

UNIVERSITE
POLYTECHNIQUE DE
BOBO-DIOULASSO
(UPB)

N° d'ordre :.....
CENTRE INTERNATIONAL DE
RECHERCHE-DEVELOPPEMENT DE
L'ELEVAGE EN ZONE SUBHUMIDE
(CIRDES)

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT
RURAL
(IDR)

UNITE DE RECHERCHES SUR
LES BASES BIOLOGIQUES DE
LA LUTTE INTEGREE
(URBIO)



DEA-3

1004

KAB

MEMOIRE

Présenté par :

Jacques KABORE
Maître ès sciences



Pour l'obtention du :

**Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Biologie Appliquée et
Modélisation des Systèmes Biologiques**

THEME :

**ADAPTATION DE NOUVELLES SOUCHES
D'EHRLICHIA RUMINANTIUM EN CULTURE IN
VITRO ET EVALUATION DE LA COMPETENCE
VECTORIELLE DES GLOSSINES VIS-A-VIS DES
TRYPANOSOMES PATHOGENES**

Soutenu le 22 février 2007, devant le jury :

Président : Pr. VIGUIER Martinez Marie-Claude, Université Polytechnique de Bobo

Membres : Pr. OUEDRAOGO Georges-Anicet, Université Polytechnique de Bobo
Pr. OUEDRAOGO Jean-Bosco, Enseignant-chercheur, IRSS/Bobo
Dr. SIDIBE Issa, Maître de stage, CIRDES

DEDICACE

Ce mémoire est dédié :

A mon très cher regretté père, Gabriel T. KABORE ;

A ma très chère mère, Rosalie ILBOUDO ;

A mes frères et sœurs ;

A toute la famille KABORE !

*Je ferai toujours votre fierté comme vous le souhaitez et recevez ici mes
sincères reconnaissances pour vos prières et multiples soutiens.*

REMERCIEMENTS

Ces travaux entrant dans le cadre de notre stage de DEA ont été réalisés grâce à l'effort consenti par plusieurs bonnes volontés. Ainsi, qu'elles retrouvent ici notre profonde gratitude. Nous tenons à remercier :

Les membres du jury, pour avoir accepté de juger ce travail.

Le Pr. Abdoulaye GOURO, Directeur général du CIRDES, qui a bien voulu nous accepter au sein de son institution.

Le Dr. Issa SIDIBE, notre maître de stage et Directeur scientifique du CIRDES, pour nous avoir proposé ce thème, et l'encadrement d'ordre divers dont nous avons bénéficié. Malgré vos diverses activités administratives et scientifiques, vous avez toujours été disponible à nous encadrer, à nous soutenir sur tous les plans. Merci Dr, nous vous en sommes infiniment reconnaissant.

Le Pr. Adrien Marie Gaston BELEM de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, notre directeur de mémoire pour avoir accepté de nous encadrer sans même nous connaître auparavant. Nous vous remercions car vous avez cru à nos compétences.

Le Dr. Zakaria BENGALY, notre co-maître de stage, Parasitologiste-chercheur et Chef de l'Unité de Recherche sur les Bases biologiques de la lutte Intégrée (URBIO), pour avoir suivi de bout en bout nos travaux, à notre encadrement et aussi pour votre disponibilité à notre égard.

Le Dr. El Hadj. Hassane ADAKAL, notre co-maître de stage, Responsable de la section Tiques et Maladies Associées au CIRDES, pour l'encadrement dont nous avons bénéficié dans le domaine de la cowdriose, des tiques et des maladies associées aux tiques.

Le Dr. Vincent JAMONNEAU, Chercheur de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) au CIRDES, pour nous avoir initié à la culture *in vitro* des trypanosomes.

Le Dr. Jérémy BOUYER, Chercheur en écologie des vecteurs du Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD/UR16), Responsable de l'Unité de Recherche sur l'Elevage et l'Environnement (UREEN) au CIRDES, nous vous remercions pour la documentation.

Les Dr, David BERTHIER et Philippe HOLZMULLER du CIRAD, pour nous avoir initié à la culture *in vitro* des monocytes de vaches.

Le Dr. Augustin Ziro BANCE, Responsable de la cellule de communication au CIRDES, pour ses multiples conseils et encouragements dont nous avons bénéficié.

Les Dr, Essodina TALAKI, Balabadi DAO, Charles DAYO pour tous ces moments de recherche que nous avons passé ensemble.

Les techniciens **Maurice KONKOBO, Hassane SAKANDE, Guy SANOU, Céné BILLA, Félix SANOU, Mathias ZERBO, Léopold MILLOGO, Wilfried YONI, Sébastien ZOUNGRANA, Adrien ZOUNGRANA, Souleymane SYLLA, Saïdou BOLY, Sami KAM** pour nous avoir dirigé dans nos travaux au laboratoire, à l'animalerie, à l'insectarium et à l'étable.

Nous remercions aussi les autres techniciens, pour leur participation d'une part ou d'une autre dans la réalisation de ces travaux.

A tous les stagiaires du CIRDES, mes collègues, camarades et amis (es), retrouvez ici ma parfaite considération.

A tous mes enseignants de l'Institut du Développement Rural (IDR) à l'Université Polytechnique de Bobo (UPB) et de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR/SVT) à l'Université de Ouagadougou.

A la 1^{ère} promotion "2006" des Etudiants du DEA de Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques.

A tout le personnel du CIRDES pour le soutien dont nous avons bénéficié pendant notre stage.

A tous ceux dont les noms n'ont pu être cités, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Merci Seigneur Jésus-Christ !

SOMMAIRE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
SOMMAIRE	iv
SIGLES ET ABREVIATIONS	vi
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	vii
LISTE DES ANNEXES	vii
RESUME	viii
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : <i>EHRlichia RUMINANTIUM</i>	4
I. Définition	4
II. Classification ou taxonomie	4
III. Morphologie et cycle de développement	5
IV. Diversité antigénique et génétique d' <i>Ehrlichia ruminantium</i>	5
V. Culture <i>in vitro</i>	6
VI. Symptômes et lésions de la cowdriose	6
VI. 1. Symptômes	6
VI. 2. Lésions	7
VII. Diagnostic	8
VII. 1. Diagnostic parasitologique	8
VII. 2. Diagnostic sérologique	9
VII. 3. Diagnostic moléculaire	9
VIII. Epidémiologie de la cowdriose	10
IX. Méthodes de lutte	11
IX. 1. Traitement	11
IX. 2. Vaccination	11
CHAPITRE II : GLOSSINES	12
I. Définition	12
II. Classification ou taxonomie	12
III. Anatomie externe de la glossine	12
IV. Anatomie interne et physiologie de la glossine	13
IV. 1. Le système digestif	13
IV. 2. Digestion	13
V. Les trypanosomes	14
V. 1. Définition	14
V. 2. Classification	14
V. 3. Morphologie et cycle biologique du parasite	14
V. 3. 1. Chez la glossine	14
V. 3. 2. Chez l'hôte mammifère	15
VI. Compétence vectorielle des glossines	16
VII. Lutte anti-vectorielle	16
VIII. Culture <i>in vivo</i> des trypanosomes	17
IX. Symptômes	17
X. Diagnostic	17
XI. Prévention et traitement	18

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE -----	19
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES -----	20
I. Matériels biologiques -----	20
I. 1. Souches d'<i>Ehrlichia ruminantium</i> -----	20
I. 2. Souches de trypanosomes -----	20
I. 3. Glossines -----	20
I. 4. Animaux d'expérience -----	21
I. 4. 1. Rats -----	21
I. 4. 2. Moutons -----	21
II. Matériels de laboratoire -----	21
III. Méthodes -----	21
III. 1. Base de données Access -----	21
III. 2. Tests de viabilité -----	22
III. 3. Culture <i>in vitro</i> des souches d'<i>Ehrlichia ruminantium</i> -----	22
III. 4. Confection de doses infectantes pour les challenges -----	23
III. 5. Culture <i>in vivo</i> de souches de trypanosomes sur des rats -----	23
III. 6. Infection et alimentation des glossines -----	23
III. 7. Dissection des glossines -----	24
III. 8. Infection des moutons -----	24
III. 9. Traitement de données -----	25
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION -----	26
I. Résultats -----	26
I. 1. Base de données Access -----	26
I. 2. Culture de souches d'<i>Ehrlichia ruminantium</i> -----	26
I. 2. 1. Viabilité des souches -----	26
I. 2. 2. Culture <i>in vitro</i> -----	28
I. 3. Confection des doses de challenge -----	28
I. 4. Culture <i>in vivo</i> des trypanosomes -----	30
I. 5. Compétence vectorielle -----	30
I. 5. 1. Dissection des glossines -----	30
I. 5. 1. 1. Relation parasitisme et sexe de la glossine -----	30
I. 5. 1. 2. Espèces de trypanosomes parasitant les glossines mâles -----	31
I. 5. 1. 3. Espèces de trypanosomes parasitant les glossines femelles -----	32
I. 5. 2. Infection des moutons -----	32
II. Discussion -----	33
II. 1. Culture de souches d'<i>Ehrlichia ruminantium</i> -----	33
II. 2. Confection des doses de challenge -----	33
II. 3. Culture <i>in vivo</i> des trypanosomes -----	34
II. 4. Compétence vectorielle -----	34
II. 4. 1. Taux d'infection -----	34
II. 4. 2. Relation parasitisme et sexe de la glossine -----	35
II. 4. 3. La transmission du trypanosome -----	36
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS -----	37
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	38
ANNEXES -----	I

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
BAEC	: Bovine Aortic Endothelial Cell
BUEC	: Bovine Umbilical Endothelial Cell
CIRAD	: Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CIRDES	: Centre International de Recherche-Développement de l'Elevage en zone Subhumide
DEA	: Diplôme d'Etudes Approfondies
<i>E.ruminantium</i>	: <i>Ehrlichia ruminantium</i>
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>G.p.gambiensis</i>	: <i>Glossina palpalis gambiensis</i>
IDR	: Institut de Développement Rural
IFA	: Indirect fluorescence antigen
IgG	: Immunoglobuline G
IRD	: Institut de Recherche pour le Développement
<i>MAPIB</i>	: Major Antigenic Protein 1 B
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PPR	: Pourcentage de positivité relative
RLOs	: Rickettsie-like organisms
SVF	: Sérum de veau fœtal
<i>T.brucei</i>	: <i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T.congolense</i>	: <i>Trypanosoma congolense</i>
<i>T.vivax</i>	: <i>Trypanosoma vivax</i>
TAA	: Trypanosomoses animales africaines
URBIO	: Unité de recherche sur les bases biologiques de la lutte intégrée
VSG	: Variable Surface Glycoprotein

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : L'appareil digestif de la glossine (Laveissière et <i>al.</i> , 2000).....	13
Figure 2 : Evolution thermique des moutons.	27
Figure 3 : Amas de <i>cowdria</i> & Figure 4 : Tapis de BUEC	28
Figure 5 : Evolution des températures moyennes par groupe d'animaux infectés.....	29
Tableau I : Récapitulatif des résultats de l'hyperthermie, des frottis et de l'ELISA des sept (7) moutons.-----	27
Tableau II : Températures, durée d'isolement et de mise en culture des souches-----	28
Tableau III : Résultats des doses de challenge avec la souche <i>BK 242</i> -----	29
Tableau IV : Infection des glossines par les 3 espèces de trypanosome-----	30
Tableau V : Résultats du suivi infectieux des 3 moutons -----	32

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Composition du milieu de culture Glasgow (BHK21 (5x)) pour 500 ml-----	I
Annexe II : Préparation des solutions pour milieu de culture cellulaire Glasgow BHK 21 -----	I
Annexe III : Culture de cellules endothéliales bovines : -----	II
Annexe IV : Isolement des souches de <i>Cowdria</i> -----	III
Annexe V : Multiplication des cellules endothéliales (Repiquage ou trypsination) -----	IV
Annexe VI : Protocole pour aliquots d' <i>Ehrlichia ruminantium</i> -----	IV
Annexe VII : Epreuve ELISA-indirect pour la détection d'anticorps anti- <i>cowdria sp</i> à l'aide d'antigènes recombinants rec- <i>MAP 1B</i> -----	V
Annexe VIII : Matériels de laboratoire utilisés -----	VI
Annexe IX : Figures-----	VII

RESUME

L'éhrlichiose des ruminants (cowdriose) et les trypanosomoses animales africaines sont des maladies à transmissions vectorielles. La cowdriose est due à *Ehrlichia ruminantium*. Il existe une grande diversité antigénique au sein de cette espèce qui empêche la mise au point d'un vaccin efficace. Les glossines sont les vrais vecteurs biologiques des trypanosomoses animales. L'objectif de cette étude est d'une part, d'étudier les conditions d'isolement d'*Ehrlichia ruminantium in vitro* et d'autre part, d'étudier la compétence vectorielle des glossines d'élevage du CIRDES en vue de leur éradication sur le terrain par la Technique de l'Insecte Stérile (TIS). Cette étude nous a permis d'isoler les souches d'*Ehrlichia* BK433S (E055), BK242/P/S ; de déterminer la dose de challenge qui est la dilution 1/50^{ème} et d'évaluer les taux d'infection des glossines vis-à-vis de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei*. *Glossina morsitans submorsitans*, *Glossina palpalis gambiensis* et *Glossina tachinoïdes* ténérales ont été infectées *in vitro* sur du sang de rats atteints de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* par l'intermédiaire d'une membrane de silicone. Les glossines ont été maintenues sur du sang sain de bœuf ou de porc défibriné et ce, après une trentaine de jours. Une vingtaine de glossines furent disséquées afin de déterminer les taux d'infection. Nos résultats montrent que la proportion de glossines infectées par *T. vivax* est élevée par rapport à celle des glossines infectées par *T. brucei* que par *T. congolense*. Ces résultats révèlent aussi une inégalité des taux d'infection entre mâles et femelles. Par contre, les résultats globaux montrent que les mâles sont plus susceptibles que les femelles. Les mâles et femelles de *Glossina morsitans submorsitans* infectées par *T. vivax* et les mâles de *Glossina morsitans submorsitans* infectées par *T. congolense* ont été appliquées à des moutons. Ces glossines infectées ont pu assurer l'installation, la multiplication, la maturation des trypanosomes en leur sein : ces glossines sont alors compétentes à transmettre l'infection. Puis, elles sont arrivées à transmettre les trypanosomes. Ainsi, malgré tous les facteurs divers, ces glossines ont préservé leur compétence vectorielle.

Mots clés : Adaptation, *Ehrlichia ruminantium*, Culture *in vitro*, Compétence vectorielle, Glossines, Trypanosomes pathogènes.

INTRODUCTION

L'ehrlichiose des ruminants encore appelée cowdriose, et les trypanosomoses animales africaines (TAA) sont des maladies à transmission vectorielle. Elles demeurent les principaux obstacles au développement de l'élevage, des gros et petits ruminants dans les zones où elles sévissent.

La cowdriose est présente dans la plupart des pays de l'Afrique au sud du Sahara, dans plusieurs îles caraïbéennes d'où elle menace le continent américain par la présence de tiques du genre *Amblyomma* qui pourraient agir en tant que vecteurs (Provost et Bezuidenhout, 1987). Au Burkina Faso, la cowdriose a été identifiée pour la première fois en 1984 chez des bovins de race laitière, importés d'Europe (Stachurski, 2001). Elle est due à *Ehrlichia ruminantium*, une rickettsie intracellulaire stricte appartenant à la famille des *Anaplasmatacea*. La variabilité antigénique au sein de cette espèce entraîne une absence de protection croisée entre certains isolats d'où la difficulté d'élaborer un vaccin efficace contre toutes les souches. Dans ces conditions, la mise au point d'un vaccin universel passe forcément par une meilleure connaissance de l'étendue de la diversité, d'où l'importance de l'isolement *in vitro* des souches d'intérêt à des fins d'études génomiques, d'épidémiologie, de diagnostic.

