 ^{re}	5'-TGAATGKGTCCCTGT-3'
Msp2A-anti sens †	1 ^{re}	5'-TCACTCGCCGCTACT-3'
Msp2B-anti sens *	1 ^{re}	5'-GTTTCATTCGCACTACT-3'
Msp3-sens †*	2 ^{de}	5'-GGAATTCACACCGCCCGTCRYTAT-3'
Msp4A-anti sens †	2 ^{de}	5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTYMAARGGGT-3'
Msp4B-anti sens *	2 ^{de}	5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTCCAGGGAG-3'

† amorces spécifiques du genre *Encephalitozoon*. * amorces spécifiques du genre *Enterocytozoon*. †* amorces communes pour les deux genres. K=G/T, M=A/C, R=A/G, Y=C/T.

Le témoin positif pour le genre *Encephalitozoon* est de l'ADN extrait à partir d'une souche commerciale de l'espèce *intestinalis* achetée sur le site de l'ATCC (CDC V307). La souche a été cultivée sur monocouche de cellules eucaryotes CHO (cellules d'épithélium ovarien de hamster) en RPMI et 5% de sérum de veau fœtal, à 5% de CO₂ et 35°C, comme décrit sur le site de l'ATCC (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>). Le témoin positif pour le genre *Enterocytozoon* est de l'ADN extrait des fèces d'un patient.

Pour les deux genres de microsporidies, la PCR nichée a été effectuée avec 10 µL d'ADN pour la 1^{re} étape et 5 µL du produit obtenu pour la 2^{de} étape. Nous avons également effectué des PCR avec des dilutions d'ADN de 10 µL, 8 µL, 5 µL et 3 µL pour la 1^{re} étape.

Pour les deux étapes de PCR, le mélange réactionnel comprend à une concentration finale : 1X de tampon de PCR avec MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,2 µg/µL de BSA, 0,4 pmol/µL d'amorces et 0,05 U/µL d'enzyme Qbiogen pour un volume total de 50 µL.

L'amplification d'ADN a été effectuée sur un thermocycleur (Biometra) avec un programme classique pour la première étape et un programme en « gradient de température décroissant » pour la seconde étape.

1^{re} étape : 3 min à 94°C, suivi de 35 cycles de 45 s à 94 °C, 45s à 54°C, et 1 min à 72°C. Puis, une extension finale de 5 min à 72°C.

2^{de} étape : 3 min à 94°C, suivi de 10 cycles de 45 s à 94 °C, 45 s à 60°C moins 0,5°C par cycle, et 1 min à 72°C. Puis 25 cycles de 45 s à 94°C, 45 s à 60°C, et 1 min à 72°C. Enfin, une extension finale de 5 min à 72°C.

6.4 Séquençage des produits amplifiés

Les produits d'amplification ont été purifiés en utilisant le kit GeneClean Turbo (Qbiogen) et séquencés directement par la méthode de Sanger avec le kit ABI PRISM BigDye Terminators (Applied Biosystems) avec les amorces de la seconde étape de PCR. Les séquences ont été lues sur un séquenceur automatique 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems). La vérification et l'assemblage des séquences ont été effectués sur le logiciel Seqman (DNASTar).

6.5 Analyses phylogénétiques des parasites amplifiés

Deux méthodes de phylogénie ont été utilisées pour cette étude : une méthode classique de distance (les plus proches voisins) et une méthode plus puissante basée sur les probabilités (maximum de vraisemblance).

Pour la méthode classique, les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal X 2.0 contre des séquences de référence provenant de la Genbank. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode des plus proches voisins (Neighbor-Joining) (Saitou & Nei 1987), puis visualisé à l'aide du logiciel NJplot (Perrière & Gouy 1996). L'arbre a été enraciné avec un groupe extérieur dans le but de situer l'ancêtre commun des taxa. Le test des « bootstraps » a été utilisé afin de vérifier la robustesse de notre arbre (70-80% de bootstraps est considéré comme fiable).

Pour les analyses phylogénétiques avec la méthode des probabilités, nous avons utilisé et travaillé sur différents sites qui regroupent des programmes de bioinformatiques dédiés à la phylogénie.

Ainsi, sur le site <http://www.phylogeny.fr/> (Dereeper et al. 2008), nous avons recherché avec le programme BLAST Explorer 2.2.18 des séquences de référence, ainsi qu'une séquence qui a servi à enraciner l'arbre et améliorer son évaluation. Les nouvelles séquences obtenues ont été alignées de façon optimale à l'aide du logiciel Mafft contre les séquences de référence (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato et al. 2002). L'algorithme d'alignement peut générer des « gaps », insertions et délétions, représentées par des tirets. Les séquences qui présentent plus de gaps par rapports aux autres sont trop différenciées de manière artificielle. Afin de « dégager » les séquences de façon optimale, nous avons utilisé le logiciel Gblocks 061b (Talavera & Castresana 2007). L'alignement résultant a été visualisé à l'aide du logiciel Seaview (Gouy et al. 2010). Pour la construction de l'arbre phylogénétique, nous avons utilisé la méthode du maximum de vraisemblance (ML, Maximum likelihood) par le programme PhyML (Guindon & Gascuel 2003) contenu dans Seaview. Afin d'être le plus fiable possible, nous avons appliqué des méthodes sophistiquées pour explorer la phylogénie. Ainsi nous avons utilisé le modèle de substitution GTR (General Time Reversible), avec proportion des sites invariables optimisée, et la loi de gamma optimisée. La robustesse statistique des embranchements a été évaluée à l'aide des aLRT (approximate Likelihood ratio test), équivalents aux « bootstrap ». Le test aLRT est considéré comme fiable quand sa valeur est comprise entre 0,8 et 1.

Résultats

1. Échantillons collectés

Pour notre étude, nous avons sélectionné 220 échantillons identifiés sur le terrain comme chimpanzés, collectés lors de 6 missions réalisées entre juin 2003 et février 2011 ainsi que 76 échantillons identifiés comme gorilles, collectés lors de 5 missions menées entre avril 2005 et février 2011. Afin de confirmer l'espèce identifiée sur le terrain, nous avons testé ces échantillons par PCR et séquençage. La phylogénie par méthode des distances nous a permis de comparer les séquences obtenues à des échantillons de références afin de déterminer l'espèce (Figure 8).

Ainsi, 156 échantillons ont été confirmés de la sous-espèce *Pan troglodytes troglodytes*, et 74 de la sous-espèce *Gorilla gorilla gorilla*.

Sur les autres échantillons fécaux supposés d'espèce de chimpanzé, 28 échantillons étaient des petits singes (11 *Cercocebus agilis*, 9 *Cercopithecus cephus*, 4 *Cercopithecus nictitans*, 4 *Lophocebus albigena*) et 3 échantillons étaient d'origine humaine. Sur les 76 échantillons identifiés comme de gorilles sur le terrain, 1 échantillon appartenait à l'espèce *Syncerus caffer*, ou buffle d'Afrique. Pour 34 échantillons (33 identifiés comme chimpanzés et 1 comme gorille), l'ADN était dégradé, nous n'avons donc pas pu déterminer l'espèce. Ainsi, sur les 21 échantillons de la collecte de juin 2003, aucun n'était exploitable et n'ont pas été utilisés par la suite pour la recherche de parasites (Tableau 6).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des espèces des échantillons fécaux.

Collectes	Espèce identifiée sur le terrain:		Confirmation de l'espèce par PCR				Échantillons dégradés
	Chimp-anzés	Gorilles	Chimpanzés <i>P.t.t.</i>	Gorilles <i>G.g.g.</i>	Petits singes	Autres	
Juin 2003	21	0	0	0	2	0	19
Avril 2005	66	2	63	2	0	2	1
Avril 2007	14	10	14	10	0	0	0
Mars 2010	44	21	37	21	7	0	0
Novembre 2010	25	14	14	14	11	0	0
Février 2011	50	29	28	27	8	2	14
Total	220	76	156	74	28	4	34

Sur 296 échantillons fécaux identifiés sur le terrain comme de chimpanzés ou de gorilles, 156 échantillons proviennent réellement de chimpanzés et 74 de gorilles après confirmation par PCR.

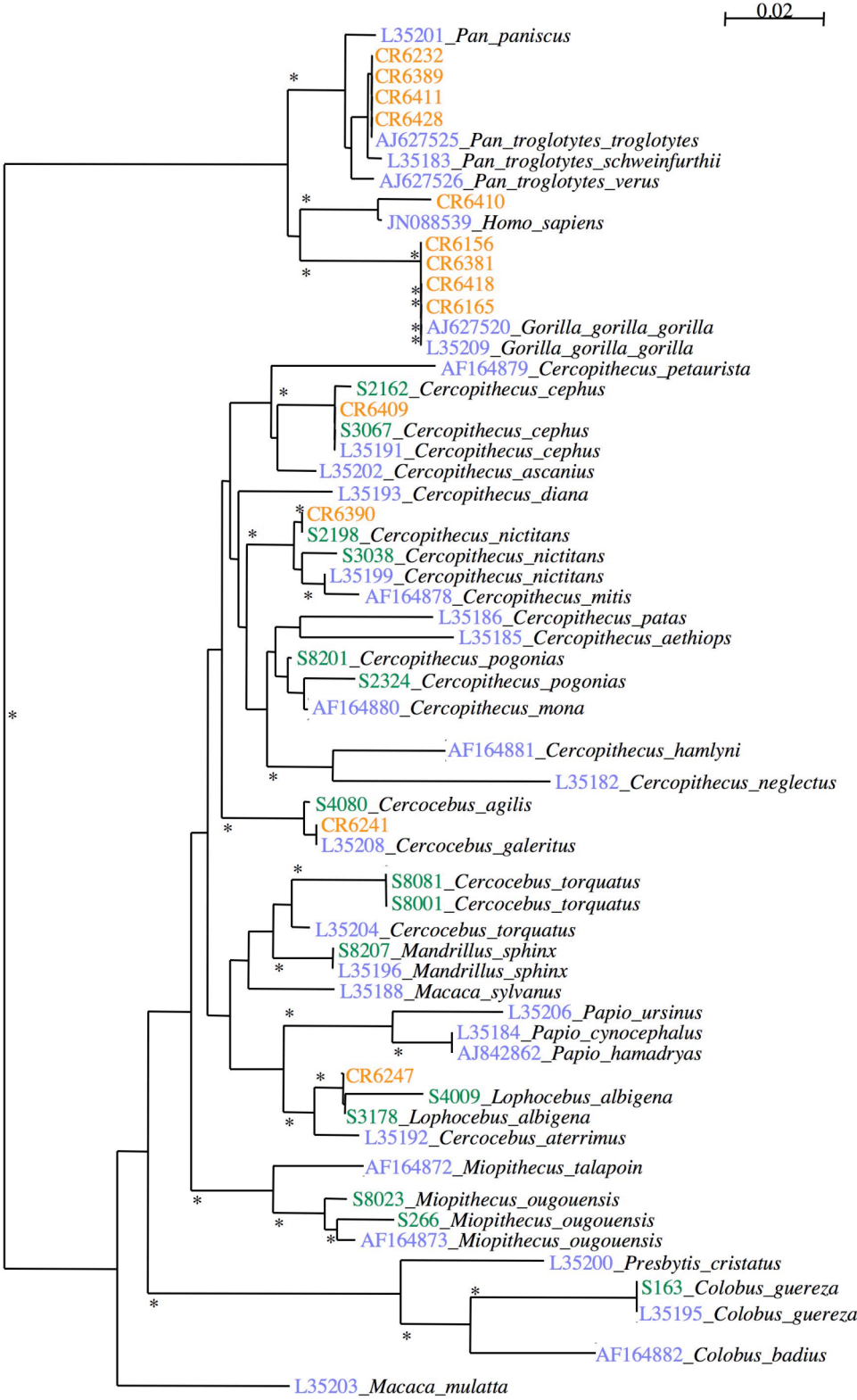


Figure 8 : Arbre phylogénétique des espèces.

Arbre phylogénétique d'un alignement de 386 pb de l'ADN ribosomal des mitochondries de l'hôte selon la méthode des plus proches voisins. La barre d'échelle représente 0,02 substitution par site et les étoiles montrent les valeurs de bootstraps supérieurs à 80. Quelques séquences de l'étude sont représentées en orange, les séquences téléchargées sur la Genbank sont en bleu et les séquences du laboratoire d'études précédentes sont en vert.