De même, la trypanosomose animale, dénommée Nagana chez les ruminants domestiques, sévit sous forme enzootique dans toutes les régions d'Afrique infestées par les glossines, couvrant près de 10 millions de Km², entre 15° de latitude nord et 20° de latitude sud, soit un tiers du continent africain (Authié et al., 1999). Elle est provoquée par la multiplication dans le plasma sanguin, la lymphe et divers tissus, d'un protozoaire flagellé appartenant à la famille des *Trypanosomatidae* et au genre *Trypanosoma*, le trypanosome. Ce dernier est transmis par les glossines ou mouches tsé-tsé et est responsable de la maladie du sommeil chez l'homme et de la trypanosomose animale africaine. Les glossines assurent l'essentiel des transmissions parasitaires dans les trypanosomoses, raison pour laquelle la lutte anti-vectorielle contre elles est très prédominante dans les stratégies d'interventions de ces affections. Les connaissances sur la biologie de ces insectes ont permis la mise en œuvre de nouvelles méthodes de lutte telle que la technique de l'insecte stérile (TIS). La TIS consiste à lâcher, de façon continue dans une population sauvage, des individus de la même espèce, physiquement ou chimiquement stérilisés, pour rompre le cycle de la descendance et à long

terme aboutir à l'extinction de la population. Mais cette technique est associée à un risque d'infection car chez les glossines, mâles et femelles sont capables de transmettre la trypanosomose.

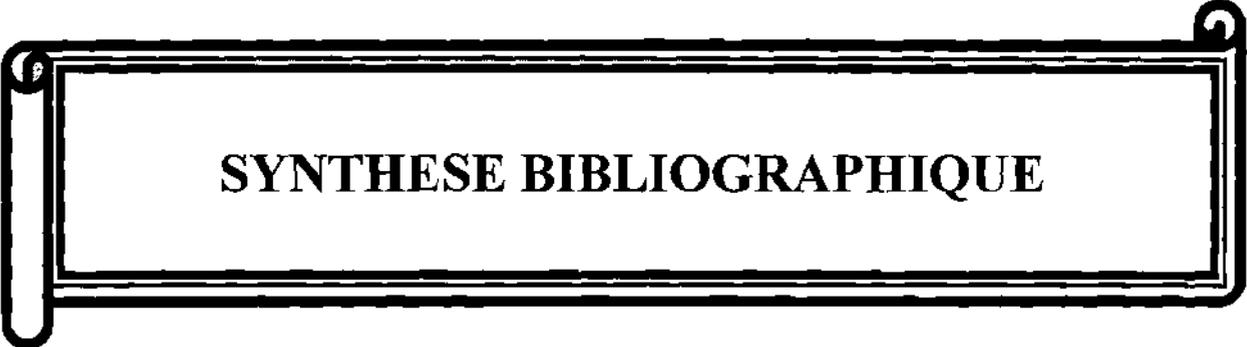
C'est dans ces contextes que s'inscrit notre travail de recherche dont l'objectif général est d'une part, d'étudier les conditions d'isolement d'*Ehrlichia ruminantium in vitro* et d'autre part, d'étudier la compétence vectorielle des glossines élevées au CIRDES en vue du contrôle de la qualité des glossines pour leur éradication sur le terrain par la TIS.

Les objectifs spécifiques visés peuvent être décrits comme suit :

- ❖ établir une liste très exhaustive des stabilats de trypanosomes viables conservés dans la cryothèque du CIRDES ;
- ❖ générer une base de données Access pour l'organisation de la cryothèque.
- ❖ régénérer certaines souches par des cultures *in vivo* ou *in vitro* ;
- ❖ étudier la virulence de certaines souches d'*E. ruminantium* isolées *in vitro* ;
- ❖ évaluer la régularité du cycle biologique et la compétence vectorielle des glossines ;
- ❖ comparer la compétence vectorielle des 3 espèces de glossines (*Glossina morsitans submorsitans*, *Glossina palpalis gambiensis* et *Glossina tachinoïdes*) élevées au CIRDES en fonction des espèces de trypanosomes (*Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* et *Trypanosoma brucei*) ;
- ❖ étudier la réceptivité des glossines vis-à-vis des trypanosomes.

Notre rapport comprend deux parties. La première partie consiste en une revue bibliographique de l'état des connaissances sur *Ehrlichia ruminantium* et la maladie qu'elle entraîne puis sur les glossines et les trypanosomes. La seconde partie, relative à l'étude expérimentale, détaille la méthodologie suivie, puis présente les résultats obtenus. Enfin, les problèmes rencontrés et les limites de l'étude sont discutés et des recommandations proposées.

PREMIERE PARTIE



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : *EHRlichia RUMINANTIUM*

I. Définition

Ehrlichia ruminantium, anciennement appelée *Cowdria ruminantium*, est une rickettsie intracellulaire stricte appartenant à la famille des *Anaplasmataceae* (Dumler et al., 2001). Elle ne se colore pas au gram. Elle parasite les cellules endothéliales des ruminants (Cowdry, 1925), mais sa présence est aussi décelée dans les leucocytes polynucléaires neutrophiles circulants des animaux en phase d'hyperthermie de la maladie (Logan et al., 1987) et dans les macrophages péritonéaux pour certains isolats pathogènes pour les souris (Du Plessis, 1982). *Ehrlichia ruminantium* est responsable de la cowdriose (heartwater), une maladie virulente, non contagieuse, c'est-à-dire qu'elle ne peut pas passer directement d'un animal malade à un animal sain. La cowdriose est naturellement transmise par les tiques du genre *Amblyomma* (Norval et al., 1981). Cette maladie affectant les bovins, les moutons, les chèvres ainsi que les ruminants sauvages (Cowdry, 1925), constitue un obstacle majeur au développement de l'élevage dans toute l'Afrique subsaharienne, à Madagascar et dans de nombreuses îles de l'océan indien et des caraïbes (Uilenberg, 1983 ; Camus et al., 1996).

II. Classification ou taxonomie

En raison de ses propriétés Gram négatif, de sa localisation intracellulaire obligatoire, de sa morphologie semblable à celle des bactéries et de sa transmission par les arthropodes, *Ehrlichia ruminantium* a d'abord et pendant longtemps été classée dans la famille des *Rickettsiaceae*. Mais de récents travaux basés sur l'analyse des séquences des gènes codant pour les ARN 16S ribosomiaux et des séquences *GroESL* des principales espèces de *Rickettsiales*, permirent de reconsidérer sa classification (Dumler et al., 2001). *Ehrlichia ruminantium* est désormais classée dans la subdivision des protéobactéries et appartient à l'ordre des *Rickettsiales*, à la famille des *Anaplasmataceae*, au genre *Ehrlichia* et à l'espèce *Ehrlichia ruminantium*. La maladie dont elle est responsable s'appelle ehrlichiose des ruminants.

III. Morphologie et cycle de développement

Ehrlichia ruminantium est une rickettsie intracellulaire obligatoire, à Gram négatif, d'une taille de 0,2 à 2,7 μ m, se présentant généralement sous forme coccoïde ou rarement annelée. L'ultrastructure d'*Ehrlichia ruminantium* révèle l'existence de deux formes morphologiques aptes à se diviser : des corps élémentaires ou corps initiaux denses, qui correspondent à la forme infectieuse et virulente et des corps réticulés qui sont des formes végétatives non infectieuses. Les corps élémentaires adhèrent et pénètrent dans la cellule endothéliale et se localisent dans des vacuoles intracytoplasmiques. Ils s'y multiplient par fission binaire pour former le stade morula qui peut contenir des corps réticulés de grande taille et peu denses aux électrons ou des corps élémentaires petits et denses aux électrons. Ces corps réticulés vont ensuite évoluer en corps intermédiaires, puis en corps élémentaires. Après quatre à six jours de développement, l'éclatement de la cellule hôte conduit à la libération de centaines de corps élémentaires qui peuvent initier de nouveaux cycles infectieux (Jongejan et al., 1991).

IV. Diversité antigénique et génétique d'*Ehrlichia ruminantium*

Au sein de l'espèce *Ehrlichia ruminantium*, il existe une grande diversité antigénique et génétique. L'analyse des séquences des ARN 16S a permis de reconnaître au moins 5 génotypes qui sont : le génotype *Crystal Springs* (souche isolée au Zimbabwe), qui comprend également la souche *Welgevonden*, souche type d'*Ehrlichia ruminantium* ; le génotype *Omatjienne* (souche isolée en Namibie) ; le génotype *Sénégal* (souche isolée au Sénégal) ; les génotypes *Ball 3* et *Mara 87/7* (souches isolées en Afrique du Sud).

L'analyse de l'homologie du gène *map1* (qui est un gène très polymorphe), de différents isolats du Burkina Faso et du Sénégal, a mis en évidence d'autres groupes génotypiques en plus des cinq premiers cités plus haut. Ce sont le Pokoase/Sénégal, le Kiswani/Ludlow, le Mali/Sankat, l'Antigua/Barbet, le Burkina/Blaaukrans...ainsi que des génotypes de profils inconnus. Cette hétérogénéité au sein de l'espèce *E. ruminantium* est responsable de l'absence partielle ou totale de protection entre les différentes souches (Adakal, 2004). La mise au point d'un vaccin efficace passe alors par une meilleure connaissance de la diversité antigénique et génétique d'*E. ruminantium* grâce à l'étude de génome d'un grand nombre de souches. L'isolement *in vivo* permet de disposer de matériel nécessaire à cette étude, mais aussi à la conduite d'essais de protection croisée pour identifier le degré de protection entre différentes souches.

V. Culture *in vitro*

La culture *in vitro* d'*Ehrlichia ruminantium* s'est avérée longtemps irréalisable. *Ehrlichia ruminantium* a été cultivée pour la première fois sur des lignées de cellules endothéliales de veau par **Bezuidenhout et al. (1985)**. La rickettsie peut être cultivée *in vitro* dans les cultures de cellules endothéliales bovines, ovines, caprines et humaines (**Brett et al., 1992** ; **Totte et al., 1993**) aussi bien que dans des cellules de quelques mammifères africains sauvages (**Smith et al., 1998**). **Bell-Sakyi et al. (2000)** ont pu cultiver et étudier la morphologie d'*Ehrlichia ruminantium* sur des lignées de cellules de tiques vectrices (*Amblyomma variegatum*) ou non (*Ixodes scapularis*, *Boophilus decoloratus*, *B. microplus*, *Rhipicephalus appendiculatus*).

Au CIRDES, la culture d'*Ehrlichia ruminantium* a débuté en 2001 avec l'isolement sur des lignées cellulaires BAEC et BUEC des souches *Gardel* et *Welgevonden*, ramenées du CIRAD/EMVT Guadeloupe. Les essais d'isolement de stocks locaux ont permis par la suite de cultiver des souches appartenant à différents génotypes : BK 242 (Pokoase/Sénégal), BA 112 (Mali/Sankat), BK 255 (Kiswani/Ludlow)... Par contre, les essais d'isolement des souches inconnues n'ont jamais connu de succès. Notre travail consistera en partie, à déterminer les conditions d'isolement de ces souches.

VI. Symptômes et lésions de la cowdriose

VI. 1. Symptômes

La cowdriose est une maladie qui affecte aussi bien les petits ruminants, les bovins domestiques que les ruminants sauvages. La période d'incubation de la maladie est généralement plus courte chez les moutons et les chèvres que chez le bétail. Elle s'étend expérimentalement de 10 à 20 jours, puis débute les symptômes de la maladie (**Stachurski, 2001**). L'inoculation intraveineuse expérimentale a habituellement comme conséquence une réponse fébrile entre le 7^{ème} et 10^{ème} jour chez les moutons et chèvres et entre le 10^{ème} et 16^{ème} jour chez les bovins. Sur le terrain, des animaux sensibles introduits dans une zone infectée, peuvent montrer des signes de la maladie entre 14 à 28 jours. Elle se manifeste par des signes cliniques dont l'intensité est variable en fonction des souches d'*Ehrlichia ruminantium* et de l'espèce d'animaux infectés. On distingue alors quatre formes cliniques qui sont ci-dessous décrites.

La forme aiguë : elle se caractérise par une fièvre brutale dont la température est souvent supérieure à 41 °C, de la prostration due à l'état fébrile avec la tête portée basse, un poil terne légèrement ébouriffé, une détresse respiratoire et finalement l'apparition des symptômes nerveux. Ces symptômes nerveux se manifestent par des tremblements musculaires d'abord localisés, puis généralisés, une ataxie, des mouvements en cercle, des crises de pédalage, de l'opisthotonos, des mouvements désordonnés de la bouche et des yeux (**Annexe IX: Figure 6**). A ce stade, on peut observer de la tachycardie due à un œdème pulmonaire. Les symptômes digestifs observables sont plus fréquents chez les bovins que chez les petits ruminants et consistent en une diarrhée profuse et sanguinolente. En l'absence de traitement, la mort intervient fatalement en 3 à 5 jours.

La forme suraiguë : elle se caractérise par une élévation très brutale de la température, des crises convulsives et une détresse respiratoire intense due à un œdème pulmonaire entraînant la mort en moins de 36 heures. Dans certains cas, l'animal meurt sans avoir manifesté de signes cliniques. Cette forme suraiguë est plus fréquente chez les animaux importés des zones indemnes vers des zones d'enzootie.

La forme subaiguë : les signes cliniques sont similaires à ceux de la forme aiguë, mais sont plus atténués. L'évolution de la maladie est plus longue, environ 7 à 10 jours, durant lesquels l'animal perd du poids et peut mourir avec une température rectale redevenue normale ou avec une hypothermie. Les stases pulmonaires sont les signes les plus fréquents. Par contre, l'animal amaigri, peut survivre avec quelques séquelles. Cette forme est surtout observée chez les animaux résistants, ou ayant acquis une immunité partielle par infection avec une faible quantité d'*Ehrlichia ruminantium* ou avec une souche de faible virulence.

La forme bénigne : elle se caractérise par un accès de fièvre de 1 à 3 jours, suivie d'une guérison spontanée. Elle s'observe chez les animaux très jeunes, les individus immunisés, les races résistantes.

VI. 2. Lésions

Les lésions sont variables en fonction des formes cliniques de la maladie et se caractérisent dans la plupart des cas par des lésions nerveuses, souvent discrètes avec une congestion des méninges, du thorax, de l'abdomen, des poumons, du médiastin, du foie, des nœuds lymphatiques et une splénomégalie. Les lésions les plus caractéristiques, plus fréquentes chez les petits ruminants que chez les bovins sont des épanchements liquidiens au niveau du péricarde (hydropéricarde), du thorax (hydrothorax), du péritoine (hydropéritoine).

Des lésions digestives sous forme d'entérite sont observées dans la forme suraiguë. Les lésions microscopiques caractérisées par la présence d'amas d'*E. ruminantium* dans le cytoplasme des cellules endothéliales et notamment dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, constituent la base du diagnostic parasitologique.

VII. Diagnostic

Sur le terrain, le diagnostic de la cowdriose est basé sur la présence de tiques du genre *Amblyomma*, des signes et des lésions caractéristiques de la maladie. Du fait de l'existence de signes protéiformes de la maladie, il importe d'effectuer un diagnostic différentiel avec les autres maladies capables d'entraîner des signes nerveux et de tuer de façon foudroyante. La forme suraiguë de la cowdriose peut ainsi être confondue avec l'anthrax et la forme nerveuse aiguë confondue avec la rage, le tétanos, la chlamydie, la méningite ou l'encéphalite bactérienne, la trypanosomose cérébrale, la piroplasmose ou la theilériose, et les diverses intoxications comme celle à la strychnine, au plomb, aux organophosphorés, ou aux hydrocarbures chlorés. Les infestations sévères d'helminthes peuvent produire des accumulations de liquide semblables à celles observées dans la cowdriose. L'empoisonnement arsenical peut aussi ressembler à la forme entérique de part ses signes et lésions (Euzeby, 2001). Dans tous les cas, une suspicion de cowdriose doit être confirmée par des tests au laboratoire.

VII. 1. Diagnostic parasitologique

Il repose sur la microscopie et consiste à la mise en évidence d'amas d'*E. ruminantium* dans le cytoplasme des cellules endothéliales notamment sur des frottis de cerveau. Après la mort de l'animal, la tête est coupée et le crâne ouvert à l'aide d'une machette de façon à permettre le prélèvement d'un morceau de cortex de la taille d'une tête d'épingle. Celui-ci est déposé et écrasé entre deux lames de verre que l'on fait glisser en sens inverse tout en maintenant la pression (Annexe IX : Figure 7). Le frottis de cerveau ainsi obtenu est séché, fixé au méthanol et coloré soit au May-Grünwald Giemsa ou soit avec des colorations rapides à base d'éosine et de bleu de méthylène (le Kit RAL 555®, Diff Quick a été utilisé dans notre cas).

L'inoculation du sang des animaux suspects à des petits ruminants sains et sensibles (moutons ou chèvres) participe au diagnostic. Le sang frais prélevé pendant la phase d'hyperthermie

peut être ainsi utilisé pour l'isolement sur cultures cellulaires et la préparation de stabilats de sang qui peuvent être conservés en azote liquide après addition de 10 % de DMSO.

VII. 2. Diagnostic sérologique

Il fait appel à l'immunofluorescence indirecte (IFA) ou à l'immuno-enzymologie (ELISA). Le premier test d'immunofluorescence a été développé par **Du Plessis (1981)** qui utilisait des antigènes produits *in vivo* sur des macrophages de souris. Ce test a l'avantage d'être très sensible mais il est moins utilisé en dehors de l'Afrique du Sud et de la Guadeloupe (**Camus, 1987**) car il est difficile de produire un nombre suffisant de macrophages infectants. Mais comme tous les autres tests, l'immunofluorescence conduit aussi à des réactions faussement positives.

De nombreux tests immuno-enzymatiques ont été mis au point en utilisant des antigènes purifiés, des corps élémentaires traités aux ultrasons, des protéines solubilisées et la protéine *map1* obtenue par recombinaison génétique. Un fragment de cette protéine *map1*, l'antigène *map1B*, constitué des acides aminés 47 à 92 proposé par **Van Vliet et al. (1995)** a été utilisé pour la mise en évidence d'IgG. Si l'on ne considère pas la détection d'anticorps anti-*Ehrlichia canis* et anti-*Ehrlichia chaffeensis*, ce test semble très spécifique. Malheureusement, si les animaux infectés sont aptes à produire des IgG anti-*map1B*, les anticorps, au moins chez les bovins, ne sont plus détectables 14 à 28 semaines après une infection expérimentale ou 19 à 31 semaines après une infection naturelle (**Euzeby, 2001**).

VII. 3. Diagnostic moléculaire

Le chromosome d'*Ehrlichia ruminantium* (souche *Welgevonden*) est circulaire et d'une taille d'environ 1576 Kb. Un gène conservé du génome, le gène *pCS20* est utilisé comme cible des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) (**Mahan et al., 1998 ; Peter et al., 2000**). L'amplification de ce gène permet de détecter les stocks d'*Ehrlichia ruminantium* sur des tiques de terrain, mais également sur les organes d'animaux infectés. Un autre gène qui est lui polymorphe, le *map1* est également utilisé, mais sert plus aux études de caractérisation génétique. Dans le souci d'augmenter la sensibilité de la PCR classique, des PCR utilisant successivement deux couples d'amorces ou PCR « nichées » ou encore « nested-PCR » ont été développées pour amplifier les gènes *pCS20* et *map1* et il a été constaté une sensibilité 20 fois plus élevée qu'en PCR classique.

Même si la technique offre une bonne spécificité car ne détectant pas l'ADN des autres *Ehrlichia* génétiquement proches d'*E. ruminantium* (cas d'*E. chaffeensis*), elle nécessite cependant le recours à des laboratoires spécialisés et à de la main d'œuvre qualifiée.

VIII. Epidémiologie de la cowdriose

La cowdriose existe seulement dans les endroits où sont présentes les tiques du genre *Amblyomma*. Parmi les 12 espèces reconnues impliquées dans la transmission de la maladie, les deux vecteurs les plus importants sont *Amblyomma variegatum* et *Amblyomma hebraeum*. *Amblyomma variegatum* est largement distribué en Afrique, au Yémen, à la Réunion, aux îles du Cap vert et dans plusieurs îles des Indes occidentales (Walker et al., 1987). *Amblyomma hebraeum* est rencontré en Afrique australe. D'autres espèces de tiques du genre *Amblyomma* sont aussi capables de transmettre la maladie. Ce sont *Amblyomma lepidum* en Afrique de l'Est et au Soudan, *Amblyomma maculatum* et *Amblyomma cajennense* dans le nord et le sud de l'Amérique (Uilenberg et al., 1984).

Au Burkina Faso, la cowdriose a été identifiée pour la première fois en 1984 chez des bovins de race laitière, importés d'Europe. *Amblyomma variegatum*, seule espèce qui y est présente, a été identifiée depuis la frontière de la Côte d'Ivoire jusqu'à la latitude de Ouahigouya. Sa présence a été confirmée à Fada, mais elle est absente au nord du pays, dans les régions de Dori et de Gorom-Gorom. D'où le fait que les ovins de cette zone ne sont pas immunisés contre la cowdriose. Ces limites sont fluctuantes et varient d'une année à l'autre (Stachurski, 2001).

Amblyomma variegatum connaît un cycle trixène (à trois hôtes obligatoires) dont chacun des 3 stades (larve, nymphe, adulte) se nourrit sur un hôte différent. Son cycle de développement peut s'étaler sur 5 mois à 4 ans car les tiques s'infectent pendant le stade larvaire ou nymphal et transmettent la maladie pendant le stade nymphal ou adulte. La femelle d'*Amblyomma variegatum* a une grande fécondité de 10 à 30000 œufs chacune (Barré, 1997). Les larves et les nymphes parasitent principalement les oiseaux, les reptiles, les petits mammifères et surtout les ruminants. Quant aux adultes, ils parasitent diverses espèces de mammifères et rarement les oiseaux ou les reptiles. La durée du repas sanguin est d'environ 4 à 20 jours pour les larves, 5 à 20 jours pour les nymphes et 10 à 20 jours pour les adultes.

Au Burkina Faso où le climat est caractérisé par une saison sèche et une saison des pluies nettement distinctes, la cowdriose apparaît en zone d'enzootie en début de saison pluvieuse,

pendant le pic d'infestation par les adultes, puis en début de saison sèche pendant le pic d'infestation par les nymphes.

IX. Méthodes de lutte

Etant donné l'extrême fragilité d'*Ehrlichia ruminantium* en dehors d'un hôte, le principal mode d'apparition de la maladie dans une région passe nécessairement par l'introduction dans celle-ci de tiques ou des animaux infectés porteurs du germe.

IX. 1. Traitement

Le traitement fait appel aux antibiotiques tels que les tétracyclines et les sulfamides. Les tétracyclines, en particulier les oxytétracyclines sont très efficaces dans le traitement de la maladie lorsque les animaux sont traités très tôt. En les administrant avant que les signes n'apparaissent, elles suppriment entièrement la maladie et permettent à l'immunité de se développer. L'oxytétracycline est administrée à des doses de 10-20 mg/kg, la chlorotétracycline à des doses de 5 mg/kg, la doxycycline à des doses de 2 mg/kg. Les tétracyclines sont également utilisées à titre prophylactique afin de protéger les animaux introduits dans une zone où l'ehrlichiose des ruminants sévit à l'état enzootique. Le but est de protéger les animaux d'une infection cliniquement exprimée tout en leur permettant de développer une immunité active relancée régulièrement par l'infection naturelle. Chez la chèvre, on préconise l'administration de tétracyclines aux jours 10, 20, 30, 45 et 60 ; et chez les bovins, l'administration de tétracycline longue action aux jours 7, 14 et 21 ou aux jours 7 et 14 (Euzéby, 2001).

IX. 2. Vaccination

Il n'existe pas encore de nos jours de vaccin universellement efficace contre la cowdriose, du fait de la variabilité génétique existant au sein de l'espèce *Ehrlichia ruminantium*. Néanmoins, la méthode infection-traitement est utilisée pour immuniser les animaux en Afrique du Sud. Elle consiste à inoculer aux animaux du sang infecté (sang de mouton infecté par la souche *Ball 3*) et à les traiter à l'oxytétracycline au moment de l'hyperthermie.

CHAPITRE II : GLOSSINES

I. Définition

Les glossines ou mouches tsé-tsé sont les vrais vecteurs biologiques des trypanosomes africains. Ce sont des mouches allongées, robustes, de coloration brun-noirâtre jamais métallique, de taille comprise entre 6 et 16 mm (Kaboré, 2001). Dans le domaine de l'élevage, les glossines constituent un des principaux facteurs limitants en Afrique subsaharienne, en gênant ou en empêchant les productions animales sur près de 10 millions de Km², qui offrent pourtant les plus fortes potentialités fourragères et agricoles (Sidibé, 1996). Les glossines sont des Diptères hématophages, qui assurent l'essentiel des transmissions parasitaires des trypanosomes, agents de la maladie du sommeil chez l'homme et de la trypanosomose animale africaine ou Nagana.

II. Classification ou taxonomie

Les glossines appartiennent à l'embranchement des invertébrés, à la classe des arthropodes. Ce sont des Diptères Brachycères Cyclorrhaphes de la famille des *Glossinidae*, du genre *Glossina*. Ce dernier comprend 3 sous genres qui sont : le sous genre *Nemorhina* (ancien groupe *palpalis*) qui comprend *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy, 1830 ; *Glossina tachinoïdes* Westwood, 1850 ; le sous genre *Glossina s.str* (ancien groupe *morsitans*) qui comprend *Glossina morsitans submorsitans* Newstead, 1910 et le sous genre *Austenia* ancien groupe *fusca* (Kaboré, 2001).

III. Anatomie externe de la glossine

La glossine se compose de 3 parties : la tête, le thorax et l'abdomen. La tête porte une paire d'yeux composés, 3 ocelles disposées en triangle entre les yeux composés, des antennes et des pièces buccales. Au sein des pièces buccales, se trouvent les palpes maxillaires et le proboscis ou trompe. Le proboscis comprend le labium (lèvre inférieure, rigide), l'hypopharynx où s'écoule la salive, et le labre (lèvre supérieure). Le thorax comprend 3 segments portant des soies, des ailes, des haltères, 3 paires de pattes et 2 paires de stigmates respiratoires sur les côtés. L'abdomen est composé de 8 segments dont 7 sont visibles dorsalement. Chaque

segment comprend un tergite dorsal rigide, une sternite ventrale souple et une paire de stigmates respiratoires. Le 8^{ème} segment contient le *Genitalia* mâle ou femelle.

IV. Anatomie interne et physiologie de la glossine

IV. 1. Le système digestif

Il est composé des pièces buccales (canal alimentaire, hypopharynx, dents labellaires, pharynx), du conduit digestif (œsophage, proventricule, jabot, intestin moyen, intestin postérieur, rectum, anus), des glandes salivaires et des tubes de Malpighi.

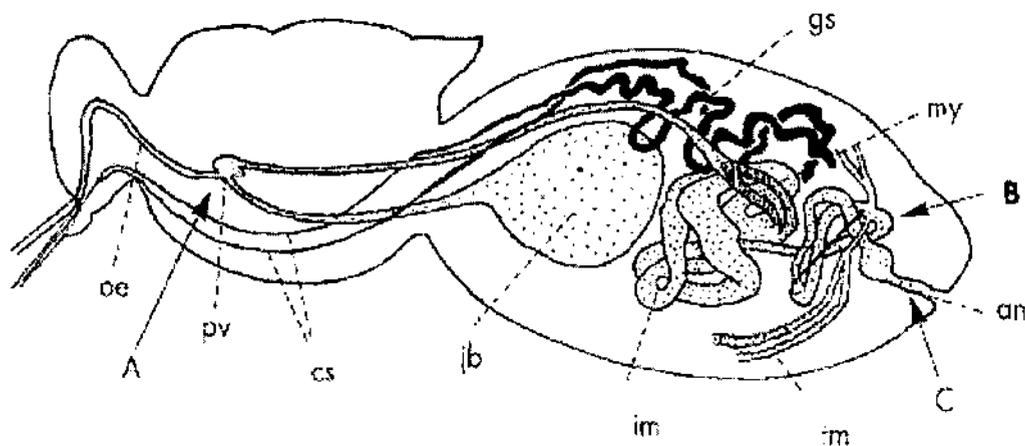


Figure 1 : L'appareil digestif de la glossine (Laveissière et al., 2000).

an = anus ; cs = canaux salivaires ; gs = glandes salivaires ; im = intestin moyen ; jb = jabot ; my = mycétome ; œ = œsophage ; A = pv = proventricule ; tm = tubes de Malpighi ; B & C = extrémités postérieures de l'intestin.

IV. 2. Digestion

La digestion chez la glossine commence par l'injection dans la plaie infligée à son hôte de la salive hémolysante. Le sang aspiré passe par l'œsophage au niveau du thorax puis directement dans le jabot qui sert à stocker provisoirement le sang avant sa digestion. La quantité de sang ainsi ingérée varie selon les espèces. Elle est de 7,4 mg pour *G. tachinoïdes* mâles et 12 mg pour les femelles ; 37,3 mg pour les mâles *G. morsitans* et 62,3 mg pour les femelles ; enfin, 53,9 mg pour *G. pallidipes* mâles et 76 mg pour les femelles (Kaboré, 2001). La digestion s'effectue sous l'action d'enzymes digestives produites par l'intestin. La fraction alimentaire principale du repas de sang qui doit être digérée est la fraction protéique. Le repas de sang ne contient que peu de lipides ou de glucides. La digestion des protéines s'effectue sous l'action

d'enzymes produites dans la partie médiane de l'intestin moyen; elle libère des acides aminés, plus simples capables de franchir la paroi intestinale. Leur assimilation s'opère principalement à travers la membrane du segment terminal de l'intestin moyen. Puis ces produits sont véhiculés lentement par l'hémolymphe à travers le corps et les tissus, sous l'action d'un simple cœur tubulaire (ou aorte). Contrairement au sang des mammifères, l'hémolymphe ne véhicule pas d'oxygène. Les substances à excréter sont conduites aux tubes de Malpighi par le même système. Tout excès d'acides aminés par apport est converti en graisses et mis en réserve dans le tissu adipeux qui est la principale réserve alimentaire de la mouche (Pollock, 1992).

V. Les trypanosomes

V. 1. Définition

Les trypanosomes sont des protozoaires, microscopiques, de forme allongée, dont la locomotion est assurée par un unique flagelle et par les contractions pariétales. Ce sont des parasites obligatoires (intravasculaires et extracellulaires) et leur hôte définitif est un vertébré. Le trypanosome se nourrit dans le sang par endocytose. Il se reproduit par division asexuée.

V. 2. Classification

Les trypanosomes appartiennent à l'embranchement des *Protozoaires*, à la classe des *Zoomastigophora*, à l'ordre des *Kinetoplastida*, à la famille des *Trypanosomatidae* et au genre *Trypanosoma*. Les trypanosomes pathogènes existant sur le continent africain appartiennent tous à la section des *Salivaria*. Elle se compose de 3 sous-genres qui sont : le sous-genre *Duttonella* comprenant 2 espèces *T. vivax* et *T. uniforme* ; le sous-genre *Nannomonas* avec 3 espèces *T. congolense*, *T. simiae* et *T. godfreyi* et enfin, le sous-genre *Trypanozoon* avec 3 espèces *T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum*.

V. 3. Morphologie et cycle biologique du parasite

V. 3. 1. Chez la glossine

Chez tous les trypanosomes de la section *Salivaria*, l'évolution chez la glossine s'effectue dans les portions antérieures ou moyennes du tube digestif. La durée du cycle au sein de la glossine est variable en fonction de l'espèce de trypanosome. Elle est d'environ 18 jours pour *T. congolense*, 14 jours pour *T. vivax* et 30 jours pour *T. brucei*. Ce sont les trois (3) plus importantes espèces au Burkina. Lors du repas sur un hôte infecté, la glossine ingère les formes trypomastigotes courtes qui vont suivre le trajet du sang: œsophage, jabot, puis intestin

moyen. Dans l'espace endopéritrophique, ces formes sanguicoles courtes se transforment en formes allongées, trypomastigotes procycliques. Elles perdent ainsi leur membrane de glycoprotéine et deviennent non infectieuses. Ces formes se multiplient activement vers le 3^{ème}-4^{ème} jour pour *T. brucei* et vers le 10^{ème} jour pour *T. congolense* et se maintiennent environ 2 mois.

Les formes procycliques de *T. congolense* migrent ensuite dans l'espace endopéritrophique, puis gagnent l'œsophage, le pharynx. Elles se fixent sur les parois du labre et se transforment en épimastigotes. Ces formes pénètrent dans l'hypopharynx et se transforment en métatrypanosomes (métacycliques) infectants revêtus de la glycoprotéine de surface (Sidibé, 1996).