2. Infection à SIV chez les chimpanzés et gorilles sauvages

2.2 Présence d'anticorps anti-SIV

La présence d'anticorps anti-SIV réagissant de manière croisée avec les antigènes du VIH a été recherchée dans les 156 fèces de chimpanzés et 74 fèces de gorilles avec le test sérologique INNO-LIA™.

Nous avons identifié 45 échantillons qui réagissaient de manière croisée avec les antigènes du VIH-1 sur 156 échantillons fécaux de chimpanzés répartis sur les différentes missions de collectes, ce qui correspond à 28,9% de prévalence. Sur les 74 fèces de gorilles, aucun échantillon n'a montré de réaction positive avec le test sérologique. Le détail par collecte est indiqué dans le tableau 7.

Tableau 7 : Présence d'anticorps anti-SIV dans les fèces de grands singes.

	Chimpanzés		Gorilles	
	Nombre d'échantillons	Sérologie SIV positive	Nombre d'échantillons	Sérologie SIV positive
Avril 2005	63	20	2	0
Avril 2007	14	2	10	0
Mars 2010	37	8	21	0
Novembre 2010	14	6	14	0
Février 2011	28	9	27	0
Total	156	45	74	0

Le nombre d'échantillons de chimpanzés et de gorilles avec une sérologie SIV positive est indiqué par date de collecte. Sur 156 échantillons de chimpanzés, 45 échantillons sont SIV positifs. Les 74 échantillons de gorilles sont SIV négatifs.

La figure 9 illustre les profils observés pour 10 échantillons fécaux de chimpanzés lors d'une sérologie SIV positive avec un test INNO-LIA™. Le test est validé car les bandes contrôles apparaissent sur chaque bandelette. En revanche, les profils obtenus sont différents du profil du témoin positif car le SIV est un virus divergent du VIH.

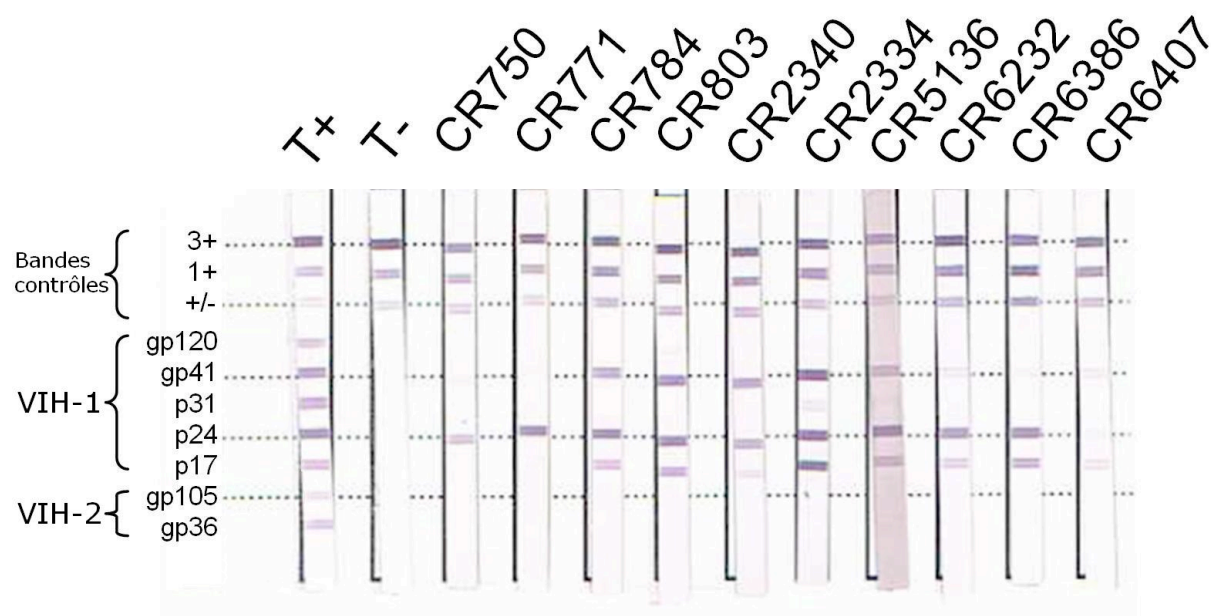


Figure 9 : Réactions au test de sérologie INNO-LIA™ dans des échantillons fécaux de chimpanzés.

Exemple de tests INNO-LIA™ ayant réagit de manière croisée avec les anticorps anti-SIV présents dans dix échantillons de chimpanzés. Les deux premières bandelettes servent de témoins positifs et négatifs pour le test. Le témoin positif est un échantillon de sérum humain inactivé contenant des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Afin de valider le test, il faut que les bandes contrôles 3+, 1+ et +/- soient colorées pour chaque échantillon.

2.3 Détermination du nombre d'individus SIV positifs

Seuls les 45 échantillons de chimpanzés SIV positifs ont été génotypés.

Nous avons identifié 42 échantillons correspondant à 17 individus (Tableau 8).

Sur les 45 échantillons SIV positifs en sérologie, 3 échantillons (CR806, CR6254, CR6411) n'ont pu être génotypés pour chaque allèle parce que l'ADN était dégradé. Pour ces 3 échantillons non déterminés comme individus, nous avons pris en compte les points GPS de collecte afin de savoir si nous pouvions les considérer comme des individus différents. En effet, nous savons que les communautés de chimpanzés se déplacent dans un territoire couvrant en moyenne 5 à 30 km² et effectuent normalement 0,5 à 3 kilomètres par jour (Chapman & Wrangham 1993).

L'échantillon CR806 n'a pas de données GPS répertoriées. Les échantillons CR6254 et CR6411 se trouvent respectivement à 2 Km et 3 Km des autres prélèvements effectués sur des jours consécutifs, ce qui n'a pas assez éloigné pour affirmer que ce sont des individus différents de ceux collectés dans les jours précédents. À titre d'exemple, pour l'individu MBc- ID25⁴, les 3 échantillons de fèces CR6405, CR6406 et CR6407 ont été collectés trois jours après à 28 Km de 2 autres échantillons CR6413 et CR6414.

Nous avons retrouvé le même individu sur 2 collectes différentes : MBc-ID25 et MBc-109. Les fèces de l'individu MBc-ID25 ont été collectées en avril 2005 sur des journées consécutives (échantillons CR774, CR775, CR784, CR785, CR788, CR791, CR802) puis en février 2011, également sur des journées consécutives (échantillons CR6405, CR6406, CR6407, CR6413, CR6414). Les différents échantillons fécaux de l'individu MBc-ID109 ont été collectés le même jour de novembre 2010 (CR6232, CR6233, CR6234, CR6235, CR6236) puis le même jour de février 2011 (CR6386, CR6387, CR6388).

⁴ Les individus sont numérotés ainsi : MBc-ID, MB pour Mambélé, c pour chimpanzé et ID pour individu. Cette numérotation s'est faite par ordre de manipulation des échantillons et non par date de collecte, en priorité en fonction de l'intérêt pour le SIV.

Tableau 8 : Identification des individus SIV positifs.

Échantillon	Individu	Date de collecte	Analyses des Microsatellites								genre	
			Locus D18S536	Locus D4S243	Locus D10S676	Locus D9S922	Locus D2S1326	Locus D2S1333	Locus D4S1627	Locus D9S905		
CR749	MBc-ID20	Avril 2005	153/169	196/227	181/189	- / -	256/264	313/321	228/228	290/294	na	
CR750	MBc-ID21	Avril 2005	165/169	200/227	177/177	- / -	244/252	321/321	228/236	270/286	na	
CR751		Avril 2005	165/169	200/227	177/177	- / -	244/252	321/321	228/236	270/286	na	
CR752		Avril 2005	165/169	200/227	177/177	- / -	244/252	321/321	228/236	270/286	na	
CR755		Avril 2005	165/169	200/227	177/177	- / -	244/252	321/321	228/236	270/286	na	
CR758		Avril 2005	165/169	200/227	177/177	- / -	244/252	321/321	228/236	270/286	na	
CR771		MBc-ID22	Avril 2005	145/153	204/247	177/189	306/310	252/268	325/329	232/236	274/286	na
CR773	MBc-ID23	Avril 2005	153/153	227/227	177/181	- / -	252/268	305/325	216/232	282/298	na	
CR801	MBc-ID24	Avril 2005	141/153	227/231	177/185	- / -	232/252	321/325	224/228	282/282	na	
CR774	MBc-ID25	Avril 2005	157/169	227/227	177/177	- / -	232/256	317/325	212/236	282/286	na	
CR775		Avril 2005	157/169	227/227	177/177	- / -	232/256	317/325	212/236	282/286	na	
CR784		Avril 2005	157/169	227/227	177/177	- / -	232/256	317/325	212/236	282/286	na	
CR785		Avril 2005	157/169	227/227	177/177	- / -	232/256	317/325	212/236	282/286	na	
CR788		Avril 2005	157/169	227/227	177/177	- / -	232/256	317/325	212/236	282/286	na	
CR791		Avril 2005	157/169	227/227	177/177	- / -	232/256	317/325	212/236	282/286	na	
CR802		Avril 2005	157/169	227/227	177/177	- / -	232/256	317/325	212/236	282/286	na	
CR6405		Février 2011	157/169	227/227	177/177	300/304	232/256	317/325	212/236	282/286	M	
CR6406		Février 2011	157/169	227/227	177/177	300/304	232/256	317/325	212/236	282/286	M	
CR6407		Février 2011	157/169	227/227	177/177	300/304	232/256	317/325	212/236	282/286	M	
CR6413		Février 2011	157/169	227/227	177/177	300/304	232/256	317/325	212/236	282/286	M	
CR6414		Février 2011	157/169	227/227	177/177	300/304	232/256	317/325	212/236	282/286	M	
CR776		MBc-ID26	Avril 2005	165/173	227/231	177/185	- / -	244/268	317/325	232/236	282/286	na
CR790		MBc-ID27	Avril 2005	149/153	247/247	185/189	294/302	240/248	297/313	224/228	282/298	na
CR803	MBc-ID28	Avril 2005	161/173	227/227	177/177	- / -	232/256	329/333	228/232	282/282	na	
CR2334	MBc-ID1	Avril 2007	146/154	225/225	176/188	296/304	- / -	- / -	- / -	- / -	na	
CR2340	MBc-ID2	Avril 2007	158/158	245/245	168/176	304/316	- / -	- / -	- / -	- / -	na	
CR5131	MBc-ID3	Mars 2010	162/162	221/225	172/176	300/300	239/263	310/322	228/232	282/282	M	
CR5136	MBc-ID4	Mars 2010	162/162	225/225	172/176	300/300	235/263	310/310	- / -	282/282	F	
CR5137		Mars 2010	162/162	225/225	176/176	300/300	239/263	310/310	328/232	282/282	F	
CR5138		Mars 2010	162/162	225/225	176/176	300/300	239/263	310/310	- / -	282/282	F	
CR5145	MBc-ID5	Mars 2010	162/162	204/247	176/188	292/296	259/267	326/330	232/236	286/286	F	
CR5156	MBc-ID6	Mars 2010	162/162	225/247	168/172	292/300	239/263	306/330	228/232	278/278	F	
CR5159	MBc-ID7	Mars 2010	162/162	221/225	172/176	296/308	255/267	306/322	228/236	282/286	M	
CR5161		Mars 2010	162/162	201/225	172/176	296/308	255/267	306/322	228/236	282/286	M	
CR6232	MBc-109	Nov 2010	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	F	
CR6233		Nov 2010	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	F	
CR6234		Nov 2010	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	F	
CR6235		Nov 2010	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	-	
CR6236		Nov 2010	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	F	
CR6386		Février 2011	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	F	
CR6387		Février 2011	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	F	
CR6388		Février 2011	166/170	225/225	175/175	298/298	239/263	310/322	226/230	282/282	F	
CR806		ND	Avril 2005	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	-
CR6254		ND	Nov 2010	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	F
CR6411	ND	Février 2011	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	F	

Deux allèles par locus sont montrés. Les tirets signifient que l'échantillon n'a pu être amplifié pour le locus en question. « na » signifie que l'échantillon n'a pas été testé, M pour mâle et F pour femelle. « ND » indique que l'individu n'a pas été identifié. Dix-sept individus ont pu être identifiés.

3. Recherche de parasites dans les échantillons fécaux

La présence de cryptosporidies et de microsporidies a été recherchée par PCR dans les 156 échantillons fécaux de chimpanzés et les 74 échantillons de gorilles.

3.1 Présence de cryptosporidies

La présence des cryptosporidies a été mise en évidence dans 2 échantillons fécaux de chimpanzés qui étaient SIV positifs. Aucune cryptosporidie n'a été trouvée dans les 111 fèces de chimpanzés SIV négatifs. Nous avons amplifié des cryptosporidies dans 2 échantillons de fèces de gorilles, tous SIV négatifs. Le détail par collecte est indiqué dans le tableau 9.

Tableau 9 : Nombre d'échantillons de grands singes infectés par des cryptosporidies en fonction du statut sérologique.

	Chimpanzés		Gorilles
	Crypto + / SIV +	Crypto + / SIV -	Crypto + / SIV -
Avril 2005	1/20	0/43	0/2
Avril 2007	1/2	0/12	0/10
Mars 2010	0/8	0/29	0/21
Novembre 2010	0/6	0/8	0/14
Février 2011	0/9	0/19	2/27
Total	2/45	0/111	2/74

Crypto pour cryptosporidies. Présence de cryptosporidies dans les échantillons de chimpanzés SIV positifs, de chimpanzés SIV négatifs et de gorilles SIV négatifs, par date de collecte. Au total, des cryptosporidies ont été amplifiées dans deux échantillons de chimpanzés SIV positifs et dans deux échantillons de gorilles SIV négatifs.

3.2 Présence de microsporidies

Nous avons recherché la présence de microsporidies en PCR spécifique des genres *Encephalitozoon* et *Enterocytozoon*. Aucune microsporidie n'a été amplifiée avec la PCR du genre *Enterocytozoon* dans les échantillons fécaux de chimpanzé et de gorille. En revanche, nous avons amplifié des microsporidies avec la PCR du genre *Encephalitozoon* dans 15 échantillons sur 45 échantillons SIV positifs et dans 26 échantillons sur 111 échantillons SIV négatifs. Nous avons détecté la présence de microsporidies dans 17 échantillons de fèces de gorilles, tous SIV négatifs (Tableau 10).

Tableau 10 : Nombre d'échantillons de grands singes infectés par des microsporidies en fonction du statut sérologique.

	Chimpanzés		Gorilles
	Msp + / SIV +	Msp + / SIV -	Msp + / SIV -
Avril 2005	5/20	10/43	1/2
Avril 2007	0/2	2/12	0/10
Mars 2010	5/8	9/29	6/21
Novembre 2010	2/6	1/8	2/14
Février 2011	3/9	4/19	8/27
Total	15/45	26/111	17/74

Msp pour microsporidies. Présence de microsporidies dans les échantillons de chimpanzés SIV positifs, de chimpanzés SIV négatifs et de gorilles SIV négatifs, par date de collecte. Au total, des microsporidies ont été amplifiées dans 15 échantillons de chimpanzés SIV positifs, dans 26 échantillons de chimpanzés SIV négatifs et dans 17 échantillons de gorilles SIV négatifs.

3.3 Individus infectés par cryptosporidies et microsporidies

Pour les 45 échantillons de chimpanzés SIV positifs, nous avons identifié 17 individus différents par la technique du génotypage. Nous avons ainsi trouvé des cryptosporidies chez 2 individus soit une prévalence de 12% d'infection, et amplifié des microsporidies dans 8 individus ce qui représente 47% d'infection (Tableau 11).

Tableau 11 : Nombre de chimpanzés infectés par des cryptosporidies et des microsporidies en fonction du statut sérologique

	Individus	
	SIV +	SIV -
Cryptosporidies	2/17 (12%)	nd
Microsporidies	8/17 (47%)	nd

Nombre d'individus infectés par cryptosporidies et microsporidies. « nd » signifie que les échantillons n'ont pas été génotypés. Sur 17 chimpanzés SIV positifs, 2 sont infectés par des cryptosporidies et 8 par des microsporidies.

Comme l'indique le tableau 12, nous n'avons pas pu amplifier de cryptosporidie pour tous les échantillons d'un même individu. Ainsi, les parasites amplifiés se trouvent dans 2 échantillons correspondant à 2 individus distincts, MBc-ID25 et MBc-ID2. Pour l'individu MBc-ID25, 7 échantillons avaient été prélevés en avril 2005 et 5 échantillons en février 2011, mais nous n'avons pu détecter des cryptosporidies seulement dans 1 échantillon sur 12.

C'est également le cas pour les microsporidies. Ainsi pour l'individu MBc-ID21, nous avons amplifié des parasites dans 1 échantillon sur 5, pour l'individu MBc-ID7, dans 1 échantillon sur 3 et pour l'individu MBc-ID109, dans 4 échantillons sur 8. En revanche, pour l'individu MBc-ID4, les 3 échantillons séquentiels ont été amplifiés.

Tableau 12 : Présence de parasites par individu SIV positif.

Échantillon de chimpanzé	Individu	Date de collecte	Présence de microsporidies	Présence de cryptosporidies	
CR749	MBc-ID20	Avril 2005	-	-	
CR750	MBc-ID21	Avril 2005	+	-	
CR751		Avril 2005	-	-	
CR752		Avril 2005	-	-	
CR755		Avril 2005	-	-	
CR758		Avril 2005	-	-	
CR771	MBc-ID22	Avril 2005	+	-	
CR773	MBc-ID23	Avril 2005	-	-	
CR801	MBc-ID24	Avril 2005	+	-	
CR774	MBc-ID25	Avril 2005	-	+	
CR775		Avril 2005	-	-	
CR784		Avril 2005	-	-	
CR785		Avril 2005	-	-	
CR788		Avril 2005	-	-	
CR791		Avril 2005	-	-	
CR802		Avril 2005	-	-	
CR6405		Février 2011	-	-	
CR6406		Février 2011	-	-	
CR6407		Février 2011	-	-	
CR6413		Février 2011	-	-	
CR6414		Février 2011	-	-	
CR776		MBc-ID26	Avril 2005	-	-
CR790		MBc-ID27	Avril 2005	-	-
CR803	MBc-ID28	Avril 2005	+	-	
CR2334	MBc-ID1	Avril 2007	-	-	
CR2340	MBc-ID2	Avril 2007	-	+	
CR5131	MBc-ID3	Mars 2010	+	-	
CR5136	MBc-ID4	Mars 2010	+	-	
CR5137		Mars 2010	+	-	
CR5138		Mars 2010	+	-	
CR5145	MBc-ID5	Mars 2010	-	-	
CR5156	MBc-ID6	Mars 2010	-	-	
CR5159	MBc-ID7	Mars 2010	-	-	
CR5161		Mars 2010	+	-	
CR6232	MBc-109	Nov 2010	-	-	
CR6233		Nov 2010	+	-	
CR6234		Nov 2010	+	-	
CR6235		Nov 2010	-	-	
CR6236		Nov 2010	-	-	
CR6386		Février 2011	-	-	
CR6387		Février 2011	+	-	
CR6388		Février 2011	+	-	
CR806	ND	Avril 2005	+	-	
CR6254	ND	Nov 2010	-	-	
CR6411	ND	Février 2011	+	-	

Pour chaque individu est notée la date de collecte ainsi que la présence de microsporidies et de cryptosporidies. « ND » signifie que l'individu n'a pas pu être identifié. Des microsporidies et des cryptosporidies n'ont pas été amplifiées pour tous les échantillons d'un même individu.

Le tableau 13 résume les résultats obtenus ainsi que les pourcentages d'infections pour les cryptosporidies et les microsporidies retrouvées dans les fèces de grands singes en fonction de leur statut sérologique. Le résultat est termes d'individus est indiqué seulement pour les chimpanzés SIV positifs.

Tableau 13 : Nombre de grands singes infectés par cryptosporidies et microsporidies en fonction du statut sérologique.

		Chimpanzés		Gorilles	
		Échantillons	Individus	Échantillons	Individus
SIV +	Cryptosporidies	2/45 (4,4%)	2/17 (12%)	0/0	na
	Microsporidies	15/45 (33%)	8/17 (47%)	0/0	na
SIV -	Cryptosporidies	0/111 (0%)	nd	2/74 (2,7%)	nd
	Microsporidies	26/111 (23%)	nd	17/74 (23%)	nd

« nd » signifie que les échantillons n'ont pas été testés, « na » pour non applicable. Chez les grands singes SIV positifs, des cryptosporidies ont été amplifiées dans 2 échantillons de chimpanzés correspondant à 2 individus, des microsporidies ont été amplifiées dans 15 échantillons de chimpanzés correspondant à 8 individus. Chez les grands singes SIV négatifs, des cryptosporidies ont été amplifiées dans 2 échantillons de gorilles, des microsporidies ont été amplifiées dans 26 échantillons de chimpanzés et dans 17 échantillons de gorilles.

4. Diversité génétique des parasites

4.1 Diversité génétique des cryptosporidies amplifiées

Les cryptosporidies ont été analysées par phylogénie afin de déterminer les espèces amplifiées. La méthode employée est une méthode classique de distance, celle des plus proches voisins. *Toxoplasma gondii*, un autre apicomplexe, a été choisi comme groupe extérieur afin d'enraciner l'arbre.

Parmi les 156 échantillons de fèces de chimpanzés, nous avons amplifié des cryptosporidies dans 2 échantillons SIV positifs. Les analyses phylogénétiques nous montrent qu'un échantillon se branche avec *Cryptosporidium cuniculus* et l'autre avec *Cryptosporidium ubiquitum* (Figure 10).

Parmi les 74 fèces de gorilles, tous SIV négatifs, nous avons mis en évidence la présence de cryptosporidies dans 2 échantillons. Dans l'arbre phylogénétique, les cryptosporidies sont proches de *Cryptosporidium cuniculus* mais ne se branchent pas avec les cryptosporidies retrouvées dans les échantillons de chimpanzés (Figure 10).