Par contre, les formes procycliques de *T. brucei* dans l'intestin se transforment en formes métacycliques infectantes dans les glandes salivaires (Laveissière et al., 2000).

Pour *T. vivax*, le cycle se déroule en totalité dans le proboscis (labre et hypopharynx). Ils s'attachent à l'intérieur de la cavité du proboscis, entre labre et labium, où ils se multiplient. Ils évoluent en formes trypomastigotes, pré-épimastigotes et épimastigotes. Ils migrent ensuite dans les 4 à 24 h suivant le repas de sang vers le canal alimentaire où ils se multiplient intensément et produisent des amas denses de flagellés accrochés aux parois du labre. Ils s'en détachent et pénètrent dans l'hypopharynx où ils se transforment en trypomastigotes pré-infectants, puis en métatrypanosomes infectants. Les *T. vivax* absorbés avec le repas de sang et pénétrant dans le jabot et l'intestin, dégénèrent et meurent dans les 48 à 72 h après le repas (Sidibé, 1996).

V. 3. 2. Chez l'hôte mammifère

Les formes métacycliques infectieuses sont injectées à un mammifère lors d'un prochain repas sanguin de la glossine infectée. Ces formes se divisent dans l'espace interstitiel, ce qui provoque la formation d'un chancre au site de piqûre. De là, les trypomastigotes envahissent le système lymphatique, puis passent dans la circulation sanguine et, finalement, après quelques semaines à quelques mois, envahissent le système nerveux. Les trypanosomes évoluent dans le sang par « vagues parasitémiques » correspondant à des phénomènes « d'échappement » aux défenses immunitaires de l'hôte. Ces phénomènes d'échappement sont contrôlés par la glycoprotéine de surface (ou VSG) (Sidibé, 1996). On distingue dans le sang périphérique deux formes du parasite : des trypomastigotes effilés (longs et minces) qui se divisent activement et des trypomastigotes trapus (courts et ramassés) qui ne se divisent pas

et semblent correspondre aux formes infectieuses pour l'insecte. Les trypanosomes apparaissent diploïdes tout au long du cycle.

VI. Compétence vectorielle des glossines

Des relations complexes associent le trypanosome, responsable de la maladie et la glossine, au sein de laquelle s'effectue le cycle de développement du parasite comprenant différents stades de multiplication et de maturation. L'efficacité de la transmission dépend à la fois de mécanismes intrinsèques et extrinsèques. On distingue d'une part, la compétence vectorielle qui est l'aptitude physiologique du vecteur à acquérir l'agent pathogène, à le transmettre ; et d'autre part, la capacité vectorielle qui est le nombre de nouvelles infections que le vecteur peut disséminer quotidiennement chez ses hôtes (**Cuisance et al., 2003**). Lorsque la mouche sort du puparium, elle n'est jamais infectée. Elle est « saine » et ne peut transmettre la maladie. Elle est dite ténérale, lorsqu'elle n'a pas encore pris son premier repas de sang (**Kazadi et al., 2000**). La compétence vectorielle des glossines est un sujet qui reste encore à éclaircir car les relations vecteur/parasite sont extrêmement complexes et pourraient être autant influencées par des facteurs extrinsèques que par des facteurs intrinsèques et génétiques des deux acteurs.

VII. Lutte anti-vectorielle

La technique de l'insecte stérile (TIS) est la première méthode de lutte contre les insectes ravageurs qui utilise la génétique. On pourrait la définir comme une forme de contrôle des naissances des insectes menée à l'échelle d'une région. Elle repose sur le fait que chez les glossines, les femelles ne s'accouplent en général qu'une seule fois au cours de leur vie et conservent le sperme du mâle dans leurs spermathèques. Cette technique consiste à reproduire des quantités énormes de glossines mâles dans l'insectarium et de les stériliser, en les exposant à de faibles doses de radiations. Ces mouches mâles stériles sont ensuite lâchées dans les zones infestées, où elles s'accouplent aux femelles sauvages. Si les mâles stériles l'emportent largement en nombre sur les mâles sauvages féconds, la population de mouches sauvages est rapidement anéantie. La proportion de mâles stériles par rapport aux mâles sauvages féconds doit être d'au moins sept à dix pour un. Une femelle inséminée par un mâle stérile ne produit pas de descendance durant tout le reste de sa vie.

VIII. Culture *in vivo* des trypanosomes

Les formes sanguines des trypanosomes se cultivent sur des souris et sur des rats. Les souches de souris les plus utilisées sont *NMRI*, *Balb/C*, *CF1* ou *C₃H*. Leur inoculation se fait en intrapéritonéal et la plupart des souches se développent en 2 à 5 jours. Par contre la capacité de *T. vivax* à se multiplier sur rongeurs est très variable. La culture *in vivo* est peu employée pour le diagnostic (longueur, coût, utilisation d'animaux vivants) mais reste utile pour l'isolement des souches ou pour la production massive de parasites.

IX. Symptômes

La pathologie de la trypanosomose des petits ruminants, bien que très peu précisée, est semblable à celle des autres espèces animales avec des symptômes pathognomoniques. Au fort de la crise, les animaux ont de l'inappétence, présentent une muqueuse oculaire pâle, un larmoiement et ont une démarche chancelante et quelquefois font de la diarrhée. La période prépatente est en moyenne de 7 jours chez les petits ruminants (Ndoutamia et *al.*, 2002). Chez les bovins, la maladie débute par une phase d'hyperthermie correspondant au pic de parasitémie. La phase d'incubation peut aller de 2 à 3 semaines après la piqûre, puis le taux d'hémoglobine et l'hématocrite chutent reflétant l'anémie, symptôme majeur des trypanosomoses bovines. D'une valeur normale supérieure ou égale à 30 % chez les bovins, l'hématocrite chute jusqu'à des valeurs de l'ordre de 20 % après 3 à 8 semaines. Cette chute s'accompagne d'une forte fièvre, d'une faiblesse, d'une hypertrophie des ganglions, des membranes muqueuses pâles, d'une perte d'appétit, d'une perte de poids, d'un avortement et d'une infertilité chez les mâles et chez les femelles.

X. Diagnostic

Il repose sur les techniques parasitologiques, sérologiques et biomoléculaires. La méthode la plus utilisée parmi les techniques parasitologiques est le « *Buffy-coat* ». Il consiste à extraire le matériel biologique situé au niveau de l'interface globules/plasma contenu dans un microtube à hématocrite ayant préalablement subi une centrifugation différentielle de sang hépariné.

Chez le vecteur, les techniques de diagnostic parasitologiques sont peu spécifiques d'où il est préférable de réaliser les examens biomoléculaires par PCR avec des amorces spécifiques.

XI. Prévention et traitement

On peut prévenir l'infection en combattant la mouche tsé-tsé. Certains médicaments appelés trypanocides sont efficaces pour réduire les symptômes, mais ils doivent être administrés avec soin selon les indications. Ce sont principalement des dérivés de diamines (Berenil, Veriben) ; de phénanthridine (chlorure d'isometamidium, l'homidium) ; d'urée (Naganol) ; de quinoléine (methylsulfate) et la melarsamine.

DEUXIEME PARTIE



ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels biologiques

I. 1. Souches d'*Ehrlichia ruminantium* : elles proviennent de la cryothèque du CIRDES. Elles sont sous forme de sang congelé (*KDB/E012*, *Inc1/ov479*, *Inc3/BA103S*, *E055/BK433S*) et de cellules congelées (*E008/BK433S*, *BK242/P/S*). Les souches *Inc1*, *Inc3* et *KBD* sont dites inconnues car leur génotypage par PCR-RFLP a montré des profils inconnus. On ne dispose donc d'aucune information sur ces souches en terme surtout de protection croisée avec les autres souches connues et de leur capacité à se développer *in vitro*. Pour cette raison, elles ont été choisies pour l'étude. Quant aux souches *BK242* et *BK433S*, elles appartiennent au groupe génotypique le plus répandu au Burkina Faso, le groupe *P/S*. De plus, *BK242* a déjà fait l'objet de plusieurs passages sur cultures de cellules et d'essais vaccinaux sur le terrain.

Ces souches ont été inoculées à des moutons, puis isolées sur culture cellulaire à partir du sang infecté des animaux. La souche *BK242* Passage14 du 11/08/06 a été utilisée pour la détermination des doses de challenge, dont la connaissance est essentielle dans la mise en place des essais de protection croisée entre différentes souches.

I. 2. Souches de trypanosomes : Pour l'évaluation de la compétence vectorielle des glossines, ce sont les espèces *Trypanosoma congolense* IL1180, *Trypanosoma vivax* Zaria 81/y486/699, *Trypanosoma brucei* Farakoba 80/CRTA/1 qui ont été utilisées. Toutes les autres souches de trypanosomes provenant de la cryothèque du CIRDES devaient faire l'objet d'un inventaire pour l'établissement d'une base de données Access.

I. 3. Glossines : Trois espèces de glossines ténérales, mâles et femelles ont été utilisées pour l'étude de la compétence vectorielle. Ce sont *Glossina morsitans submorsitans*, *Glossina palpalis gambiensis*, *Glossina tachinoïdes* qui proviennent toutes de l'insectarium du CIRDES. Elles sont alimentées une fois/jour sur du sang infectant durant 3 jours successifs et après sur du sang sain de bœuf ou de porc durant tout le cycle trypanosomien.

I. 4. Animaux d'expérience

I. 4. 1. Rats: Ils proviennent de l'animalerie du CIRDES. Ce sont des rats d'espèce *Rattus norvegicus* et de souche *Wistar* (**Annexe IX : Figure 9**). Les rats sont utilisés pour la culture *in vivo* des trypanosomes afin d'être saignés et leur sang récolté pour infecter les glossines.

I. 4. 2. Moutons: Les seize (16) moutons utilisés pour l'isolement des souches d'*Ehrlichia ruminantium* sur culture cellulaire et pour la détermination de doses infectantes pour les challenges proviennent tous de la région de Dori, une zone indemne d'*Amblyomma variegatum* et de cowdriose. Ils ont été identifiés par des boucles, déparasités (Albendazole/Vermitan[®]) et vaccinés (Pasteurellad[®], Symptovax[®], Vaccin PPR751) et leur statut sérologique a été vérifié avant l'expérience.

Pour l'étude de la compétence vectorielle, ce sont des moutons Djallonkés au nombre de trois (3), provenant de la zone de Bobo, qui ont été utilisés. Ils ont été traités au Berenil[®] et leurs sérums passés au test d'ELISA afin de connaître leur statut sérologique avant l'application des glossines.

II. Matériels de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé pour les différentes manipulations se trouve en **Annexe VIII**. Ce matériel a servi entre autre pour le prélèvement du sang des moutons, pour la détermination de la parasitémie, pour la culture cellulaire, pour la sérologie, pour la saignée des rats, pour l'alimentation des glossines et enfin, pour la dissection des glossines.

III. Méthodes

III. 1. Base de données Access

Le logiciel Excel a été utilisé pour effectuer un inventaire complet des stabilats à partir des fiches individuelles où sont portés tous les détails relatifs aux stabilats supposés présents dans la cryothèque. Leur présence physique dans les bonbonnes d'azote liquide a été ensuite vérifiée. Enfin, le fichier Excel corrigé a été utilisé pour l'établissement de la base de données Access qui offrira plus de facilité et de fiabilité à la gestion de la cryothèque.

III. 2. Tests de viabilité

Les stabilats des différentes souches de trypanosomes sont d'abord décongelés au bain-marie à 37 °C. Puis la viabilité des parasites est contrôlée en se basant sur la mobilité des trypanosomes par observation au microscope optique d'une goutte de sang déposée entre lame et lamelle.

Quant aux stabilats d'*E. ruminantium*, ils sont décongelés et injectés aux moutons sahéliens naïfs à la dose de 1,5 ml de sang par animal. Avant l'injection, le sang des moutons est prélevé sur tubes secs pour la sérologie, puis tous les 7 jours pendant un mois. La température de l'animal est prise quotidiennement. Au moment du pic thermique (40-41 °C), le sang est prélevé sur tubes héparinés pour la culture *in vitro* et aussi sur tubes secs pour la sérologie qui permet de vérifier si l'animal a été réellement infecté, donc si la souche est infectante. Pour cela, il doit avoir un pourcentage de positivité relative (PPR) largement supérieur à 20 %. Le passage sur culture est nécessaire car certaines souches, en l'occurrence celles inconnues, peuvent être viables mais réfractaires à pousser sur les lignées cellulaires. Après le prélèvement de sang au moment de l'hyperthermie, les animaux sont traités.

III. 3. Culture *in vitro* des souches d'*Ehrlichia ruminantium*

La culture *in vitro* d'*Ehrlichia ruminantium* passe d'abord par l'isolement des souches à partir du sang infecté des animaux. Au moment du pic thermique (plus de 40 °C), le sang des animaux est prélevé sur tube hépariné de Na pour l'isolement (Annexe IV). L'isolement et la culture se font dans des boîtes de culture (Falcon TC 25 cm²) dont le fond est tapissé de cellules endothéliales (BUEC et BAEC). La culture de ces cellules endothéliales non infectées se fait par trypsination ou repiquage dans des boîtes préalablement gélatinées (Annexe III). Lorsque le tapis est confluent, les cellules endothéliales peuvent être conservées par congélation. Ainsi, il est conseillé pour l'infection ou le passage avec *Ehrlichia ruminantium* d'utiliser des cellules endothéliales trypsinées 2 à 3 jours avant infection, afin d'avoir des cellules physiologiquement saines et d'éviter le décollement du tapis cellulaire. Après infection des cellules endothéliales dans les boîtes de culture, on procède à l'observation au microscope du tapis cellulaire et au changement du milieu de culture tous les 2-3 jours. Lorsqu'il y'a 80 à 90 % de lyse du tapis cellulaire, une partie de la boîte contenant du tapis lysé est colorée au Kit RAL. Si le RAL est positif, l'autre partie du tapis est grattée et passée dans de nouvelles boîtes de culture et le reste est congelé dans l'azote liquide sous forme de stabilats avec 10 % de DMSO.

III. 4. Confection de doses infectantes pour les challenges

L'intensité des réactions cliniques qui surviennent à la suite d'une infection par *Ehrlichia*, dépend de la dose ou du nombre de corps élémentaires inoculés. Le but de cet essai est de déterminer des doses de challenge homogènes et standardisées qui seront désormais utilisées lors d'essais de protection croisée dans le but de permettre une meilleure interprétation des scores cliniques chez les moutons. Pour cela, la souche *BK 242* a été cultivée sur des lignées BAEC et lorsque la lyse est à peu près synchronisée (80 % de lyse des cellules en 5 à 6 jours), le tapis est gratté et congelé avec 10 % de DMSO en azote liquide. Puis, pour tester la viabilité de la souche, un stabilat est décongelé et inoculé à des moutons naïfs. On fait 3 dilutions successivement au $1/10^{\text{ème}}$, $1/50^{\text{ème}}$ et $1/200^{\text{ème}}$ en maintenant les tubes sous froid sur de la glace. Chaque dilution est ensuite injectée à 3 moutons par la voie intraveineuse. Ces moutons sont suivis quotidiennement et aucun traitement n'est appliqué même en cas d'hyperthermie. La dilution qui sera retenue pour les challenges sera celle la plus grande donnant 100 % de mortalité avec une incubation de 12 à 15 jours (**Annexe VI**).

III. 5. Culture *in vivo* de souches de trypanosomes sur des rats

Elle concerne les souches de *Trypanosoma congolense* IL1180, *Trypanosoma vivax* Zaria 81/y486/699 et *Trypanosoma brucei* Farakoba 80/CRTA/1. Les souches viables sont inoculées à des rats, immunodéprimés par irradiation à 700 rads pendant 70 secondes. Le nombre total de rats utilisés s'élève à 71. La culture a été faite d'abord sur 2 rats par espèce de trypanosome, puis la multiplication s'est faite sur 20 rats respectivement pour *T. vivax* et *T. brucei*, et sur 25 rats pour *T. congolense*. La parasitémie est contrôlée tous les 2 à 3 jours par observation du sang prélevé à la queue des rats, et cela jusqu'à ce que la charge parasitaire soit très élevée. Le sang est ensuite récolté par ponction cardiaque dans une seringue contenant de l'héparine pour alimenter les glossines et provoquer leur infection.