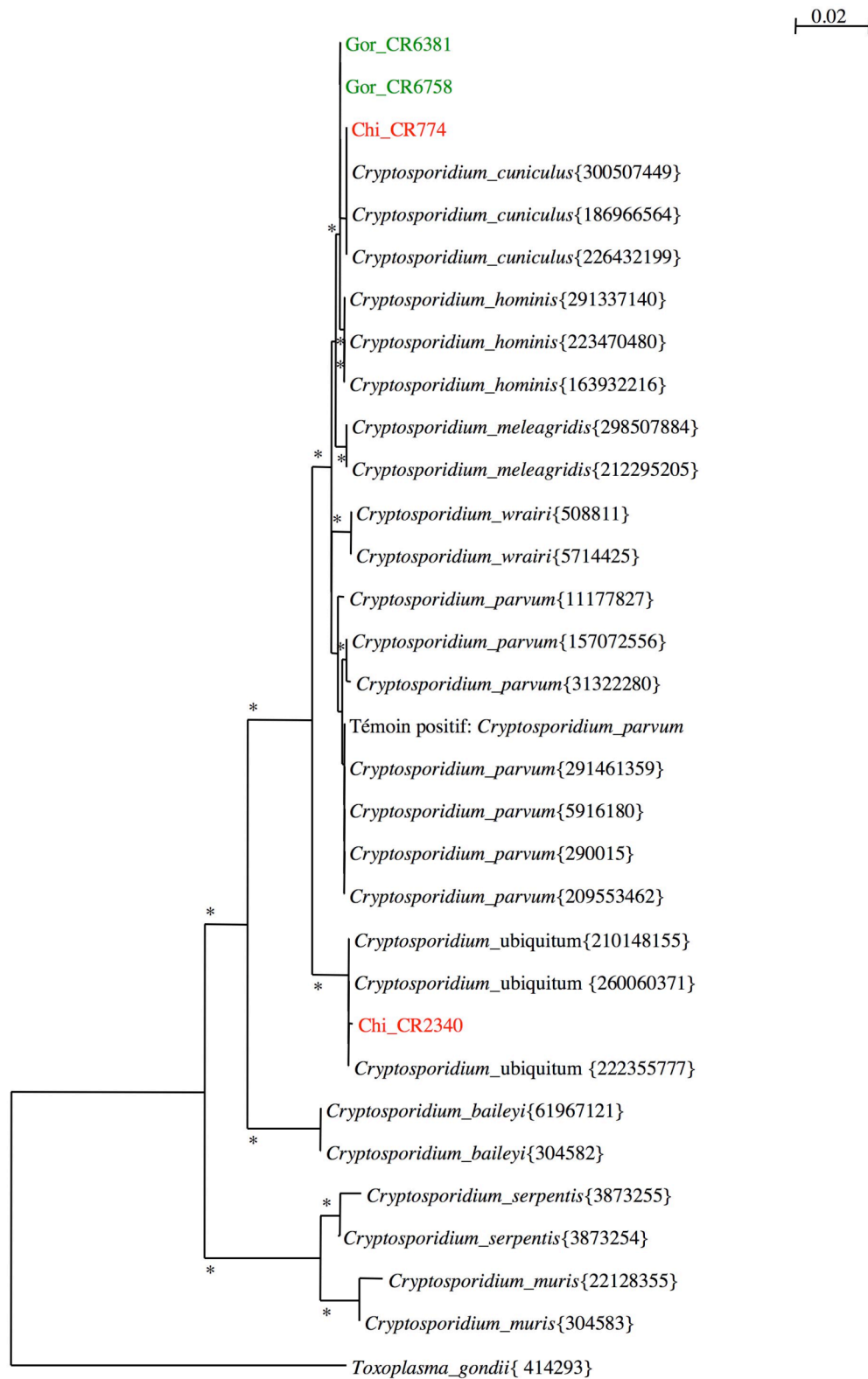


Figure 10 : Arbre phylogénétique des cryptosporidies.

L'arbre phylogénétique a été généré par la méthode des plus proches voisins sur un alignement de 800 pb de l'ARN 18S de cryptosporidies. La barre d'échelle représente 0,02 substitution par site. Les étoiles représentent les valeurs de bootstraps supérieures à 70. Les échantillons de référence sont en noir (numéros d'accèsion pour chaque référence entre accolades), les cryptosporidies trouvées chez les chimpanzés SIV positifs sont en rouge et chez les gorilles en vert.

4.2 Diversité génétique des microsporidies amplifiées

Les microsporidies du genre *Encephalitozoon* ont été analysées par phylogénie à l'aide d'une méthode plus robuste, celle des probabilités. En effet, l'alignement des séquences nous a montré une grande diversité ; beaucoup de régions hypervariables et beaucoup de « gap ». L'arbre phylogénétique généré présentait également une grande diversité des échantillons amplifiés par rapport aux séquences de référence de la Genbank. L'arbre a été enraciné avec le genre *Enterocytozoon*.

Au vu des résultats de phylogénie, nous avons également testé en PCR les échantillons d'autres espèces, ne faisant pas partie de l'étude de pathogénicité, comme contrôle « tout venant », provenant de la même région géographique. Ainsi, nous avons amplifié des microsporidies dans 2 échantillons fécaux humains, 6 petits singes, 1 buffle d'Afrique et 2 échantillons dont nous n'avions pas pu confirmer l'espèce (PCR de l'ARN ribosomal négative). Les différentes souches de microsporidies trouvées chez les chimpanzés, chez les gorilles ou chez les autres espèces se placent ensemble dans l'arbre mais loin des genres connus. Il n'y a pas de groupe en fonction de l'espèce.

Les analyses phylogénétiques ont mis en évidence trois groupes principaux (Figure 13) :

- 7 échantillons forment un groupe avec les références de l'espèce *Encephalitozoon hellem*. Les échantillons proviennent d'un chimpanzé SIV positif (CR801), de 2 chimpanzés SIV négatifs (CR761, CR2332), de 3 gorilles (CR6752, CR6811, CR6870) et d'un petit singe de l'espèce *Cercocebus agilis* (CR6420).
- 3 échantillons sont proches du genre *Encephalitozoon* sans que l'on puisse dire de quelle espèce précisément. CR754 et CR757 proviennent de chimpanzés SIV négatifs, CR6251 vient d'un petit singe de l'espèce *Cercopithecus cephus*.
- les échantillons restants sont éloignés, assez divergents. Trois échantillons (provenant d'un chimpanzé SIV négatif CR893, d'un Homme CR891, et du CR901 dont l'espèce n'a pas pu être identifiée) se branchent même très à l'écart des séquences de références et des autres échantillons de l'étude. Parmi ces échantillons se trouve un groupe plutôt « clonal », mais toujours différent des séquences de référence du genre *Encephalitozoon* ainsi que des autres genres de microsporidies déjà connues.

Pour 4 échantillons (CR761 d'un chimpanzé SIV négatif, CR801 et CR6233 de chimpanzés SIV positifs, CR900 échantillon humain) nous avons remarqué la présence d'une double amplification (300 pb et 400 pb) lors de la visualisation du produit de PCR (Figure 11). Après séquençage et analyses phylogénétiques, nous avons constaté que chaque bande représentait une souche différente de microsporidies. La comparaison des séquences nucléotidiques de l'échantillon à 300 pb et celui à 400 pb nous montre que la différence de 100 pb est due à une insertion dans un des fragments amplifiés (Figure 12).

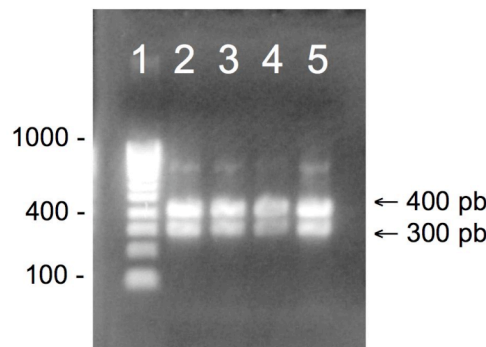


Figure 11 : Photo de gel montrant une double amplification.

Gel à 1% d'agarose et 0,005% de bromure d'éthidium. Colonne 1 : poids moléculaire de 100 à 1000 pb, colonnes 2 à 5 : échantillons présentant deux bandes à 300 et 400 pb après amplification par PCR.

```

MSP-3          GGAATTCACACCGCCCGTCRYTAT
CR801_300pb    ACCGCCCGTCGCCTATCTAAGATGACGCAGTGGACGAAGATTGAGAGGCTCAGTCTTTTCG
CR801_400pb    ACCGCCCGTCGCCTATCTAAGATGATATTTGGATGAAGATTGTGAGATCTGAATTTGGG
*****
CR801_300pb    TGTTAGATAAGATATAAGTCGTAACATGGCTGCTGTTGGAGAACCAGCAGCAGGATCAGT
CR801_400pb    TATTAGATAAGATATAAGTCGTAACATGGCTGCTGTTGGAGAACCAGCTGCAGGATCAGT
* *****
CR801_300pb    A-----
CR801_400pb    AATGAGTTTGATGTGTGATGTGTATGTGGCGTTAGCTGTGTGTGTATGTATGTGTGT
*
CR801_300pb    -----TGTGATTGTTTGTGTG-----
CR801_400pb    GTATGTCGTTGATTTGTGATGTGCGGTGATGTATGTTGTATGGTTAGCTGTGTATGTATGTT
*****
CR801_300pb    GTATGGACTTAGTTTTTGTATTTTTTCTCTATCCATGGGATTGATTGGCATTATCTGCGA
CR801_400pb    GTATGTATGTGTGGTTATTTGATTCATCCACATGGGAGGCATAGGCATTTTGAGCGA
*****
CR801_300pb    TGAAGGACGTGCTGGAGGACGATATGCCGTTTTTTAGCCGATGCTCTGAATTAGGTGTT
CR801_400pb    GGAAGGACGTAGAGAGTACGAGAGCGAGCCATGTGCTTGGTGTCTGAATGATGCTCTG
*****
CR801_300pb    TGTGCGCCTGTGGACCCYTKRACCTAAGCA
CR801_400pb    TGTGAGCAGGGGGACCCYTKRACCTAAGCA
*****
MSP-4a          TGGGRAAMYTGAATTCGTATTCTGAACC
    
```

Figure 12 : Alignement des deux séquences amplifiées d'un même échantillon.

Alignement nucléotidique par le logiciel Mafft. Les amorces de la 2^{de} étape de PCR sont indiquées en bleu, MSP-3 est l'amorce sens et MSP-4a, l'anti-sens. L'étoile signifie qu'il y a le même nucléotide à chacun des sites.

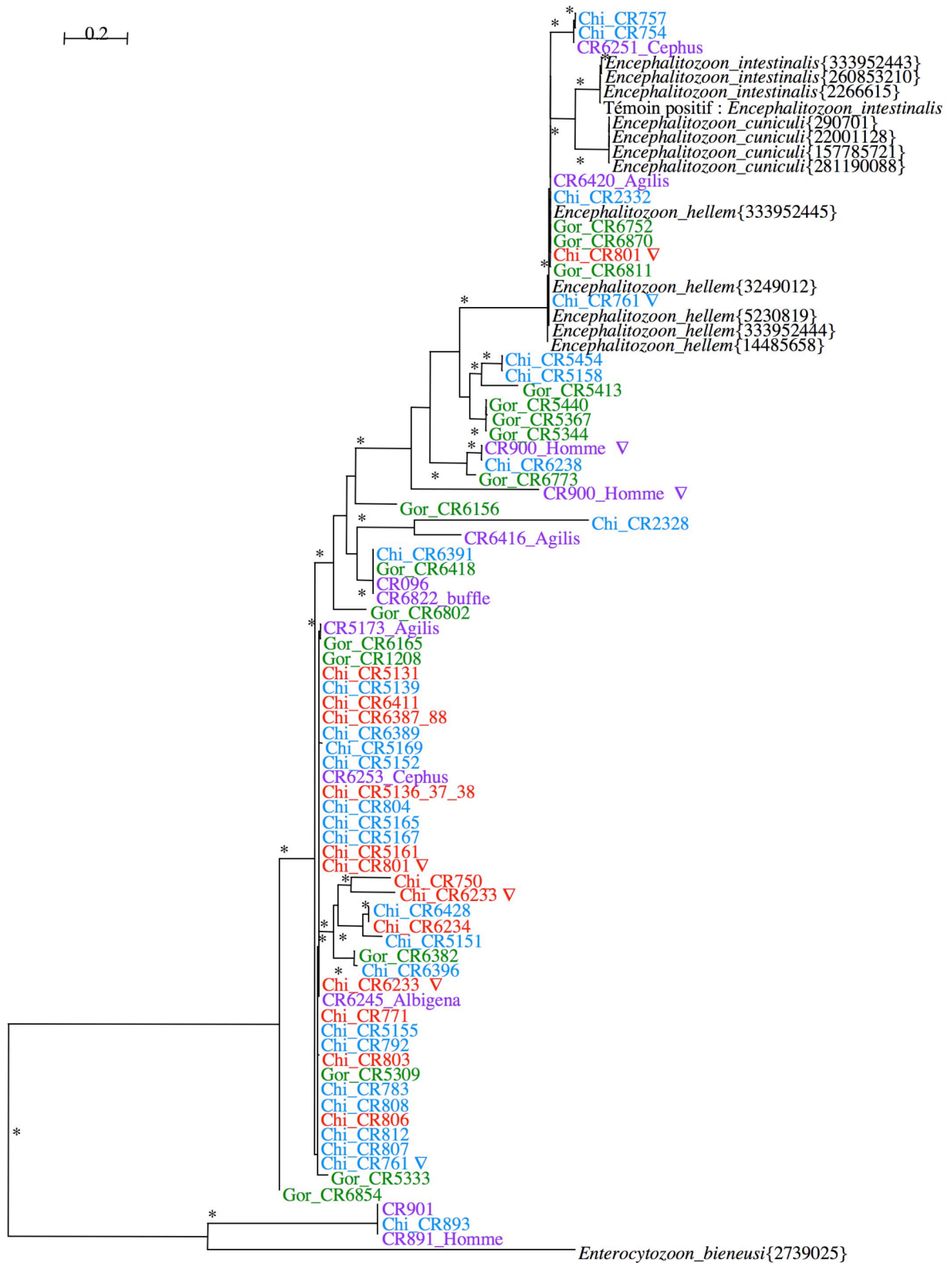


Figure 13 : Arbre phylogénétique des microsporidies.

Analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquences ITS de microsporidies (220 pb). La barre d'échelle représente 0,5 substitution par site. Les étoiles représentent les valeurs d'aLRT supérieure à 0,8. Les échantillons de référence sont en noir (numéros d'accèsion pour chaque référence entre accolades). Les microsporidies trouvées chez les chimpanzés SIV positifs sont en rouge, chez les chimpanzés SIV négatifs en bleu, chez les gorilles en vert et dans les autres espèces en violet. Les triangles montrent les échantillons pour lesquels nous avons eu une double amplification à la PCR.

Les résultats des analyses phylogénétiques montrent des échantillons éloignés des échantillons de référence. Il arrive que l'enzyme *taq* polymérase ait tendance à changer de brin d'ADN lors de la polymérisation, générant une séquence chimère qui n'existe pas *in vivo*. Ce phénomène a déjà été rencontré pour d'autres parasites comme *Plasmodium* spp. dans des fèces de gorilles (Liu et al. 2010).

L'amplification de deux bandes de tailles différentes à la PCR représentant 2 souches différentes dans l'arbre phylogénétique a confirmé l'idée qu'il pouvait y avoir au moins deux espèces différentes de microsporidies dans un échantillon. Ces deux bandes ont également confirmé le possible « switch » de l'enzyme d'un brin d'ADN à l'autre.

En partant de dilutions d'ADN, nous avons vérifié la sensibilité de la technique et en diminuant la quantité de matériel de départ, nous avons cherché à sélectionner une seule espèce de microsporidie afin d'éviter le phénomène d'amplification de séquences chimères.

Pour 5 échantillons, nous n'avons pas eu d'amplification pour toutes les dilutions d'ADN, ce qui laisse penser que la quantité d'ADN présente dans l'échantillon n'est pas très élevée. Seul l'échantillon CR5158 a été amplifié pour toutes les quantités d'ADN.

Malgré tout, chaque séquence amplifiée par échantillon était bien clonale, éliminant l'hypothèse de la présence de recombinaison (Figure 14).

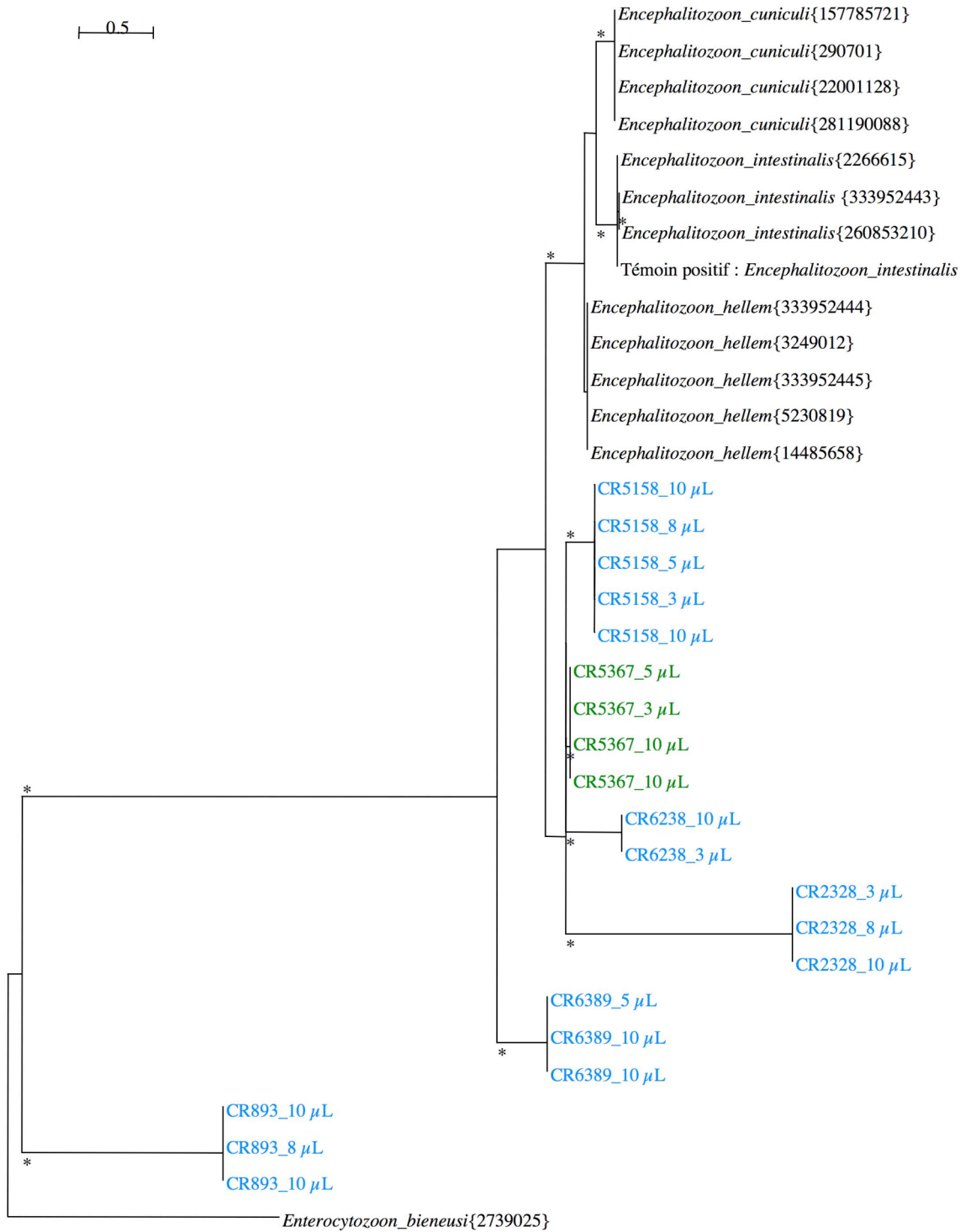


Figure 14 : Arbre phylogénétique d'échantillons avec différentes quantités de matériel de départ.

Analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquences ITS de microsporidies (220 pb). La barre d'échelle représente 0,5 substitution par site. Les étoiles représentent les valeurs d'aLRT supérieure à 0,8. Les échantillons de référence sont en noir (numéros d'accèsion pour chaque référence entre accolades), les microsporidies trouvées chez les chimpanzés sont en bleu et chez les gorilles en vert. La quantité d'ADN utilisée pour l'amplification est notée après le numéro de l'échantillon.

Discussion

L'objectif de ce mémoire était d'étudier la pathogénicité du SIVcpz_{ptt} chez les chimpanzés (*P.t.troglodytes*) et du SIVgor chez les gorilles (*G.g.gorilla*) sauvages au Cameroun. Jusqu'à présent, aucune étude sur la pathogénicité du SIV n'a été menée sur des gorilles et seulement sur un chimpanzé captif *P.t.troglodytes*.

Identification des infections à SIVcpz et SIVgor chez les grands singes sauvages du Cameroun.

Notre premier travail a été d'identifier le statut SIV des grands singes sauvages de notre étude, réalisée dans la région de Mambélé, située dans le sud-est du Cameroun. Cette région a été choisie car les enquêtes précédentes ont montré une prévalence SIVcpz élevée chez les chimpanzés, qui en plus sont infectés avec les ancêtres des souches VIH-1 groupe M. Nos analyses sérologiques ont montré que 28,9% des échantillons (45 sur 156) sont infectés par un SIV. Ce résultat rejoint la prévalence de 32% retrouvée dans les études précédentes (Van Heuverswyn et al. 2007; Neel et al. 2010). Dans cette région de Mambélé, nous n'avons pas mis en évidence d'infection à SIVgor chez les gorilles sauvages, ce qui confirme également les résultats des recherches effectuées précédemment (Van Heuverswyn et al. 2006; Neel et al. 2010).

Prévalence et diversité génétique des cryptosporidies et microsporidies.

Des cryptosporidies et des microsporidies ont été amplifiées par PCR spécifique dans les fèces de grands singes sauvages. Le génotypage des gorilles et des chimpanzés SIV négatifs n'a pas encore été réalisé, nous pouvons donc estimer l'infection en termes d'individus seulement pour les chimpanzés infectés par le SIV.

Nous avons mis en évidence des cryptosporidies chez deux chimpanzés SIV positif (12%) et aucune infection dans les échantillons fécaux de chimpanzés SIV négatifs. En revanche, nous avons identifié des cryptosporidies dans deux échantillons de gorilles SIV négatifs (2,7%).

Actuellement, peu d'études ont recherché des cryptosporidies chez les grands singes et aucune infection à cryptosporidie n'a pu être identifiée chez les gorilles et chimpanzés, habitant des forêts reculées, loin de la présence humaine (Gillespie et al. 2009; van Zijll Langhout et al. 2010). En revanche, une prévalence d'infection relativement importante (19%) avait été mise en évidence lorsque les grands singes vivaient à proximité de l'Homme (van Zijll Langhout et al. 2010). Dans notre étude, les cryptosporidies amplifiées se trouvent chez des gorilles et chimpanzés vivant près du village de Mambélé.

Les analyses phylogénétiques des souches amplifiées dans notre travail ont montré qu'une souche de cryptosporidie, infectant les chimpanzés, se branche avec *Cryptosporidium cuniculus*, parasite retrouvé chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) mais également chez l'Homme (Chalmers et al. 2009, 2011). Le second échantillon infectant les chimpanzés se branche avec *Cryptosporidium ubiquitum*, récemment nommée ainsi car cette espèce est retrouvée dans plusieurs zones géographiques et chez différents mammifères dont l'Homme, mais également dans des échantillons environnementaux (Fayer et al. 2010). Chez les gorilles, les deux souches de cryptosporidies détectées se branchent avec *Cryptosporidium cuniculus*.

Nous avons mis en évidence la présence de microsporidies dans 33% d'échantillons fécaux de chimpanzés SIV positifs (15 sur 45) correspondant à 47% d'individus porteurs (8 sur 17). Nous avons amplifié des microsporidies dans 23% des échantillons de chimpanzés SIV négatifs (26 sur 111), ainsi que dans 23% des échantillons de gorilles SIV négatifs (17 sur 74). Jusqu'à présent, les études sur les microsporidies ont été effectuées seulement chez des PNH vivant dans des parcs zoologiques et des sanctuaires où les animaux sont en contact avec l'Homme. Ces études ont montré des taux de prévalence chez les chimpanzés de 1,3% pour *Encephalitozoon hellem*, 30% pour *Encephalitozoon cuniculi* et 2,6% pour *Enterocytozoon bieneusi* (Sak et al. 2011a). Dans notre étude, 6 échantillons se branchent avec *Encephalitozoon hellem*, mais aucun avec *Encephalitozoon cuniculi*, ni avec *Enterocytozoon bieneusi*. Jusqu'à maintenant, *Enterocytozoon bieneusi* avait été recherché spécifiquement chez des petits singes au Cameroun, mais aucune infection n'avait été démontrée (Pourrut et al. 2002). Il est envisageable que l'espèce *Enterocytozoon bieneusi* soit transmise par l'homme mais qu'elle n'existe pas chez l'animal à l'état naturel.