III. 6. Infection et alimentation des glossines

Après la culture des souches de trypanosomes sur les rats, ceux-ci sont saignés et le sang hyperparasité est récolté pour l'alimentation des glossines ténérales (**Annexe IX : Figure 9**). Pendant 3 jours successifs, elles prennent un repas de 15 minutes sur une membrane de silicone très mince (400 à 600 μm). Après ces 3 jours d'infection, elles sont alimentées pendant 10 minutes sur du sang sain de bovin ou de porc défibriné ou hépariné (23 mg/l) et porté à une température de surface de 40 °C (**Bauer et Politzar, 1982 ; Kaboré et Bauer, 1984**). A ce sang, sont additionnés de l'adénosine triphosphate (ATP) à raison de 700 mg/l et

du glucose (1000 mg/l), avant de le conditionner dans des flacons. Ces flacons contenant du sang sont ensuite irradiés au rayon gamma (césium 137) à la dose de 50 kilorads pendant 90 minutes. L'utilisation du sang intervient 24 heures après l'irradiation et un contrôle bactériologique. Le sang destiné à l'alimentation des glossines est conservé à + 4 °C. Cette alimentation saine des glossines va durer une trentaine de jours à une température de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ et $70 \pm 5\%$ d'humidité relative avec une alternance automatique de lumière artificielle-obscurité (**Annexe IX : Figure 11**). A l'issue de l'infection, un échantillon de glossines au nombre de 20 de chaque lot est soumis à la dissection.

III. 7. Dissection des glossines

Du fait de la localisation des trypanosomes dans le corps de la glossine, la dissection pour l'identification des parasites a été faite par organes. La dissection des pièces buccales (labre et hypopharynx) a été faite selon la technique décrite par **Llyod et al. (1924)** et celle de l'intestin moyen et des glandes salivaires ont été faites suivant la technique de **Penchenier et Itard (1981)**. Ainsi après dissection, tous les trypanosomes parasitant le labre et l'hypopharynx sont classés dans le "sous-genre *Duttonella*", les trypanosomes infectant le labre, l'hypopharynx et l'intestin moyen sont du "sous-genre *Nannomonas*" et ceux colonisant le labre, l'hypopharynx, l'intestin moyen et les glandes salivaires sont du "groupe *Trypanozoon*".

Suite à la dissection d'une partie des glossines, nous avons eu plus de glossines positives à *T. vivax*, puis *T. brucei* et moins avec *T. congolense*. Mais du fait de la mortalité élevée dans certains lots de glossines et en tenant compte du taux d'infection, du nombre de moutons disponibles, nous avons choisi d'utiliser les mâles et femelles de *Glossina morsitans submorsitans* infectées avec *T. vivax*, les femelles de *Glossina morsitans submorsitans* infectées avec *T. congolense* pour infecter respectivement les moutons E010, E011, E012.

III. 8. Infection des moutons

Après la dissection qui a lieu à la fin du cycle trypanosomien, les lots de glossines les plus infectées sont utilisés pour l'infection des moutons. Ces glossines ont été gardées à jeun pendant 2 à 3 jours. Ensuite, les cages ont été appliquées sur les flancs rasés des moutons pendant 30 à 60 mn durant une semaine. Pendant l'alimentation des glossines sur les moutons, les cages sont recouvertes d'un tissu noir car les glossines sont guidées par un phototactisme négatif d'où sa nette préférence pour les endroits les plus obscurs. La parasitémie des moutons a été suivie pendant 2 à 3 jours par la méthode du « *buffy-coat* ». Le sang des moutons positifs a été conservé sous forme de stabilats.

III. 9. Traitement de données

Le logiciel Excel 2003 a été utilisé pour le tracé des graphiques et le traitement des données. Les glossines ont été échantillonnées selon un mode aléatoire dans les cages. La détermination des taux d'infection (T.I.) des glossines est donnée en pourcentages de glossines porteuses de trypanosomes pleinement développés au niveau des pièces buccales, de l'intestin moyen ou des glandes salivaires (Nekpeni et *al.*, 1991).

$$T.I = \frac{\text{Nombre de glossines parasitées}}{\text{Total de glossines disséquées}} \times 100$$

Tous les taux d'infection ont été comparés deux à deux à l'aide du test de χ^2 à 4 cases qui correspond au test de Pearson. Ce test est choisi lorsque l'on désire comparer deux pourcentages observés sur deux échantillons. Il s'applique dans les conditions suivantes lorsque tous les effectifs théoriques n_{1t_1}/N , n_{1t_2}/N , n_{2t_1}/N , n_{2t_2}/N sont supérieurs ou égaux à 5. La formule simplifiée du test du χ^2 à 4 cases est strictement équivalente à la formule générale :

$$\chi^2 = \frac{N(ad - bc)^2}{n_1 n_2 t_1 t_2} \quad \text{ddl} = 1$$

Le résultat est exprimé de façon unilatérale tel que:

- Lorsque $\chi^2 < 2,71$: rejet de H_0 (Non) $\Rightarrow p_1$ ne diffère pas significativement de p_2
- Lorsque $\chi^2 > 2,71$: rejet de H_0 (Oui) $\Rightarrow p_1$ est significativement supérieur / inférieur à p_2

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats

I. 1. Base de données Access

La base de données Access 2003 regroupe tous les stabilats de trypanosomes viables dont dispose le CIRDES. Cette base prend en compte les paramètres suivants des stabilats de trypanosomes tels que l'espèce, le code, la position, la date de l'isolement, le stock et l'origine. Avec cette base Access, il suffit de soumettre des requêtes pour avoir l'information voulue.

I. 2. Culture de souches d'*Ehrlichia ruminantium*

I. 2. 1. Viabilité des souches

Au total, 7 moutons ont été inoculés avec les différentes souches à isoler (**Tableau I**). Les moutons E041, E042, E056 respectivement inoculés avec les souches *KDB*, *Inc1*, *BK242* ont manifesté une hyperthermie entre J14 et J19 (**Figure 2**) et leur sang a été mis en culture. Par contre, les températures des moutons E054 et E043, inoculés avec la souche *Inc3BA103S* et E055 inoculé avec la souche *BK433 (E008)* sont restées stationnaires (**Figure 2**) et n'ont pas permis la mise en culture de ces souches. Le résultat positif obtenu à la suite de l'examen du cortex de l'animal E055 nous a conduit à inoculer son sang conservé sous forme de stabilat, à l'animal E044 malgré une hyperthermie voisine de 40 °C. Comme cette souche semble apte à tuer de façon brutale, sans être hyperthermisante, nous avons décidé de réaliser sa mise en culture quand l'animal fit une légère hyperthermie de 39,9 °C.

Au moment de l'hyperthermie, ces animaux sont traités. Parmi les 3 moutons qui ont manifesté l'hyperthermie, 2 sont morts (E041, E056) et leurs frottis du cortex se sont révélés positifs (**Tableau I**). Le mouton E055 est mort sans hyperthermie avec un frottis du cortex positif. Les résultats du test ELISA se sont révélés positifs chez les moutons E042, E044 et négatifs chez E054, E043, qui ont tous survécu à l'infection.

Tableau I : Récapitulatif des résultats de l'hyperthermie, des frottis et de l'ELISA des sept (7) moutons.

Souche inoculée	N°Animal	Hyperthermie (40-41 °C)	Issue	Frottis	Statut PPR	Mise en culture
<i>KDB (E012)</i>	E041	J14-J15	Mort à J20	Positif	-	Oui
<i>Inc1 (ov479)</i>	E042	J16-J17	Vivant	non réalisé	+	Oui
<i>Inc3BA103S</i>	E054	-	Vivant	non réalisé	-	Non
<i>Inc3BA103S</i>	E043	-	Vivant	non réalisé	-	Non
<i>BK433 (E008)</i>	E055	-	Mort à J18	Positif	-	Non
<i>BK433 (E055)</i>	E044	-	Mort à J15	Positif	+	Oui
<i>BK242 (P/S)</i>	E056	J16-J19	Mort à J21	Positif	-	Oui

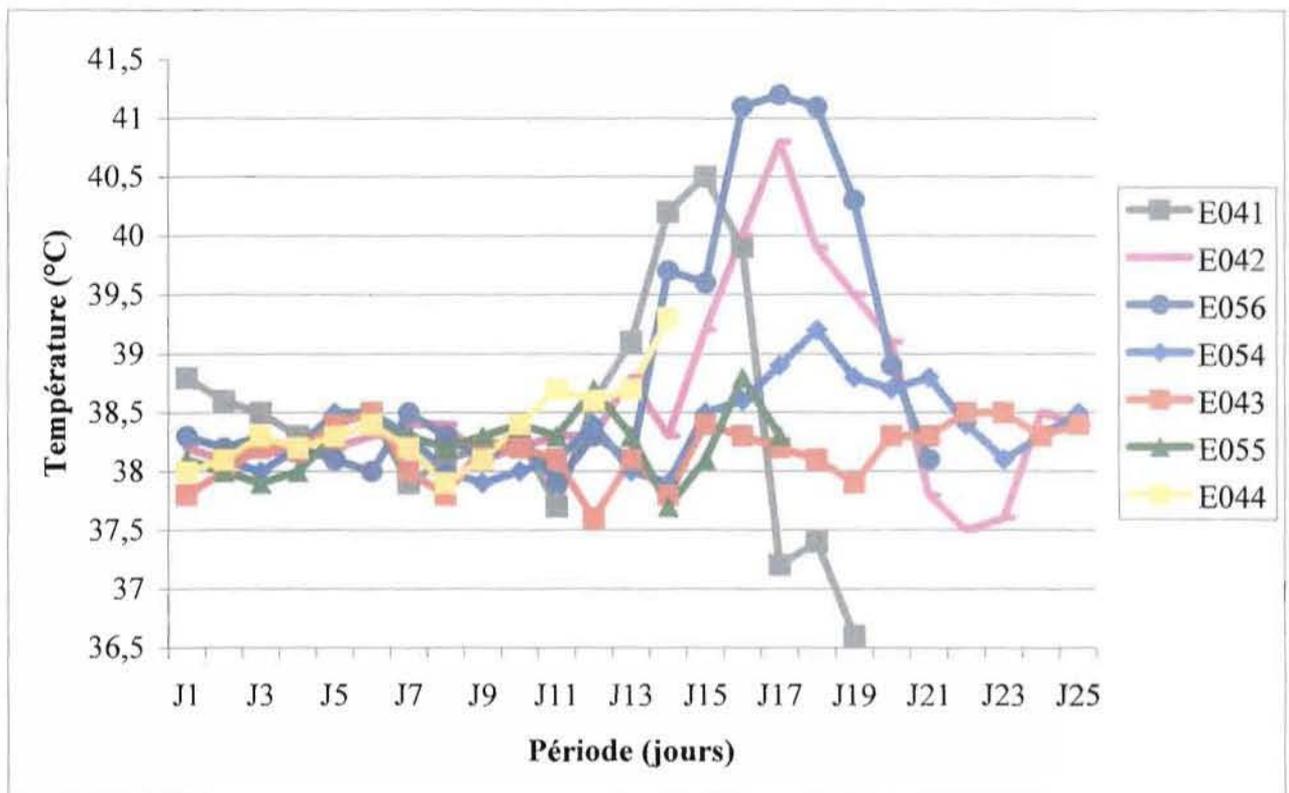


Figure 2 : Evolution thermique des moutons.

I. 2. 2. Culture *in vitro*

La mise en culture de ces différentes souches a permis l'isolement et la culture des souches *BK433S (E055)* et *BK242/P/S* sur BAEC (**Figure 3**). Les 2 autres souches du groupe des inconnues, *Inc1/ov479* et *KDB/E012* sont toujours en culture.



Figure 3 : Amas de *cowdria* de la souche *BK 242* sur BAEC



Figure 4 : Tapis de BUEC sur la boîte de culture Falcon 25 cm²

Le **tableau II** présente la durée de l'isolement *in vitro* des souches *d'Ehrlichia ruminantium* sur des cellules BAE correspondant à la première lyse et la durée d'apparition de la lyse après le passage sur de nouvelles cellules. Par contre sur les cellules de lignée BUE, nous n'avons pas observé de lyse et la culture se poursuit car ces cellules possèdent une double paroi.

Tableau II : Températures, durée d'isolement et de mise en culture des souches

Souche à isoler	Date d'isolement	Température d'isolement (°C)	Durée 1 ^{ère} lyse en jours	Durée 2 ^{ème} lyse en jours
<i>BK242 (P/S)</i>	29/07/06	41,2	103	51
<i>BK433S (E44)</i>	23/07/06	39,9	107	28
<i>KDB (E012)</i>	26/07/06	40,5	En culture	----
<i>Inc1 (ov479)</i>	28/07/06	40	En culture	----
<i>Inc3BA103S</i>	Non isolé	----	----	----

I. 3. Confection des doses de challenge

Dans les deux groupes ayant reçu les dilutions de 1/10^{ème} et 1/50^{ème}, tous les animaux sont morts entre J18 et J20 après une hyperthermie apparue entre J12 et J16. La mortalité enregistrée dans ces groupes est alors de 100 %. Les frottis des cortex se sont tous révélés positifs pour les animaux morts. Deux des moutons morts, E067 et E059 se sont révélés positifs à l'ELISA. Dans le dernier groupe qui a reçu la dilution de 1/200^{ème}, un seul animal a survécu sans manifester de l'hyperthermie (**Tableau III**).

Tableau III : Résultats des doses de challenge avec la souche BK 242

	N°mouton	Hyperthermie (40-41 °C)	Issue	Frottis du cortex	Statut PPR (>20 %)	Taux de mortalité
Dilution 1/10	E062	J13-J18	Mort à J20	Positif	-	100 %
	E067	J12-J17	Mort à J18	Positif	+	
	E068	J14	Mort à J16	Positif	-	
Dilution 1/50	E046	J12-J17	Mort à J18	Positif	-	100 %
	E048	J14-J17	Mort à J18	Positif	-	
	E059	J12-J19	Mort à J20	Positif	+	
Dilution 1/200	E065	-	Vivant	-	-	66 %
	E066	J14-J17	Mort à J18	Positif	-	
	E050	J16-J17	Mort à J19	Positif	-	

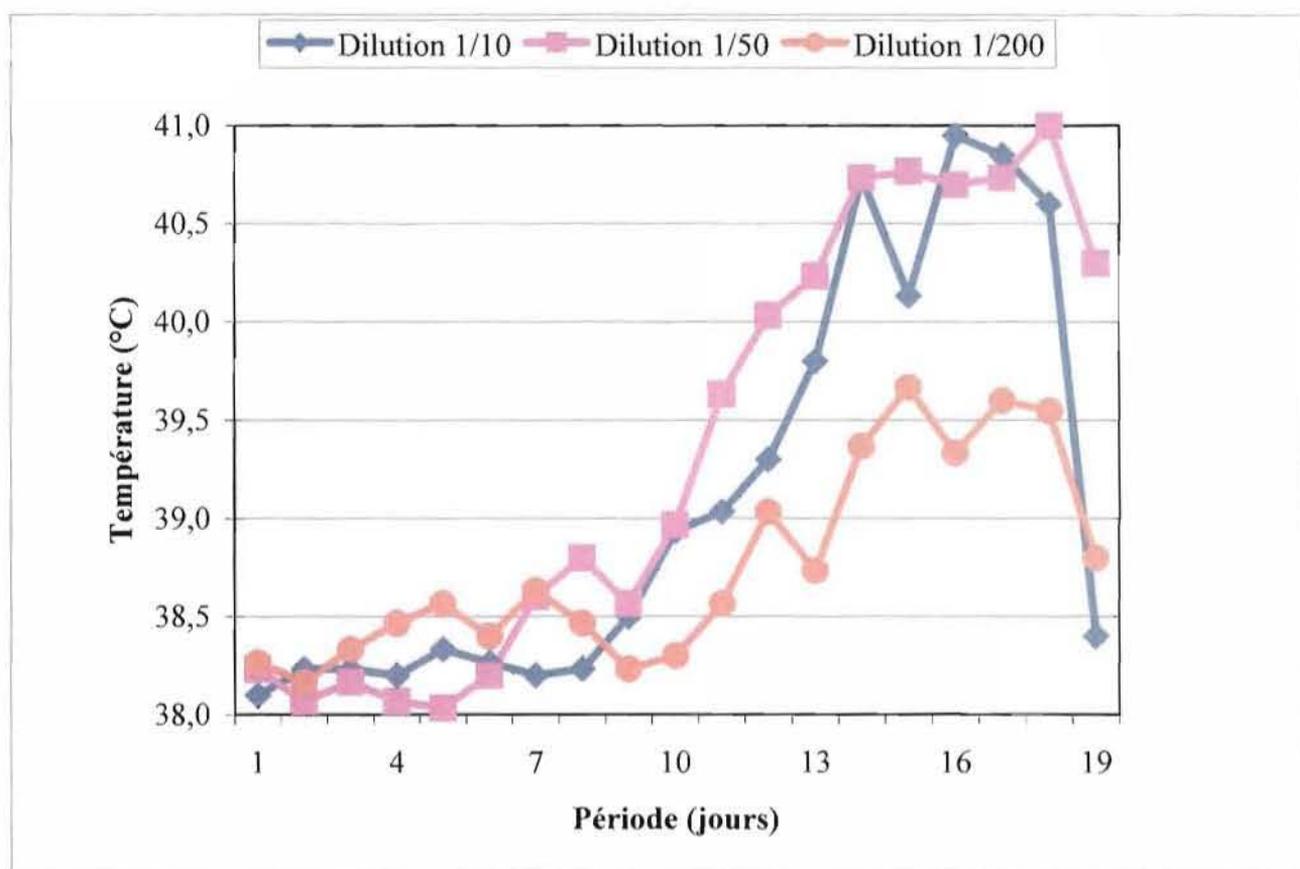


Figure 5 : Evolution des températures moyennes par groupe d'animaux infectés

La figure 5 permet de mettre en évidence un « effet-dose » sur le niveau d'hyperthermie dans les différents groupes. Nous notons bien un effet-dose avec le groupe 3 qui ne fait pas d'hyperthermie même si l'incubation est plus courte avec la dilution 1/50.

Pour l'infection avec *T. vivax*, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les mâles (75 %) et les femelles (70 %) de *Glossina morsitans submorsitans* ($\chi^2 = 0,125 < 2,71$) ; entre les mâles (35 %) et les femelles (20 %) de *Glossina palpalis gambiensis* ($\chi^2 = 1,13 < 2,71$) et enfin les mâles (60 %) et les femelles (45 %) de *Glossina tachinoïdes* ($\chi^2 = 0,90 < 2,71$). Par contre, avec *T. brucei*, nous avons obtenu un taux d'infection de 20 % avec les mâles de *Glossina morsitans submorsitans* et *Glossina tachinoïdes* ; un taux nul avec les femelles de *Glossina morsitans submorsitans* et *Glossina tachinoïdes*. Mais nous n'avons pas noté de différence significative entre les mâles (50 %) et les femelles (40 %) de *Glossina palpalis gambiensis* ($\chi^2 = 0,085 < 2,71$).

Pour l'infection à *T. congolense*, nous avons obtenu un taux d'infection nul avec *Glossina morsitans submorsitans* mâles et 40 % avec *Glossina morsitans submorsitans* femelles ; un taux de 15 % avec *Glossina palpalis gambiensis* mâles et un taux nul avec *Glossina palpalis gambiensis* femelles et enfin, un taux nul avec *Glossina tachinoïdes* mâles et femelles. Ces résultats sont consignés dans le **tableau IV**. Il faut noter que ces glossines infectées avec *T. vivax*, *T. brucei* et *T. congolense* ont été maintenues respectivement pendant 32, 38 et 48 jours avant d'être disséquées. Ainsi nous considérons que le cycle de développement des trypanosomes au sein des glossines a pu se boucler complètement.

I. 5. 1. 2. Espèces de trypanosomes parasitant les glossines mâles

Suite aux infections par les 3 espèces de trypanosomes, les résultats ont révélé une différence significative pour *Glossina morsitans submorsitans* mâles infectées par *T. vivax* (75 %) plutôt qu'infectées par *T. brucei* (20 %) ($\chi^2 = 12,13 > 2,71$) ; entre *Glossina tachinoïdes* mâles infectées par *T. vivax* (60 %) plutôt qu'infectées par *T. brucei* (20 %) ($\chi^2 = 6,67 > 2,71$). Par contre pour *Glossina palpalis gambiensis* mâles, nous avons aussi relevé une différence significative entre l'infection à *T. brucei* (50 %) et à *T. congolense* (15 %) ($\chi^2 = 5,58 > 2,71$) mais pas entre *T. vivax* (35 %) et *T. congolense* (15 %) ($\chi^2 = 2,13 < 2,71$) ni *T. vivax* et *T. brucei* ($\chi^2 = 0,92 < 2,71$).

I. 5. 1. 3. Espèces de trypanosomes parasitant les glossines femelles

Pour *Glossina morsitans submorsitans* femelles, les résultats ont révélé une différence significative entre l'infection à *T. vivax* (70 %) et *T. congolense* (40 %) ($\chi^2 = 3,64 > 2,71$), par contre pour *Glossina palpalis gambiensis* femelles, nous n'avons pas noté de différence significative entre l'infection à *T. vivax* (20 %) et à *T. brucei* (40 %) ($\chi^2 = 1,07 < 2,71$).

I. 5. 2. Infection des moutons

Les 3 moutons Djallonkés sont tous positifs à l'infection des trypanosomes. Le suivi parasitémiq ue de ces moutons est illustré dans le tableau ci-dessous avec des périodes prépatentes variables en fonction de l'espèce de trypanosome, de l'état physiologique de l'hôte.

Tableau V : Résultats du suivi infectieux des 3 moutons

N° Mouton	Glossines utilisées pour l'infection	Période prépatente	Suivi parasitémiq ue (tryp/ml)	Etat
E010	<i>Glossina morsitans submorsitans</i> ♂ infectées à <i>T. vivax</i>	J1 - J21	$> 5.10^6$	Mort à J35
E011	<i>Glossina morsitans submorsitans</i> ♀ infectées à <i>T. vivax</i>	J1 - J26	$10^6 - 4.10^6$	Vivant
E012	<i>Glossina morsitans submorsitans</i> ♀ à <i>T. congolense</i>	J1 - J15	$> 2,5.10^6$	Vivant

II. Discussion

II. 1. Culture de souches d'*Ehrlichia ruminantium*

Les résultats de l'ELISA, des frottis du cortex ainsi que de l'hyperthermie nous ont permis de confirmer la viabilité des souches *KDB (E012)*, *Inc1 (ov479)*, *BK433 (E008)* et *BK242 (P/S)*. La mise en culture *in vitro* de ces souches nous a permis d'isoler et de cultiver *BK242 (P/S)*, *BK433S (E044)* sur BAEC. Les deux souches inconnues *KDB (E012)*, *Inc1 (ov479)* sont toujours en culture. L'effet cytopathogène induit par ces souches n'a pas permis la lyse des tapis cellulaires et le passage sur de nouvelles boîtes. Au niveau des lignées BUEC, la lyse serait très lente à cause de la structure morphologique du tapis qui se dépose en plusieurs couches, ce qui le rend épais et dense.

Il est à noter que lorsqu'on arrive à isoler une souche, la durée de sa mise en culture pour l'obtention d'une lyse dépend du volume d'inoculum que l'on inocule dans la boîte de culture. Mais cette durée est aussi variable en fonction des souches. Ainsi nos résultats ont montré que pour obtenir une lyse synchronisée d'environ deux semaines, il faudrait au moins 2 ml d'inoculum provenant d'une lyse à 80 – 90 % du premier isolement.

Chez les moutons, la période d'incubation a été plus ou moins longue en fonction de l'état physiologique des moutons et de la virulence des souches. L'hyperthermie a été constatée chez les moutons dans l'intervalle J12 - J20. Ces résultats obtenus sont en accord avec ceux de **Stachurski (2001)** qui stipulent que l'incubation dure 10 à 20 jours.

Par contre, les 2 moutons E043 et E054 inoculés avec la souche *Inc3BA103S*, n'ont pas manifesté d'hyperthermie, et sont restés vivants et séronégatifs. Ces résultats nous ont permis de conclure que la souche *Inc3BA103S* non isolée serait soit non viable, soit non virulente (infectieuse) pour provoquer une réaction humorale très élevée détectable par l'ELISA dont le seuil de positivité est de 20 %.

II. 2. Confection des doses de challenge

L'inoculation des moutons avec la souche *BK242* a donné les résultats suivants : 100 % de mortalité aux dilutions 1/10, 1/50 et 66,66 % à la dilution 1/200. Les 8 moutons morts ont

tous leur frottis du cortex positif. Le mouton E068 mort à J16 a probablement développé la forme suraiguë de la maladie.

Quant à l'animal survivant E065, il aurait contrôlé l'infection après l'inoculation de la dose 1/200^{ème}. Du reste, il n'a pas fait de séroconversion. Cette dilution semble être le seuil à ne pas dépasser pour obtenir la mortalité des animaux. Au vu de ces résultats, la dilution 1/50^{ème} sera retenue comme dose de challenge pour les essais de protection croisée.

II. 3. Culture *in vivo* des trypanosomes

T. brucei se cultive bien sur les rats *Wistar* avec des parasitémies élevées ($>10^7$ tryp/ml), suivi de *T. vivax* avec des parasitémies peu élevées (3.10^6 - $7,5.10^6$ tryp/ml). La culture est parfois inopérante avec *T. vivax*, qui infecte peu les rongeurs (**Bengaly, 2001**). Ces résultats corroborent les travaux de **Smith et al., (1982)**. Par contre, la culture de *T. congolense* s'est avérée difficile avec de faibles parasitémies ($2,5.10^6$ - 5.10^6 tryp/ml) suivie de mortalité des rats. Ainsi, la capacité des souches à se multiplier sur rongeurs est très variable.

II. 4. Compétence vectorielle

II. 4. 1. Taux d'infection

Les résultats des taux d'infection nous montrent qu'il y'a un phénomène de réceptivité et de résistance des glossines aux infections trypanosomiennes. Plusieurs hypothèses souvent controversées sont avancées pour élucider ce phénomène. **Wilson et al., (1972)** ont émis l'hypothèse que le sang de certains hôtes pourrait inhiber l'infection des trypanosomes chez les glossines et pourrait jouer ainsi un rôle direct sur le taux d'infection. De même, il a été établi que l'origine du repas de sang pouvait avoir une influence sur les pourcentages d'infection (**Moloo, 1981**), de même que la nature de l'hôte au cours des repas de sang ultérieurs (**Geigy et al., 1971**). Ceci pourrait expliquer nos faibles taux d'infection obtenus avec *T. congolense* et *T. vivax* que nous avons eu du mal à multiplier sur les rats, avec des parasitémies plus ou moins élevées. Il pourrait aussi être responsable de la mortalité élevée des glossines.

Les travaux menés par **Reifenberg et al., (1997)** leur permirent de conclure que certaines espèces de glossines seraient réfractaires à la méthode artificielle d'alimentation. Et aussi, cette alimentation par l'intermédiaire de la membrane de silicone serait à l'origine des faibles

taux d'infection, voire nuls des glossines. Cet état de fait entre en étroite ligne avec nos résultats obtenus surtout avec *T. congolense* et *T. brucei*.

Plus récemment, plusieurs études ont suggéré que les réactions immunologiques spécifiques de la mouche tsé-tsé contre le trypanosome interféraient probablement avec l'établissement, la multiplication et la maturation des trypanosomes au sein de la glossine (Aksoy et al., 2003), voire même la compétence vectorielle.

Maudlin et Welburn., (1988) estiment que la sensibilité des tsé-tsé à *T. congolense* est héréditaire et reste associée à la présence des Rickettsie-like organisms (RLOs). Ces symbiontes influent sur la compétence vectorielle des glossines en produisant la chitinase (Welburn et al., 1992). C'est une enzyme entrant dans la synthèse de la chitine qui est une substance organique constituant le squelette des glossines. Elle entre dans la constitution de la membrane péritrophique dont la chitination constitue une barrière physique qui empêche la poursuite du cycle biologique des trypanosomes (Harmsen, 1973).

Nos résultats montrent que la proportion de glossines infectées par *T. vivax* est élevée par rapport à celle des glossines infectées par *T. congolense*. Ces données corroborent les résultats obtenus par **Nekpeni et al., (1991)**, qui affirment que la proportion de glossines infectées par *T. vivax* est généralement plus élevée que celle infectée par *T. congolense* aussi bien au laboratoire que sur le terrain.

II. 4. 2. Relation parasitisme et sexe de la glossine

Nos résultats ont montré une inégalité des taux d'infection entre mâles et femelles. Par contre, nos résultats globaux indiquent que les mâles sont plus susceptibles que les femelles. Des études antérieures menées par **Distelmans et al., (1982)**; **Moloo et al., (1992)** sur des glossines et des souches de *T. congolense* ont confirmé cette tendance.

De même, **Maudlin et al., (1991)** ont constaté que les mâles étaient aussi susceptibles que les femelles à partir de deux souches de *T. congolense*, tandis que les mâles étaient plus infectés que les femelles avec plusieurs sous espèces de *T. brucei*.

Les résultats contradictoires prouvent que le sexe peut jouer une fonction importante dans les prévalences d'infection, ce qui dépend également du génome de la mouche tsé-tsé (**Distelmans et al., 1985**), des souches de trypanosomes et des conditions (comme la température) qui affectent la mouche tsé-tsé dans le laboratoire.

Toutes ces observations ne relèvent que de faits de laboratoire. D'une part nos glossines d'élevage sont adaptées depuis de nombreuses années aux conditions artificielles de l'insectarium, d'autre part les souches clonales de parasite sont un reflet hautement simplifié de l'hétérogénéité génétique rencontrée sur le terrain. Donc il va s'en dire que ces facteurs conditionnent la compétence vectorielle des glossines.

II. 4. 3. La transmission du trypanosome

Les glossines infectées, appliquées aux moutons ont pu leur transmettre les trypanosomes mais avec des périodes prépatentes variables. La durée de ces périodes (de la 1^{ère} application des glossines à la détection du parasite dans le sang) varie généralement de 1 à 3 semaines, en fonction de l'espèce et de la souche de trypanosome, du nombre de trypanosomes injectés et de l'état immunitaire de l'hôte (**Clausen et al., 1993**). La capacité de la glossine à transmettre les trypanosomes est sous la dépendance de plusieurs facteurs encore mal définis. Des travaux menés par **Maudlin et Welburn (1987, 1988, 1994)** ainsi que **Welburn et al., (1989, 1993, 1994)** permettent de mieux comprendre le cycle du trypanosome et les modalités de l'installation de l'infection. Selon ces auteurs, la glossine est naturellement réfractaire à l'infection par les trypanosomes car elle dispose d'une enzyme appelée lectine, le GlcNAc/glucosamine qui, sécrétée au niveau de l'intestin, provoque la mort des trypanosomes procycliques. Ils vont plus loin avec l'hypothèse que la lectine intestinale qui empêche l'infection de s'installer est, en même temps, nécessaire à la maturation du trypanosome, tout dépendant de la quantité de stimuli : dans un cas la population de trypanosomes reçoit un signal de maturation, dans l'autre cas un signal de mort (apoptose).

Les glossines infectées (*Glossina morsitans submorsitans mâles* et *femelles* infectées à *Trypanosoma vivax* et *Glossina morsitans submorsitans femelles* infectées à *Trypanosoma congolense*) ont pu assurer l'installation, la multiplication, la maturation des trypanosomes en leur sein : ces glossines sont alors compétentes à transmettre l'infection. Appliquées aux moutons, elles sont arrivées à transmettre les trypanosomes. Ainsi, malgré tous les facteurs divers, ces glossines ont préservé leur compétence vectorielle.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Cette étude nous a permis d'une part, d'isoler les souches d'*Ehrlichia* BK433S (E055), BK242/P/S ; de déterminer la dose de challenge qui est la dilution 1/50^{ème}.

Les perspectives d'études envisagées après ces travaux sur les *Ehrlichia* sont :

- Procéder à l'isolement et à la culture des souches locales d'*Ehrlichia ruminantium* réfractaires en variant les composants du milieu de culture ;
- Effectuer des passages en « aveugle » c'est à dire sans avoir un effet cytopathogène avec 80 % de lyse ;
- Effectuer, sur les surnageants récupérés lors de ces passages, des PCR visant à mettre en évidence ces souches inconnues ;
- Effectuer des protections croisées avec la dose challenge pour vérifier l'homogénéité des scores cliniques.