Les analyses phylogénétiques des microsporidies amplifiées dans notre étude ont montré une grande diversité, et la majorité des souches amplifiées se branchent loin des séquences de référence des genres *Encephalitozoon* et *Enterocytozoon*. Cependant, il n'existe pas, dans la base de données de Genbank, de séquences de référence de microsporidies provenant de chimpanzés ou de gorilles sauvages. Par ailleurs, les microsporidies trouvées dans les échantillons de chimpanzés, de gorilles et de petits singes se branchent ensemble dans l'arbre phylogénétique. Ceci peut être expliqué par un partage des mêmes parasites chez ces espèces sympatriques*. Cependant, le fait de retrouver le même type de parasite dans différentes espèces d'animaux (PNH et buffle) pourrait indiquer une contamination environnementale, en raison de la viabilité des spores dans le milieu extérieur. Les spores peuvent être dispersées par des animaux (insectes, ...) ou des vecteurs inertes (poussières, fèces pulvérisées, eaux,

etc.). Afin de différencier les microsporidies environnementales de celles provenant d'un animal infecté, il faudrait pouvoir quantifier les spores par microscopie ou PCR quantitative. Ainsi, une grande quantité de spores démontrerait une réelle infection alors que la présence d'une petite concentration de spores serait plutôt un signal de dispersion environnemental. En effet, une étude de 2003 a été menée chez des macaques (*Macaca mulatta*) infectés expérimentalement par un clone moléculaire de SIVmac. La quantité de spores d'*Enterocytozoon bieneusi* a été comparée avant et après infection. Les résultats ont montré une augmentation significative de la quantité de spores trois mois après l'infection (Sestak et al. 2003). Cette technique pourrait également permettre d'éliminer l'hypothèse d'un portage sain des parasites. En effet, chez l'Homme, une étude a souligné l'augmentation de la présence de microsporidies depuis quelques années chez des personnes immunocompétentes, chez qui la maladie est auto résolutive (Sak et al. 2011b).

Lors de la vérification de la PCR, nous avons remarqué une double amplification pour trois échantillons fécaux de chimpanzés (CR801 et CR6233, SIV positifs et CR761, SIV négatif). Après analyses phylogénétiques, nous avons constaté qu'il s'agissait de deux souches distinctes pour chaque cas. L'alignement a déterminé que la différence était due à une insertion de 100 pb à l'intérieur du fragment ciblé par nos amorces. Pour les échantillons CR801 et CR761, l'une des deux souches se branche avec les références d'*Encephalitozoon hellem*, et l'autre souche est divergente. Pour l'échantillon CR6233, les deux souches sont divergentes. Il est possible que l'animal ait été surinfecté par une autre souche sensiblement identique ou bien qu'il y ait une variation génétique du parasite au sein de son hôte (Henriques-Gil et al. 2010). Pour l'instant, la connaissance sur les parasites qui infectent les grands singes sauvages est encore très limitée, comme le montre la grande diversité des microsporidies amplifiées dans cette étude.

Pathogénicité des SIV chez les grands singes sauvages.

Afin de répondre à la question de la pathogénicité des SIV, nous avons cherché à évaluer si les grands singes sauvages, infectés par des SIV sont plus souvent porteurs de parasites, associés à une évolution vers le stade SIDA chez l'Homme. En effet, des études récentes ont montré que le SIVcpz pouvait être pathogène chez son hôte naturel, mais ces études ont été menées sur une communauté de chimpanzés *P.t.scheiwoelfurthii* habituées à l'Homme et sur un seul chimpanzé *P.t.troglodytes* captif naturellement infecté par le SIVcpzPtt. Ainsi, ces animaux ont pu faire l'objet d'un suivi clinique et biologique (Keele et al. 2009; Etienne et al. 2011).

Nos résultats ont révélé la présence de parasites digestifs, cryptosporidies et microsporidies, chez les chimpanzés et gorilles sauvages du Cameroun. Cependant, nous n'avons pas pu montrer de relation entre le statut SIV de l'animal et le portage de ces parasites.

Les espèces de cryptosporidies identifiées dans notre étude sont *cuniculus* et *ubiquitum*. La classification du genre *Cryptosporidium* ne cesse d'évoluer et les outils de biologie moléculaire permettent d'affiner ce classement. Une étude récente a réalisé des analyses phylogénétiques sur *Cryptosporidium cuniculus* et *Cryptosporidium hominis* et a montré qu'il n'y avait que 0,5% de différence entre ces deux espèces dans le gène de l'ARN ribosomal et aucune différence dans deux autres régions du génome (COWP et LIB13) (Robinson et al. 2010). Ainsi, *Cryptosporidium cuniculus* est proche de *Cryptosporidium hominis*. Or, l'espèce *Cryptosporidium hominis* est retrouvée fréquemment chez les patients au stade SIDA (Fayer et al. 2000). En revanche, aucune étude ne décrit *Cryptosporidium ubiquitum* chez des patients sidéens, cette espèce ayant semble-t-il une origine plus environnementale. Ainsi sur les deux souches de cryptosporidies retrouvées chez les chimpanzés, une seule souche (*Cryptosporidium cuniculus*) pourrait être la preuve d'un syndrome d'immunodéficience chez l'animal. En revanche, les deux souches (*Cryptosporidium cuniculus*) amplifiées chez des gorilles SIV négatifs pourraient suggérer que cette infection parasitaire ne soit pas associée au statut SIV. Cependant, nous ne pouvons pas totalement exclure une infection SIV chez ces gorilles car la détection du SIV avec le test sérologique INNO-LIA™ n'a pas été validée sur des échantillons de fèces de gorilles. En effet, le virus n'a peut-être pas été détecté à cause de la plus grande distance génétique du SIVgor, comparé au SIVcpz, par rapport aux antigènes du VIH-1 utilisés dans le test INNO-LIA™ (Van Heuverswyn et al. 2006).

Pour les microsporidies, seules les souches se branchant avec les séquences de référence pourraient confirmer une infection car les microsporidies les plus couramment retrouvées chez les personnes positives au VIH sont *Enterocytozoon bienewisi* ainsi que les trois espèces *Encephalitozoon intestinalis*, *cuniculi* et *hellem* (Girard et al. 2011; Sokolova et al. 2011). Les autres souches seraient considérées comme des souches environnementales. Ainsi, 6 échantillons forment un groupe avec les références d'*Encephalitozoon hellem* et 2 échantillons se branchent avec le genre *Encephalitozoon*. Les 8 échantillons proviennent d'un chimpanzé SIV positif, de 4 échantillons de chimpanzés SIV négatifs et de 3 échantillons de gorilles SIV négatifs.

Contraintes techniques.

Nous avons remarqué des limites dans notre technique PCR. En effet, pour un individu donné, nous possédions plusieurs échantillons et nous n'avons pas pu amplifier de parasites pour chaque échantillon. Il se peut que les échantillons aient été trop dégradés, faute de conservation (temps trop long à température ambiante sur le terrain) ou des fèces dont la fraîcheur dépasse les 24h. Il est possible également que l'extraction d'ADN parasitaire ne soit pas assez efficace. Dans une étude récente, pour l'extraction d'ADN parasitaire, les fèces étaient préalablement mélangées à des billes de verre (Sak et al. 2011a). Ce protocole permettrait d'augmenter la quantité d'ADN parasitaire en lysant davantage les cellules parasitaires et ainsi optimiser nos chances d'amplification.

Il serait très intéressant pour notre étude de savoir à quel stade de la maladie se trouve l'animal infecté par le SIV. En effet, la méthode non-invasive de collecte de fèces ne permet pas de connaître l'âge de l'animal, le délai depuis l'infection ou l'avancement de la maladie. Nous savons que pour le VIH chez l'Homme, il existe trois phases dans la maladie, la primo-infection qui se manifeste généralement par un syndrome grippal passager, puis une longue phase asymptomatique avant la phase SIDA et l'apparition des différentes maladies opportunistes. Ainsi, aucune donnée nous permet de savoir dans quelle phase se trouve l'animal infecté par le SIV.

Aussi, il serait utile d'obtenir des données supplémentaires lors de la collecte des fèces comme (i) estimer l'âge de l'individu en notant la taille des fèces ; (ii) identifier l'aspect afin de déceler une maladie éventuelle, si la fèces est diarrhéique ou si elle présente du sang ou des vers ; (iii) collecter des fèces dont la fraîcheur est estimée à moins de 24h afin de limiter le nombre d'échantillons dégradés ; (iv) noter les épisodes pluvieux car la saison des pluies a été associée à une recrudescence des cas de microsporidioses intestinales lors d'une enquête épidémiologique réalisée en Afrique sur une cohorte d'enfants atteints de diarrhées (Tumwine et al. 2002). Également, la prévalence des cryptosporidies serait plus élevée pendant les mois les plus chauds et les plus humides de l'année (de Oliveira-Silva et al. 2007).

Conclusion et Perspectives

Dans cette étude, nous avons confirmé la présence de SIV dans les populations de chimpanzés *P.t.troglodytes* vivant dans le sud-est du Cameroun. Nous avons également montré la présence de parasites intestinaux tels que cryptosporidies et microsporidies dans les fèces de grands singes sauvages du Cameroun. Parmi les microsporidies amplifiées, nous avons remarqué une grande diversité par rapport aux échantillons préalablement caractérisés. Cependant, nous n'avons pas montré de relation entre la présence de cryptosporidies et microsporidies, et le statut SIV de l'animal.

Ce travail sur la pathogénicité du SIV est important pour la compréhension de l'infection à VIH chez l'Homme et la dynamique hôte-virus. Cette étude présente également un grand intérêt pour la survie des grands singes. En effet, la surveillance de l'état de santé des chimpanzés et gorilles est cruciale car ce sont des espèces menacées de disparition non seulement par la destruction de leur habitat et la chasse mais également par différentes maladies.

Suite à cette étude, la question de la pathogénicité du SIV chez les grands singes sauvages reste en suspend. Mais ce travail s'inscrit dans un projet à long terme.

Tout d'abord, le géotypage, qui permet d'identifier les différents individus parmi les échantillons de fèces collectés, est à finaliser afin de connaître le nombre d'individus et obtenir la prévalence d'infection. De plus, grâce à cette technique de géotypage, le suivi d'individus sur plusieurs années est possible et permettrait de surveiller l'apparition de nouvelles infections et donc l'évolution d'une possible maladie. Comme nous l'avons constaté dans cette étude, nous avons pu identifier à nouveau deux individus (MBc-ID25 et MBc-ID109), 6 ans et 1 an après respectivement.

Ensuite, il serait intéressant de déterminer les infections parasitaires retrouvées dans le cadre de l'étude sur les chimpanzés de la sous-espèce *P.t.scheiwofurthii* dans le parc national de Gombé en Tanzanie. Ainsi cette comparaison pourrait nous aiguiller sur les espèces de parasites à rechercher en particulier.

Enfin, il faudrait élargir l'enquête à d'autres zones géographiques. En effet, nous avons constaté que les microsporidies amplifiées dans notre étude provenant d'échantillons de chimpanzés, de gorilles ou de petits singes se groupaient dans l'arbre phylogénétique et donc qu'il n'y avait pas de spécificité de l'hôte. Rechercher des microsporidies dans d'autres régions du Cameroun permettrait de savoir s'il y a une spécificité géographique. Aussi, afin d'étudier la pathogénicité du SIVgor chez les gorilles sauvages, il faudrait travailler dans une

région du Cameroun où des cas d'infection à SIVgor ont déjà été reportés comme dans le sud-ouest du Cameroun (Neel et al. 2010).

Dans cette étude pilote, nous avons pu évaluer la faisabilité et les contraintes des recherches d'infections parasitaires à cryptosporidies et microsporidies chez les grands singes sauvages. Ainsi, cette étude permettra d'améliorer les futures recherches sur un plus grand nombre de pathogènes ainsi que sur un plus grand nombre d'animaux SIV positifs et négatifs. Nous aurons également la possibilité d'effectuer un suivi régulier sur le long terme de ces populations.

Glossaire

Amibes : microorganismes unicellulaires qui font partie de la classe des rhizopodes.

Helminthe : nom de deux embranchements de vers, parasites d'organismes animaux et humains. Regroupent les Plathelminthes (vers plats comprenant les cestodes et les trématodes) et les Némathelminthes (vers ronds ou nématodes).

Méthode bayésienne : méthode de phylogénie basée sur le concept des probabilités postérieures (théorème de Bayes). Cette méthode ne recherche pas le « meilleur » arbre, mais un ensemble d'arbres potentiels pour les données considérées.

Monophylétique : un groupe monophylétique, ou clade, réunit tous les organismes qui partagent une même innovation évolutive.

Oocyste : œuf encapsulé de protozoaire.

Sympatrique : se dit d'espèces partageant une même aire géographique mais ne s'hybridant pas.

Thrombocytopénie : baisse du nombre de plaquettes sanguines.