D'autre part, cette étude nous a aussi permis d'évaluer les taux d'infection des glossines vis-à-vis de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei*. La détermination du taux d'infection autorise par déduction l'évaluation des possibilités des mouches tsé-tsé à se contaminer à partir des animaux. Le taux d'infection des glossines par les trypanosomes fournit des renseignements sur la transmission de la maladie et participe donc à la compréhension de l'épidémiologie des trypanosomoses animales africaines. La compétence vectorielle d'une espèce de glossine pour une espèce de trypanosome dépendra donc de la conjugaison de plusieurs aptitudes à savoir :

- le pouvoir de s'infecter en se nourrissant sur une ou plusieurs espèces hôtes réservoirs ;
- la possibilité de développer une infection dans son organisme.

Ces aptitudes sont en relation étroite avec de nombreux facteurs que l'on peut classer en :

- facteurs intrinsèques de la glossine (espèce, sexe, âge physiologique, préférences alimentaires...);
- facteurs écologiques (facteurs climatiques, disponibilité des hôtes...).

Au niveau des glossines, les perspectives d'études envisagées sont :

- Évaluer le taux d'infection des glossines en tenant compte des préférences trophiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adakal E. H. H. (2004).** Utilisation des techniques Nested PCR et RFLP pour la détection et la caractérisation génétique d'*Ehrlichia ruminantium* au Burkina Faso. Mémoire de DEA de Biologie animale. UCAD. 60p.
2. **Aksoy S., Gibson W. C. et Lehane M. J. (2003).** Interactions between *tsetse* and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Advances in Parasitology*. **53**: 1 – 83.
3. **Authié E., Bringaud F., Bakalara N., Tetaud E. et Baltz T. (1999).** Trypanosomoses humaines et animales : maladie du sommeil et Nagana. Annales de l'Institut Pasteur/Actualités. **10**. (1). 27-50. Elsevier, Paris.
4. **Barré N. (1997).** Les tiques des ruminants dans les Petites Antilles : biologie, importance économique, principes de lutte. *INRA Prod. Anim.* **10**(1) : 111-119.
5. **Bauer B. et Politzar H. (1982).** Laboratory maintenance of *Glossina palpalis gambiensis* in West Africa. Preliminary results of rearing on membranes IAEA. SM. 255/52. Vienna. 255-263.
6. **Bell-Sakyi L., Paxton E. A., Munderloh U. G. et Sumption K. J. (2000).** Growth of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, in a tick cell line. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1238-1240.
7. **Bengaly Z. (2001).** Techniques parasitologiques de laboratoire. In : Diagnostic et contrôle des hémoparasitoses animales et de leurs vecteurs. Cours international de formation tenu du 5 au 17 novembre 2001 au CIRDES. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. CIRAD-EMVT / CIRDES, 53-67.
8. **Bezuidenhout J. D., Paterson C. L. et Barnard B. J. H. (1985).** *In vitro* cultivation of *Cowdria Ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **52**: 113-120.
9. **Brett S., Bezuidenhout J. D. et De Weal D. T. (1992).** The establishment of an ovine cerebral endothelial cell line (SBE189) that supports the growth of *Cowdria ruminantium*. *J.S. Afr. Vet. Ass.* **63** : 87
10. **Camus E. (1987).** Contribution à l'étude épidémiologique de la cowdriose (*Cowdria ruminantium*) en Guadeloupe. Thèse Doc. Etat. Paris-Sud, Orsay, p 201.
11. **Camus E., Barré N., Martinez D. et Uilemberg G. (1996).** Heartwater (Cowdriosis): a review, 2nd ed. Office International des Epizooties, Paris, France.

12. Clausen P. H., Sidibé I., Bassinga A., Richard X., Bauer B. et Prohlit H. (1993). Pathogenesis and pathology of African trypanosomosis in Baoulé, N'Dama/Baoulé, cross bred and zebu cattle in Burkina Faso I. Clinical performance under high naturel tsetse challenge. *Trop. Med. Parasitol.* **44**: 99-107.
13. Cowdry E. V. (1925). Studies on the etiology of heartwater. I. Observation of *rickettsia*, *Rickettsia ruminantium* (Northern species), in the tissues of infected animals. *J. Exp. Med.* **42**: 231-252.
14. Cuisance D., Itard J., Desquesnes M., Frezil J. L. et De La Rocque S. (2003). Trypanosomoses : Epidémiologie. In : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Tome 2 : Maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires. Ed. TEC α DOC. Lavoisier. 1627-1650.
15. Distelmans W., D'Haeseleer F., Kaufman L. et Rousseeuw P. (1982). The susceptibility of *Glossina palpalis palpalis* at different ages to infection with *Trypanosoma congolense*. *Ann Soc belge Méd trop*, **62**: 41-47.
16. Distelmans W., Makumyaviri A. M., D'Haeseleer F., Claes Y., Le Ray D. et Gooding R. H. (1985). Influence of the salmon mutant of *Glossina morsitans morsitans* on the susceptibility to infection with *Trypanosoma congolense*. *Acta Tropica*, **42**: 143-148.
17. Du Plessis J. L. (1981). The application of the indirect fluorescent antibody test to the serology of heartwater. In: G.B. Whithead, J. D. Gibson, (Eds), Tick Biology and control, Tick research Unit, Grahamstown, South Africa. p 47-52.
18. Du Plessis J. L. (1982). Mice infected with a *Cowdria ruminantium*-like agent as a model in the study of heartwater. D.V.Sc. thesis. University of Pretoria. Pretoria, South Africa.
19. Dumler J. S., Barbet A. F., Beckker C. P. J., Dasch G. A., Palmer G. H., Ray S. C., Rikihisa Y. et Rurangirwa F. R. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2145-2165.
20. Euzeby J. P. (2001) Dictionnaire de bactériologie vétérinaire <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/ruminantium.html>

21. Geigy R. et Kauffmann M. (1971). Sleeping sickness survey in the Serengeti area (Tanzanie): Examination of large mammals for trypanosomes. *Acta trop*, **30**: 12-23.
22. Harmsen R. (1973). The nature of establishment barrier for *Trypanosoma brucei* in the gut of *Glossina pallidipes*. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **67**: 364-373.
23. Jongejan F., Thielemans M. J. C., Briere C. et Uilenberg G. (1991). Antigenic diversity of *Cowdria ruminantium* isolates determined by cross-immunity. *Rev. vet. Sci.* **51**: 24-28.
24. Kaboré I. (2001). Les vecteurs cycliques des trypanosomes du bétail et la lutte contre les glossines. In : Diagnostic et contrôle des hémoparasitoses animales et de leurs vecteurs. Cours international de formation tenu du 5 au 17 novembre 2001 au CIRDES. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. CIRAD-EMVT / CIRDES, 87-103.
25. Kaboré I. et Bauer B. (1984). L'élevage de *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank 1949 (Diptera : Muscidae) avec du sang lyophilisé importé de différentes espèces et avec du sang défibriné local de bœuf. Comparaison des performances obtenues. *Rev. Elev. Méd. Vet. Pays Trop.* **37** (1) : 35-41.
26. Kazadi J. M., Losson B. et Kageruka P. (2000). Compétence vectorielle des mouches non ténérales de *Glossina morsitans morsitans* (Souche Mall) infectées par *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* IL 1180. *Bull. Soc. pathol. exot.* vol. **93**, n° 2, pp. 125-128.
27. Laveissière C., Grébaut P., Herder S. et Penchenier L. (2000). Les glossines vectrices de la trypanosomiase humaine africaine : biologie et contrôle. *OCEAC/IRD*, ed, 246p.
28. Lloyd L. I. et Johnson W. B. (1924). The trypanosome infections of tsetse flie in Northern Nigeria and a new method of estimation. *Bull. Ent. Res.* **14**: 265-288.
29. Logan L. L., Whyard T. L., Quintero J. C et Mebus C. A. (1987). The development of *Cowdria ruminantium* in *neutrophilus*. *Onderst. J. Vet. Res.* **54**: 197-204.
30. Mahan S. M., Peter T. F., Simbi B. H. et Burridge M. J. (1998). PCR detection of *Cowdria ruminantium* infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of Zimbabwe. *Tropical Veterinary Medecine.* **849**: 85-87.
31. Maudlin I., Welburn S. C. et Milligan P. (1991). Salivary gland infection: a sex-linked recessive character in tsetse? *Acta Tropica.* **48**: 9-15.

32. Maudlin I., et Welburn S. C. (1987). Lectin-mediated establishment of midgut infections of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* in *Glossina morsitans*. *Trop. Med. Parasitol.* **38**: 167-170.
33. Maudlin I. et Welburn S. C. (1988). The role of lectins and trypanosome genotype in the maturation of midgut infections in *Glossina morsitans*. *Trop Med Parasitol.* **39**: 56-58.
34. Maudlin I. et Welburn S. C. (1994). Maturation of trypanosomes infections in tsetse. *Experimental Parasitology.* **79**: 202-205.
35. Mooloo S. K. (1981). Effects of maintaining *Glossina morsitans morsitans* on different hosts upon the vector's subsequent infection rates with pathogenic trypanosomes. *Acta tropica.* **38**: 125-136.
36. Mooloo S.K, Olubayo R. O, Kataba J.M et Okumu I.O. (1992). A comparison of African buffalo, N'Dama and Boran cattle as reservoirs of *Trypanosoma congolense* for different *Glossina* species. *Medical and Veterinary Entomology.* **6**: 225-230.
37. Ndoutamia G., Mbakasse R. N., Brahim A. et Khadidja A. (2002). Influence de la trypanosomose à *T.congolense* sur les paramètres hématologiques, minéraux et protéo-énergétiques chez les chèvres sahéliennes du Tchad. *Revue Méd. Vét.* **153** (6) 395-400.
38. Nekpeni E. B., Dagnogo M. et Eouzan J. P. (1991). Infection de *Glossina palpalis palpalis* (Diptera, Glossinidae) par les trypanosomes en zone forestière de Gagnoa en Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Parasitol.* **42** : 399-403.
39. Norval R. A. I. et MacKenzie P. K. I. (1981). The transmission of *Cowdria* by *Amblyomma sparsum*. *Vet. Parasitol.* **8**: 189-191.
40. Penchenier L. et Itard J. (1981). Une nouvelle technique de dissection rapide des glandes salivaires et de l'intestin des glossines. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. *Ent. Méd. et Parasitol.* Vol. **XIX**, n° 1: 55-57.
41. Peter T. F., Barbet A. F., Alleman A. R., Simbi B. H., Burridge M. J. et Mahan S. M. (2000). Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. *Journal of Clinical Microbiology.* **38** (4): 1539-1544.
42. Pollock J. N. (1992). Manuel de lutte contre la mouche Tsé-tsé. Volume 1 : Biologie, systématique et répartition des tsé-tsé. *FAO. Rome.* 1982 /1992. 310p.
43. Provost A. et Bezuidenhout J. D. (1987). The historical background and global importance of heartwater. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* **54**: 165-169.

44. Reifenberg J. M., Cuisance D., Frézil J. L., Cuny G. et Duvallet G. (1997). Comparison of the susceptibility of different species to simple and mixed infections with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* savannah and riverine forest types. *Med. vet. Entomol.* **11**: 246-252.
45. Sidibé I. (1996). Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense*, agent de la trypanosomose animale : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse de doctorat ès sciences, Université de Montpellier II / Sciences et Techniques du Languedoc, 92p + Annexes + Publications et résumés de communications et posters.
46. Smith C. J., Levine R. A. et Mansfield J. M. (1982). Cloning of African trypanosomes in mice immunosuppressed by cyclophosphamide treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**: 1098-1102.
47. Smith G. E., Anderson E. C., BurrIDGE M. J., Peter T. F. et Mahan S. M. (1998). Growth of *Cowdria ruminantium* in tissue culture endothelial cell lines from wild African mammals. *J. Wildlife Dis.* **34** (2): 297-304.
48. Stachurski F. (2001). La cowdriose. In: Diagnostic et contrôle des hémoparasitoses animales et de leurs vecteurs. Cours international de formation tenu du 5 au 17 novembre 2001 au CIRDES. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. CIRAD-EMVT / CIRDES. 186-193.
49. Totte P., Blankaert D., Marique T., Kirkpatrick C., Van Vooren J. P. et Werenne J. (1993). Culture de cellules bovines et humaines sur des microsphères de collagène et leur infection avec la rickettsie *Cowdria ruminantium*: perspectives pour la production des cellules et de vaccin. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* **46** (1-2): 153-156.
50. Uilenberg G. (1983). Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection): current status. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **27**: 427-80.
51. Uilenberg G., Barré N., Camus E., BurrIDGE M. J. et Garris G. I. (1984). Heartwater in the Caribbean. *Prev. Vet. Med.* **2**: 255-267.
52. Van Vliet A. H. M., Zeijst v. D., Camus E., Mahan S. M., Martinez D. et Jongejan F. (1995). Use of a specific immunogenic region of *C. ruminantium* MAP I protein in a serological assay. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2405-2410.
53. Walker J. B. et OLWAGE A. (1987). The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (*Ixodoidea, Ixodidae, genus Amblyomma*) and their distribution. *Onderspoort J. Vet. Res.* **54**: 353-379.

- 54. Welburn S. C. et Maudlin I. (1992).** The nature of the teneral state in *Glossina* and its role in the acquisition of trypanosome infection in tsetse. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **86**: 529-536.
- 55. Welburn S. C., Arnold K., Maudlin I. et Gooday G. W. (1993).** *Rickettsia*-like organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. *Parasitology.* **107**: 141-145.
- 56. Welburn S. C., Maudlin I. et Molyneux D. H. (1994).** Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Med. Vet. Ent.* **8**: 81-87.
- 57. Welburn S. C., Maudlin I. et Ellis D. (1989).** Rate of trypanosome killing by lectins in midguts of different species and strains of *Glossina*. *Med. Vet. Entomol.* **3**: 77-82.
- 58. Wilson A. J., Dar F. K. et Paris J. (1972).** A study on the transmission of salivarian trypanosomes isolated from wild tsetse flies. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* **4**: 14 – 22.

ANNEXES

Annexe I : Composition du milieu de culture Glasgow (BHK21 (5x)) pour 500 ml

- 400 ml d'eau stérile
- 100 ml de milieu (5x)
- 25 ml de Bicarbonate (NaHCO_3) 5,5 %
- 50 ml de Sérum de veau fœtal à 10 % décomplémenté à 55 °C pendant 30 mn
- 5 ml de Pénicilline Streptomycine (100x)
- 5 ml de Fongisone (100x) 5 µg/ml final
- 5 ml de Tryptose Phosphate Broth (100x)
- 5 ml de L-glutamine (100x) concentration finale 2 mM (On peut éventuellement mettre deux doses)

NB : Conserver le milieu 24 heures à l'étuve avant utilisation

Annexe II : Préparation des solutions pour milieu de culture cellulaire Glasgow BHK 21

- Respecter la procédure de lavage et d'autoclavage

- **Flacon de L-Glutamine (100x)**

Concentration finale 2 mM

Solution 100x pour 100 ml \longrightarrow 2,923 g/100 ml d'eau

Faire dissoudre la glutamine dans de l'eau stérile. Compléter à 100 ml puis filtrer sous la hotte (filtre de 0,2 µm)

Faire des aliquots de 5 ou de 10 ml et congeler à - 20 °C

- **Flacon de Tryptose Phosphate Broth (100x)**

Solution 100x pour 100 ml \longrightarrow 29,5 g/100 ml d'eau

Faire dissoudre le Tryptose Phosphate Broth dans de l'eau bidistillée sur un agitateur. Compléter à 100 ml puis faire des aliquots de 10 ml. Autoclaver (jusqu'à faire noircir) et stocker à + 4 °C

- **Flacon d'Antibiotique**

Solution 100x pour 100 ml

Pénicilline-----0,6 g

Streptomycine-----1,305 g

Faire dissoudre les deux antibiotiques dans de l'eau stérile, compléter à 100 ml puis filtrer (filtre de 0,2 µm). Faire des aliquots de 5 ou 10 ml et congeler à - 20 °C.

- **Flacon d'Amphotéricine B (Fongisone)**

Concentration finale 5 µg/ml

Selon le conditionnement, reconstituer pour avoir une solution stérile 100x (50 mg/100 ml)

- **Flacon de Bicarbonate Sodium 5,5 % (NaHCO_3)**

5,5 g/100 ml

Faire dissoudre dans de l'eau stérile, compléter à 100 ml, filtrer (0,2 µm) et stocker à + 4 °C.