Viande de brousse : viande d'animaux sauvages vendue sur les marchés.

Virémie : présence de virus dans le sang.

Bibliographie

100 références.

- Aghokeng, A. F., Ayouba, A., Mpoudi-Ngole, E., Loul, S., Liegeois, F., Delaporte, E. & Peeters, M. (2010) Extensive survey on the prevalence and genetic diversity of SIVs in primate bushmeat provides insights into risks for potential new cross-species transmissions. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* **10**: 386–396.
- Ahuka-Mundeke, S., Ayouba, A., Mbala-Kingebeni, P., Liegeois, F., Esteban, A., Lunguya-Metila, O., Demba, D., Bilulu, G., Mbenzo-Abokome, V., Inogwabini, B.-I., Muyembe-Tamfum, J.-J., Delaporte, E. & Peeters, M. (2011) Novel Multiplexed HIV/Simian Immunodeficiency Virus Antibody Detection Assay. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 2277–2286.
- Alves, R. R. N., Souto, W. M. S. & Barboza, R. R. D. (2010) Primates in traditional folk medicine: a world overview. *Mammal Review* **40**: 155–180.
- Apetrei, C., Gormus, B., Pandrea, I., Metzger, M., ten Haaft, P., Martin, L. N., Bohm, R., Alvarez, X., Koopman, G., Murphey-Corb, M., Veazey, R. S., Lackner, A. A., Baskin, G., Heeney, J. & Marx, P. A. (2004) Direct inoculation of simian immunodeficiency virus from sooty mangabeys in black mangabeys (*Lophocebus aterrimus*): first evidence of AIDS in a heterologous African species and different pathologic outcomes of experimental infection. *Journal of Virology* **78**: 11506–11518.
- Apetrei, C., Kaur, A., Lerche, N. W., Metzger, M., Pandrea, I., Hardcastle, J., Falkenstein, S., Bohm, R., Koehler, J., Traina-Dorge, V., Williams, T., Staprans, S., Plauche, G., Veazey, R. S., McClure, H., Lackner, A. A., Gormus, B., Robertson, D. L. & Marx, P. A. (2005) Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus SIVsm in U.S. primate centers unravels the origin of SIVmac and SIVstm. *Journal of Virology* **79**: 8991–9005.
- Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P. A., Hahn, B. H. & Sharp, P. M. (2003) Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* **300**: 1713.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868–871.
- CDC. (1993) From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **269**: 729–730.
- Chalmers, R. M., Elwin, K., Hadfield, S. J. & Robinson, G. (2011) Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 536–538.

- Chalmers, R. M., Robinson, G., Elwin, K., Hadfield, S. J., Xiao, L., Ryan, U., Modha, D. & Mallaghan, C. (2009) *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 829–830.
- Chapman, C. A. & Wrangham, R. W. (1993) Range use of the forest chimpanzees of Kibale: Implications for the understanding of chimpanzee social organization. *American Journal of Primatology* **31**: 263–273.
- Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L. & Alizon, M. (1986) Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**: 691–695.
- Cournaud, V., Abela, B., Pourrut, X., Mpoudi-Ngole, E., Loul, S., Delaporte, E. & Peeters, M. (2003) Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *Journal of Virology* **77**: 12523–12534.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M. & Gascuel, O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**: W465–469.
- Didier, E. S. (2005) Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* **94**: 61–76.
- Didier, E. S. & Weiss, L. M. (2006) Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* **19**: 485–492.
- Van Dooren, S., Switzer, W. M., Heneine, W., Goubau, P., Verschoor, E., Parekh, B., De Meurichy, W., Furley, C., Van Ranst, M. & Vandamme, A.-M. (2002) Lack of evidence for infection with simian immunodeficiency virus in bonobos. *AIDS Research and Human Retroviruses* **18**: 213–216.
- Etienne, L., Nerrienet, E., LeBreton, M., Bibila, G. T., Foupouapouognigni, Y., Rousset, D., Nana, A., Djoko, C. F., Tamoufe, U., Aghokeng, A. F., Mpoudi-Ngole, E., Delaporte, E., Peeters, M., Wolfe, N. D. & Ayouba, A. (2011) Characterization of a new simian immunodeficiency virus strain in a naturally infected *Pan troglodytes troglodytes* chimpanzee with AIDS related symptoms. *Retrovirology* **8**: 4.
- Etienne, L. & Peeters, M. (2010) Origine du VIH, une réussite émergentielle. *Virologie* **14**: 171–84.
- Fayer, R. (2004) *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* **126**: 37–56.
- Fayer, R. (2010) Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology* **124**: 90–97.
- Fayer, R., Morgan, U. & Upton, S. J. (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology* **30**: 1305–1322.

- Fayer, R., Santín, M. & Macarisin, D. (2010) *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology* **172**: 23–32.
- Gagneux, P., Wills, C., Gerloff, U., Tautz, D., Morin, P. A., Boesch, C., Fruth, B., Hohmann, G., Ryder, O. A. & Woodruff, D. S. (1999) Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 5077–5082.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**: 436–441.
- Gillespie, T. R., Lonsdorf, E. V., Canfield, E. P., Meyer, D. J., Nadler, Y., Raphael, J., Pusey, A. E., Pond, J., Pauley, J., Mlengeya, T. & Travis, D. A. (2010) Demographic and ecological effects on patterns of parasitism in eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Gombe National Park, Tanzania. *American Journal of Physical Anthropology* **143**: 534–544.
- Gillespie, T. R., Morgan, D., Deutsch, J. C., Kuhlenschmidt, M. S., Salzer, J. S., Cameron, K., Reed, T. & Sanz, C. (2009) A legacy of low-impact logging does not elevate prevalence of potentially pathogenic protozoa in free-ranging gorillas and chimpanzees in the Republic of Congo: logging and parasitism in African apes. *EcoHealth* **6**: 557–564.
- Gillespie, T. R., Nunn, C. L. & Leendertz, F. H. (2008) Integrative approaches to the study of primate infectious disease: implications for biodiversity conservation and global health. *American Journal of Physical Anthropology* **Suppl 47**: 53–69.
- Girard, P.-M., Katlama, C. & Pialoux, G. (2011) *VIH*. Doin Editions.
- Goldberg, T. L., Gillespie, T. R., Rwego, I. B., Wheeler, E., Estoff, E. L. & Chapman, C. A. (2007) Patterns of gastrointestinal bacterial exchange between chimpanzees and humans involved in research and tourism in western Uganda. *Biological Conservation* **135**: 511–517.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 221–224.
- Graczyk, T. K., Bosco-Nizeyi, J., da Silva, A. J., Moura, I. N. S., Pieniazek, N. J., Cranfield, M. R. & Lindquist, H. D. A. (2002) A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitology Research* **88**: 926–931.
- Graczyk, T. K., DaSilva, A. J., Cranfield, M. R., Nizeyi, J. B., Kalema, G. R. & Pieniazek, N. J. (2001) *Cryptosporidium parvum* genotype 2 infections in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Parasitology Research* **87**: 368–370.

- Groves, C. (2001) *Primate Taxonomy*. Smithsonian Books.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696–704.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. & Sharp, P. M. (2000) AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**: 607–614.
- Henriques-Gil, N., Haro, M., Izquierdo, F., Fenoy, S. & del Aguila, C. (2010) Phylogenetic approach to the variability of the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* and its implications for inter- and intrahost transmission. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 3333–3342.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Neel, C., Lafay, B., Keele, B. F., Shaw, K. S., Takehisa, J., Kraus, M. H., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Yangda, B., Sharp, P. M., Mpoudi-Ngole, E., Delaporte, E., Hahn, B. H. & Peeters, M. (2007) Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* **368**: 155–171.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Delaporte, E., Hahn, B. H. & Peeters, M. (2006) Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* **444**: 164.
- Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H. & Johnson, P. R. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**: 389–392.
- Howells, M. E., Pruetz, J. & Gillespie, T. R. (2011) Patterns of gastro-intestinal parasites and commensals as an index of population and ecosystem health: the case of sympatric western chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) and guinea baboons (*Papio hamadryas papio*) at Fongoli, Senegal. *American Journal of Primatology* **73**: 173–179.
- Ishikawa, K., Janssens, W., Banor, J. S., Shinno, T., Piedade, J., Sata, T., Ampofo, W. K., Brandful, J. A., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Canas-Ferreira, W. F., Adu-Sarkodie, Y. & Kurata, T. (2001) Genetic analysis of HIV type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses* **17**: 1661–1663.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059–3066.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T. & Rinder, H. (1996) Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine & International Health* **1**: 373–378.
- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F. Y., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M. & Hahn, B. H. (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**: 523–526.

- Keele, B. F., Jones, J. H., Terio, K. A., Estes, J. D., Rudicell, R. S., Wilson, M. L., Li, Y., Learn, G. H., Beasley, T. M., Schumacher-Stankey, J., Wroblewski, E., Mosser, A., Raphael, J., Kamenya, S., Lonsdorf, E. V., Travis, D. A., Mlengeya, T., Kinsel, M. J., Else, J. G., Silvestri, G., Goodall, J., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Pusey, A. E. & Hahn, B. H. (2009) Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* **460**: 515–519.
- van der Kuyl, A. C., Kuiken, C. L., Dekker, J. T. & Goudsmit, J. (1995) Phylogeny of African monkeys based upon mitochondrial 12S rRNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* **40**: 173–180.
- Köndgen, S., Kühl, H., N’Goran, P. K., Walsh, P. D., Schenk, S., Ernst, N., Biek, R., Formenty, P., Mätz-Rensing, K., Schweiger, B., Junglen, S., Ellerbrok, H., Nitsche, A., Briese, T., Lipkin, W. I., Pauli, G., Boesch, C. & Leendertz, F. H. (2008) Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Current Biology: CB* **18**: 260–264.
- Leroy, E. M., Rouquet, P., Formenty, P., Souquière, S., Kilbourne, A., Froment, J.-M., Bermejo, M., Smit, S., Karesh, W., Swanepoel, R., Zaki, S. R. & Rollin, P. E. (2004) Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science* **303**: 387–390.
- De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P. & Willems, B. (1990) Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *Journal of Virology* **64**: 1207–1216.
- Ling, B., Apetrei, C., Pandrea, I., Veazey, R. S., Lackner, A. A., Gormus, B. & Marx, P. A. (2004) Classic AIDS in a sooty mangabey after an 18-year natural infection. *Journal of Virology* **78**: 8902–8908.
- Liu, W., Yingying, L., Peeters, M., Rayner, J., Sharp, P., Shaw, G. & Hahn, B. H. (2010) Single genome amplification and direct amplicon sequencing of Plasmodium spp. DNA from ape fecal specimens. *Protocol Exchange*.
- Locatelli, S. & Peeters, M. (2012) Cross-species transmission of simian retroviruses. *AIDS* **26**: 659–673.
- Mathis, A., Weber, R. & Deplazes, P. (2005) Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* **18**: 423–445.
- Murray, S., Stem, C., Boudreau, B. & Goodall, J. (2000) Intestinal parasites of baboons (*Papio cynocephalus anubis*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*) in Gombe National Park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians* **31**: 176–178.
- Navidi, W., Arnheim, N. & Waterman, M. S. (1992) A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *American Journal of Human Genetics* **50**: 347–359.

- Neel, C., Etienne, L., Li, Y., Takehisa, J., Rudicell, R. S., Bass, I. N., Moudindo, J., Mebenga, A., Esteban, A., Van Heuverswyn, F., Liegeois, F., Kranzusch, P. J., Walsh, P. D., Sanz, C. M., Morgan, D. B., Ndjango, J.-B. N., Plantier, J.-C., Locatelli, S., Gonder, M. K., Leendertz, F. H., Boesch, C., Todd, A., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., Hahn, B. H. & Peeters, M. (2010) Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. *Journal of Virology* **84**: 1464–1476.
- de Oliveira-Silva, M. B., de Oliveira, L. R., Resende, J. C. P., Peghini, B. C., Ramirez, L. E., Lages-Silva, E. & Correia, D. (2007) Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* **40**: 512–515.
- Peeters, M., Courgnaud, V., Abela, B., Auzel, P., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Liegeois, F., Butel, C., Koulagna, D., Mpoudi-Ngole, E., Shaw, G. M., Hahn, B. H. & Delaporte, E. (2002) Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 451–457.
- Peeters, M., Fransen, K., Delaporte, E., Van den Haesevelde, M., Gershy-Damet, G. M., Kestens, L., van der Groen, G. & Piot, P. (1992) Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* **6**: 447–451.
- Peeters, M., Honoré, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R. W. & Delaporte, E. (1989) Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* **3**: 625–630.
- Peeters, M., Toure-Kane, C. & Nkengasong, J. N. (2003) Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* **17**: 2547–2560.
- Perrière, G. & Gouy, M. (1996) WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* **78**: 364–369.
- Petrzelková, K. J., Hasegawa, H., Appleton, C. C., Huffman, M. A., Archer, C. E., Moscovice, L. R., Mapua, M. I., Singh, J. & Kaur, T. (2010) Gastrointestinal parasites of the chimpanzee population introduced onto Rubondo Island National Park, Tanzania. *American Journal of Primatology* **72**: 307–316.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L. & Simon, F. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine* **15**: 871–872.
- Pourrut, X., Diffo, J. L. D., Somo, R. M., Bilong Bilong, C. F., Delaporte, E., LeBreton, M. & Gonzalez, J. P. (2011) Prevalence of gastrointestinal parasites in primate bushmeat and pets in Cameroon. *Veterinary Parasitology* **175**: 187–191.
- Pourrut, X., Sarfati, C., Liguory, O., Moyou-Somo, R. & Derouin, F. (2002) Search for *Enterocytozoon bienersi* infection in wild monkeys in Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **96**: 56–57.

- Prince, A. M., Brotman, B., Lee, D.-H., Andrus, L., Valinsky, J. & Marx, P. (2002) Lack of evidence for HIV type 1-related SIVcpz infection in captive and wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in West Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses* **18**: 657–660.
- Raynaud, L., Delbac, F., Broussolle, V., Rabodonirina, M., Girault, V., Wallon, M., Cozon, G., Vivares, C. P. & Peyron, F. (1998) Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 37–40.
- Robinson, G., Wright, S., Elwin, K., Hadfield, S. J., Katzer, F., Bartley, P. M., Hunter, P. R., Nath, M., Innes, E. A. & Chalmers, R. M. (2010) Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology* **40**: 1539–1548.
- Rudicell, R. S., Piel, A. K., Stewart, F., Moore, D. L., Learn, G. H., Li, Y., Takehisa, J., Pintea, L., Shaw, G. M., Moore, J., Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (2011) High Prevalence of Simian Immunodeficiency Virus Infection in a Community of Savanna Chimpanzees. *Journal of Virology* **85**: 9918–9928.
- Rwego, I. B., Isabirye-Basuta, G., Gillespie, T. R. & Goldberg, T. L. (2008) Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology* **22**: 1600–1607.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- Sak, B., Kvác, M., Petrzelková, K., Kvetonová, D., Pomajbíková, K., Mulama, M., Kiyang, J. & Modry, D. (2011a) Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in european zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitologica* **58**: 81–86.
- Sak, B., Kvác, M., Kucerová, Z., Kvetonová, D. & Saková, K. (2011b) Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**: e1162.
- Santiago, M. L., Lukasik, M., Kamenya, S., Li, Y., Bibollet-Ruche, F., Bailes, E., Muller, M. N., Emery, M., Goldenberg, D. A., Lwanga, J. S., Ayouba, A., Nerrienet, E., McClure, H. M., Heeney, J. L., Watts, D. P., Pusey, A. E., Collins, D. A., Wrangham, R. W., Goodall, J., Brookfield, J. F. Y., Sharp, P. M., Shaw, G. M. & Hahn, B. H. (2003) Foci of endemic simian immunodeficiency virus infection in wild-living eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *Journal of Virology* **77**: 7545–7562.
- Santiago, M. L., Rodenburg, C. M., Kamenya, S., Bibollet-Ruche, F., Gao, F., Bailes, E., Meleth, S., Soong, S.-J., Kilby, J. M., Moldoveanu, Z., Fahey, B., Muller, M. N., Ayouba, A., Nerrienet, E., McClure, H. M., Heeney, J. L., Pusey, A. E., Collins, D. A., Boesch, C., Wrangham, R. W., Goodall, J., Sharp, P. M., Shaw, G. M. & Hahn, B. H. (2002) SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* **295**: 465.

- Sestak, K., Aye, P. P., Buckholt, M., Mansfield, K. G., Lackner, A. A. & Tzipori, S. (2003) Quantitative evaluation of *Enterocytozoon bieneusi* infection in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Journal of Medical Primatology* **32**: 74–81.
- Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (2010) The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **365**: 2487–2494.
- Silvestri, G., Paiardini, M., Pandrea, I., Lederman, M. M. & Sodora, D. L. (2007) Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *The Journal of Clinical Investigation* **117**: 3148–3154.
- Silvestri, G., Sodora, D. L., Koup, R. A., Paiardini, M., O’Neil, S. P., McClure, H. M., Staprans, S. I. & Feinberg, M. B. (2003) Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* **18**: 441–452.
- Simon, V., Ho, D. D. & Abdool Karim, Q. (2006) HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* **368**: 489–504.
- Simon, F., Maucière, P., Roques, P., LouSSERT-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barré-Sinoussi, F. & Brun-Vézinet, F. (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine* **4**: 1032–1037.
- Sleeman, J. M., Meader, L. L., Mudakikwa, A. B., Foster, J. W. & Patton, S. (2000) Gastrointestinal parasites of mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) in the Parc National des Volcans, Rwanda. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians* **31**: 322–328.
- Sobottka, I., Albrecht, H., Schottelius, J., Schmetz, C., Bentfeld, M., Laufs, R. & Schwartz, D. A. (1995) Self-limited traveller’s diarrhea due to a dual infection with *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium parvum* in an immunocompetent HIV-negative child. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* **14**: 919–920.
- Sokolova, O. I., Demyanov, A. V., Bowers, L. C., Didier, E. S., Yakovlev, A. V., Skarlato, S. O. & Sokolova, Y. Y. (2011) Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 2102–2108.
- Souquière, S., Bibollet-Ruche, F., Robertson, D. L., Makuwa, M., Apetrei, C., Onanga, R., Kornfeld, C., Plantier, J. C., Gao, F., Abernethy, K., White, L. J., Karesh, W., Telfer, P., Wickings, E. J., Maucière, P., Marx, P. A., Barré-Sinoussi, F., Hahn, B. H., Müller-Trutwin, M. C. & Simon, F. (2001) Wild *Mandrillus sphinx* are carriers of two types of lentivirus. *Journal of Virology* **75**: 7086–7096.
- Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton, C. P. & Gill, P. (1993) A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* **15**: 636–638, 640–641.

- Switzer, W. M., Parekh, B., Shanmugam, V., Bhullar, V., Phillips, S., Ely, J. J. & Heneine, W. (2005) The epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in a large number of wild- and captive-born chimpanzees: evidence for a recent introduction following chimpanzee divergence. *AIDS Research and Human Retroviruses* **21**: 335–342.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. & Bouvet, J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**: 3189–3194.
- Takehisa, J., Kraus, M. H., Ayoub, A., Bailes, E., Van Heuverswyn, F., Decker, J. M., Li, Y., Rudicell, R. S., Learn, G. H., Neel, C., Ngole, E. M., Shaw, G. M., Peeters, M., Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (2009) Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *Journal of Virology* **83**: 1635–1648.
- Talavera, G. & Castresana, J. (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* **56**: 564–577.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876–4882.
- Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, D. E., Buckholt, M. A. & Tzipori, S. (2002) *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**: 299–303.
- Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., Kaptué, L., Gürtler, L. G., McArthur, C. P., Devare, S. G. & Brennan, C. A. (2010) Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Research and Human Retroviruses* **26**: 109–115.
- Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptué, L., Ndembi, N., Gürtler, L., Devare, S. & Brennan, C. A. (2011) Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of Virology* **85**: 1403–1407.
- Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Mougnotou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, F., Laurent, C., Butel, C., Zekeng, L., Delaporte, E. & Peeters, M. (2003) Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology* **310**: 254–266.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., Fayer, R. & Lal, A. A. (1999) Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1578–1583.
- Xiao, L. & Fayer, R. (2008) Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology* **38**: 1239–1255.

van Zijll Langhout, M., Reed, P. & Fox, M. (2010) Validation of multiple diagnostic techniques to detect *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in free-ranging western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and observations on the prevalence of these protozoan infections in two populations in Gabon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians* **41**: 210–217.

Posters :

Ahuka-Mundeke, S., Mbala, P., Liegeois, F., Ayouba, A., Demba, D., Mbenzo, V., Inogwabini, B.-I., Muyembe J.-J., Delaporte, E. & Peeters, M. (2011) Prevalence and Molecular Characterization of new Simian retroviruses and Assessment of human transmission risk in the Democratic Republic of Congo. *18th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections*, Boston, USA. Poster #452.

Li, Y., Ndjango, J.-B., Learn, G., Robertson, J., Takehisa, J., Bibollet-Ruche, F., Sharp, P., Worobey, M., Shaw, G. & Hahn, B. H. (2010) Molecular Epidemiology of Simian Immunodeficiency Virus in Eastern Chimpanzees and Gorillas. *17th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections*, San Francisco, USA. Poster #440.

Références Internet :

<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, consulté le 27 octobre 2011.

<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, consulté le 27 octobre 2011.

<http://www.lgcstandards-atcc.org/>, consulté le 9 mai 2011.

<http://www.phylogeny.fr/>, consulté le 27 octobre 2011.

<http://www.primate-sg.org/diversity.htm>, consulté le 2 décembre 2011.

<http://www.unaids.org/fr/>, consulté le 23 janvier 2012.

Recherche de parasites intestinaux, communément associés à un stade d'immunodéficience chez l'Homme, dans des populations de grands singes sauvages infectés ou non par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV)

Christelle BUTEL

Montpellier, le 14 juin 2012

RÉSUMÉ

Les primates non-humains africains sont naturellement infectés par différents virus de l'immunodéficience simienne (SIV) qui ont franchi la barrière de l'espèce à plusieurs occasions et sont à l'origine du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Contrairement au VIH qui entraîne chez l'Homme, un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et a déjà causé des millions de morts, le SIV n'était pas pathogène chez son hôte naturel. Cependant, deux études sur des chimpanzés habitués à l'Homme viennent de remettre en cause ce paradigme en démontrant un stade SIDA chez les animaux infectés par le SIV. Afin de répondre à la question de la pathogénicité du SIV chez les grands singes sauvages du Cameroun, nous avons recherché dans leurs fèces la présence de cryptosporidies et microsporidies, parasites intestinaux associés à un stade SIDA chez l'Homme. Les résultats ont indiqué la présence de ces parasites, mais nous n'avons pas pu montrer de relation directe entre le statut SIV de l'animal et la contamination parasitaire. Nous avons également remarqué une grande diversité génétique chez les microsporidies amplifiées. Cette étude a permis d'évaluer la faisabilité et les contraintes des recherches d'infections parasitaires chez les grands singes sauvages et a ouvert la voie à de futures recherches.

Mots clés : SIV - VIH - microsporidies - cryptosporidies - chimpanzés - gorilles - Cameroun - pathogénicité

SUMMARY

African nonhuman primates are naturally infected with various simian immunodeficiency virus (SIV) that have crossed the species barrier on several occasions and generated human immunodeficiency virus (HIV). Unlike HIV which causes in humans, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and has already caused millions of deaths, the SIV was not pathogenic in its natural host. However, two studies on habituated chimpanzees challenges this paradigm by demonstrating a AIDSlike in animals infected with SIV. To answer the question of pathogenicity of SIV in wild apes in Cameroon, we investigated the presence in their faeces of cryptosporidium and microsporidia, intestinal parasites associated with a AIDS in humans. The results indicated the presence of these parasites, but we have not been able to show a direct relationship between SIV status of the animal and parasite contamination. We also found a high genetic diversity among microsporidia amplified. This study assessed the feasibility and limitations of research parasitic infections in wild apes and paved the way for future research.

Key words : SIV - HIV - microsporidia - cryptosporidium - chimpanzee - gorilla - Cameroon - pathogenicity