- **Flacon de Gélatine**

Peser la gélatine, la mettre dans un flacon puis rajouter de l'eau bidistillée et Autoclaver. Stocker à + 4 °C.

- **Flacon de trypsine EDTA 0,05 % final**

Solution 10x pour 250 ml

NaCl-----	20 g
KCL-----	0, 5 g
Na ₂ HPO ₄ -----	2,87 g
KH ₂ PO ₄ -----	0,5 g
EDTA Na ₂ -----	0,5 g
TRYPISINE-----	1,25 g
ROUGE DE PHENOL à 1 %-----	0,5 ml

Faire dissoudre dans de l'eau stérile, laisser agir plus de 3 heures, ajuster le pH à 7,8 avec une solution de NaOH 1 N, compléter le volume à 250 ml, puis filtrer (0,2 µm), aliquoter et stocker à - 20 °C

NB : - Tous les matériels utilisés pour la préparation des tampons doivent subir la procédure de lavage et être stériles.

- Les réactifs doivent se trouver dans la pièce réservée pour la culture cellulaire et les flacons dans l'armoire de la laverie réservée à cet effet.

Annexe III : Culture de cellules endothéliales bovines :

La manipulation se fait sous la hotte en conditions stériles.

• **Trypsination des cellules**

- Les BAEC et BUEC peuvent être multipliées en 1 ou 2 boîtes. Pour cela, les cellules doivent être confluentes. Enlevons du milieu de culture soit un volume $V = 6$ ml et Mettons 500 µl de trypsine (1ml pour TC 25 cm²)

- Puis laissons incuber 2 minutes (pendant ce temps, préparer 2 T 25 cm² en notant la lignée cellulaire ainsi que le passage des cellules sur les boîtes)

- Enlevons ensuite la trypsine et Mettons 500 µl de trypsine

- Laisser incuber 2-3 mn (pendant ce temps, mettre 5 ml de milieu /boîte nouvellement préparée), secouer énergiquement la boîte entre les mains afin de décoller les cellules. Une fois les cellules bien décollées, ajouter 1,5 ml de milieu et homogénéiser le tout en prélevant et rejetant le milieu sur les parois de la boîte afin de dissocier les amas cellulaires

- Divisons le volume prélevé 1 ml/boîte dans 2 T 25 cm² et ouvrons le bouchon des boîtes afin d'équilibrer le pH avec le CO₂

- Enfin, incubons à l'étuve à 37 °C, à 5 % de CO₂.Après 24 h, renouveler le milieu puis tous les trois jours

NB : Il n'est plus nécessaire d'ouvrir le bouchon des boîtes lorsque les cellules sont à confluence (en général 2 jours avant trypsination), le milieu s'équilibre tout seul. Les cellules peuvent ainsi être maintenues au moins pendant une semaine. Il est conseillé pour l'infection avec *Ehrlichia ruminantium* d'utiliser des cellules trypsinées 2-3 jours avant infection afin d'éviter le décollement du tapis cellulaire et afin d'avoir des cellules physiologiquement saines.

• **Congélation des cellules confluentes BAE et BUE**

- Enlevons le milieu ($V = 6$ ml de milieu de culture) et mettons 500 µl de trypsine (1 ml pour T 25 cm²) puis, laissons incuber 2-3 minutes

- Secouer énergiquement la boîte entre les mains afin de décoller les cellules. Une fois les cellules bien décollées, ajoutons 4 ml de milieu et homogénéiser le tout en prélevant et rejetant le milieu sur les parois de la boîte afin de dissocier les amas cellulaires

- Puis, récoltons le surnageant pour le mettre dans un tube stérile et centrifugeons 5 mn à 1800 trs/mn

- Enlevons ensuite le surnageant et resuspendre le culot dans du sérum de veau fœtal avec 10% de DMSO (1 TC 25 cm²/1 cryotube)
- Enfin, mettons les cryotubes dans une boîte de congélation (spéciale avec isopropanol) ou dans une boîte en polystyrène avec de l'essuie tout et laisser à - 80 °C pendant 2 jours avant de transférer en azote liquide

Annexe IV : Isolement des souches de *Cowdria*

❖ A partir du sang infecté

1. Mettre en culture les cellules à infecter en petites boîtes (T 25 cm²) si possible différentes lignées BAEC et BUEC

2. Injecter à un mouton naïf environ 1,5 ml de sang infecté de cowdria en intraveineuse

- Prendre quotidiennement sa température
- Au moment du pic (plus de 40 °C), faire la prise de sang sur tube hépariné de Na pour l'isolement et la congélation
- Faire également des prises de sang sur tubes secs pour la sérologie
- Sous la hotte, prendre le tube pour l'isolement et le passer 3 fois à la seringue montée d'une aiguille à insuline (pour casser les cellules)
- Puis diluer le sang au ½ avec du milieu de culture (GMEM SVF + TPB)
- Et mettre environ 2 ml par boîte (T 25 cm²) et infecter plusieurs boîtes (le tapis cellulaire des boîtes doit être confluent et beau)
- Mettre ces boîtes en agitation faible sur le rocker à l'étuve pendant 2 heures
- Après faire deux lavages doucement pour enlever tout le sang avec du milieu simplifié ne contenant ni nutriment, ni antibiotique (eau + milieu + bicarbonate)
- Ajouter du milieu neuf (GMEM SVF + TPB) et laisser à l'étuve
- Changer le milieu régulièrement et observer le tapis cellulaire jusqu'à la lyse.

3. Lyse du tapis cellulaire à 80-90 %

- Grattage de ce tapis cellulaire
- Mettre le surnageant dans un tube et faire une coloration (Méthode RAL)

Si le RAL est positif, faire un passage sur une nouvelle boîte de cellules et congeler le reste

Pour faire le passage, mettre environ 2 ml de surnageant dans les T 25 cm²

Au bout de deux heures, compléter avec du milieu (GMEM SVF)

❖ Congélation

Sang

Mettre 10 % de DMSO et congeler rapidement dans de l'azote liquide (Faire des cryotubes de 1,5 ml)

Surnageant de cultures

SPG

Grattage du tapis cellulaire

Centrifugation à 3000 tr ou 3500 tr pendant 15 mn à 4 °C, éliminer le surnageant

Récupérer le culot dans du SPG (Volume variable selon les boîtes ; environ 1 ml/ampoule)

Mettre le cryotube à - 196 °C directement.

DMSO

Après centrifugation, éliminer le surplus de surnageant

Remettre le culot en suspension (dans le reste de surnageant variable également)

Ajouter 10 % de DMSO, congeler à - 196 °C

Annexe V : Multiplication des cellules endothéliales (Repiquage ou trypsination)

Solution de travail 1x (1 ml de trypsine pour 9 ml d'eau stérile)

- Gélater les boîtes de culture (2 heures avant) c'est-à-dire mettre de la gélatine au fond des boîtes et éliminer le surplus au moment de la trypsination
- Enlever le milieu de culture dans les boîtes avec une pipette, faire attention à ne pas toucher le tapis cellulaire
- Rincer deux fois avec de la trypsine 1x (volume variable selon les boîtes) pour bien enlever le sérum « la trypsine est inactive au contact du sérum »
- Mettre environ 1 ml de trypsine dans la boîte (T 25 cm²),
- Laisser agir 1 à 2 mn (assez variable), tapoter la boîte, les cellules se décollent facilement
- Vérifier éventuellement au microscope
- Rajouter du milieu de culture enrichi en sérum, suffisamment, pour les répartir dans les boîtes gélatinées (généralement une boîte dans 2 boîtes)
- Compléter avec du milieu de culture (6 ml pour T 25 cm²)
- Mettre rapidement à l'étuve à 37 °C, enrichi en CO₂ (purifié de préférence)
- Desserrer légèrement les bouchons pour stabiliser le milieu au pH 7. L'indicateur de pH est le rouge de phénol qui se trouve dans le milieu
- Ne pas oublier de noter les références des cellules sur chaque boîte et le nombre de passage
- Le lendemain renouveler le milieu

Congélation des cellules endothéliales

- Après confluence du tapis, le trypsiner. Récupérer les cellules dans du milieu de culture (enrichi en sérum) puis centrifuger 1800 tr pendant 5 mn. Récupérer ensuite le culot dans du milieu de congélation 90 % SVF + 10 % DMSO
- Mettre rapidement les cryotubes dans une boîte de congélation (alcool ou polystyrène) et le placer à - 80 °C minimum pendant 24 h. Ensuite le transférer à - 196 °C et ne pas oublier de noter les références.

Annexe VI : Protocole pour aliquots d'*Ehrlichia ruminantium*

Afin d'avoir des doses de challenges homogènes et standardisées :

- 80 % de lyse des cellules avec une lyse à peu près synchronisée (5 à 6 jours de lyse)
- Gratter le tapis cellulaire et passer le surnageant à la seringue 26 G/8 (Aiguille à insuline)
- Centrifuger 15 mn à 1800 G à 4 °C et récolter le surnageant en laissant 1 ml de milieu avec le culot pour éviter de le prélever, bien homogénéiser le surnageant puis ajouter 10 % de DMSO froid progressivement, mélanger et aliquoter par 1 ml dans des cryotubes et plonger directement en azote liquide.
- Préparer les échantillons rapidement (annoter les tubes avant, l'idéal est d'avoir un récipient avec de l'azote pour éviter qu'ils restent trop longtemps à température ambiante, essayer de préparer les aliquots à 2)

NB : 1 aliquot contient à peu près 1107 E.R avec une viabilité variable de 20 à 50 %. Dans le pire des cas (20 % de viabilité), on a 2106 E.R vivants. 1/66 de dose suffit pour tuer une chèvre.

Pour tester in vivo un aliquot d'E.R. il faut pour cela :

- Dégeler un aliquot et faire 3 dilutions en milieu d'infection froid, 1/10, 1/50 et 1/200 de dose et injecter en intraveineux.

- Injecter 3 moutons par dilution. Si 100 % de mortalité et incubation de 12 à 15 jours, utiliser la dilution correspondante pour les prochains challenges.

Ces indications correspondent à « un modèle chèvre » avec des cultures synchronisées. Il est possible que dans notre cas, une dose beaucoup plus importante que 30000 E.R vivants par animal, soit nécessaire. Le seul moyen de le savoir est de titrer *in vivo* notre batch.

Annexe VII : Epreuve ELISA-indirect pour la détection d'anticorps anti-cowdria sp à l'aide d'antigènes recombinants rec-MAP IB

Protocole utilisé pour les bovins et ovins.

1) Sensibilisation des plaques

- Diluer l'antigène *MAPIB* (1 : 1000) avec du tampon carbonate 1 mM pH 9.6
- Déposer 100 µl de cette dilution dans tous les puits de la microplaque (Dynatech)
- Incuber pendant 1 heure à 37 °C (agiter légèrement pendant 1 minute en début d'incubation) puis toute la nuit à 4 °C. Les plaques peuvent être vidées et stockées dans le congélateur pendant plusieurs mois avant usage.

2) Déroulement du test

Sortir les plaques du congélateur et laisser sur pailleasse environ 5 minutes

• Blocage des sites libres restant sur la paroi des puits

- Bloquer les sites libres en remplissant les puits avec 150 µl d'une solution PBS/0.1 % Tween 20/1 % de lait écrémé (lait Protifar).
- Incuber pendant 30 minutes à 37 °C (agiter légèrement en début d'incubation).

• Dilution et répartition des sérums.

- Diluer les sérums (1 : 100) dans du PBS-0.1 % Tween 20 – 1 % lait (Tampon PBSTL). Les témoins positifs et négatifs de HOLLANDE sont dilués à 1 : 200.
- Rincer les plaques une fois avec de l'eau bidistillée (dH₂O)
- Déposer 100 µl de sérum dilué par puits (chaque échantillon est testé en double)
- Incuber 1 heure à 37 °C (agiter légèrement pendant 1 minute en début d'incubation)

• Répartition du conjugué

- Vider les plaques d'un mouvement brusque au dessus du l'évier
- Remplir tous les puits avec de l'eau distillée (dH₂O), puis vider comme précédemment (répéter l'opération 5 fois)
- Diluer le conjugué dans le tampon PBSTL et déposer 100 µl dans tous les puits de la plaque.

RASh-PO-----1 : 5000

RAB-PO-----1 : 1500

RAG-PO-----1 : 2000

- Incuber 1 heure à 37 °C

• Répartition du substrat

- Vider les plaques d'un mouvement brusque au-dessus de l'évier
- Remplir tous les puits avec de l'eau bidistillée (dH₂O), puis vider comme précédemment (répéter l'opération 5 fois)
- Préparer extemporanément la solution substrat / Chromogène ainsi pour chaque plaque (Bocquentin et Duvallet, *Rev. Elev. med. Vet. Trop.* **43** (2) ; 1990)

25 ml acide citrique

125 µl ABTS

100 µl H₂O₂

- Déposer 100 µl de la solution substrat par puits.
- Placer les plaques à température ambiante, à l'obscurité

- Mettre le spectrophotomètre en marche environ 15 minutes avant la lecture des résultats

• **Lecture des plaques**

- Effectuer la lecture 30 à 40 minutes après le dépôt du tampon substrat au procomm. (Programme N°3 du spectrophotomètre)
- Agiter environ 5 secondes avant la lecture.

3) **Préparation des tampons**

Tampon carbonate (pH 9.6) :	Na ₂ CO ₃	0,16 g	(15 mM)
	NaHCO ₃	0,29 g	(35 mM)
	Eau bidistillée.....	100 ml	
PBS (0.15M) (pH 7.3 à 7.4) :	NaCl.....	40 g	
	KCl.....	1 g	
	KH ₂ PO ₂	1,2 g	
	NaHPO ₄	7,2 g	
	Eau bidistillée.....	5000 ml	
Acide citrique (pH 4.00) :	C ₆ H ₈ O ₇	9,6 g	
	Eau bidistillée.....	1000 ml	

Annexe VIII : Matériels de laboratoire utilisés

- ◇ Pour le prélèvement du sang des moutons, nous avons utilisé le matériel suivant : les tubes VENOJECT® sous vide, secs et héparinés (munis d'anticoagulant), les aiguilles vacutainer (PRECISIONGLIDE™) : 0,8 x 38 mm (21G1.5), un holder (Barillet BD Vacutainer^{MD}), la glace pour conserver les échantillons jusqu'au point d'analyse.
- ◇ Pour déterminer l'hématocrite et la parasitémie, nous avons utilisé : des tubes capillaires à hématocrite, la plasticine, une centrifugeuse à microhématocrites (Hettich HAEMATOKRIT), des microscopes optiques à fond noir, des lames et lamelles, un abaque de lecture des valeurs de l'hématocrite.
- ◇ Pour la culture cellulaire, le matériel utilisé est constitué de : microscope optique inversé, bain-marie, centrifugeuse, hotte à flux laminaires, étuve à 37 °C avec 5 % de CO₂, azote liquide, congélateur à - 80 °C, rocker, tubes et boîtes Falcon, seringues, pipettes et pipettes pasteur, aiguilles, bec bunsen à gaz butane, agitateur, RAL 555.
- ◇ Pour la sérologie, le matériel utilisé est : un incubateur, des pipettes à volume variable (5-50 µl) et multicanaux (5-50 et 50-300 µl), embouts associés, des plaques à microtitration en polystyrène, 96 puits, à fonds plats, une plaque polypropylène pour la dilution des sérums, un réfrigérateur à + 4 °C et un congélateur à - 20 °C, un distillateur d'eau, la verrerie de laboratoire, un ph-mètre, un agitateur de plaques, une balance pour les produits, spectrophotomètre pour la lecture des densités optiques.
- ◇ Pour la saignée des rats pour l'alimentation des glossines, le matériel suivant a été utilisé : des pinces, héparine, seringues, aiguilles, éther, tubes Falcon 50 ml, dessiccateur.
- ◇ Pour la dissection des glossines, le matériel utilisé est composé : de pinces, microscopes et loupe, eau distillée, lames et lamelles.

Annexe IX : Figures

Figure 6 : Mouton en crise de pédalage



Cliché : J. KABORE

Figure 7 : Frottis du cortex cérébral



Cliché : J. KABORE et M. KONKOBO

Figure 8 : Boîtes de culture (T 25 cm²)



Cliché : M. ZERBO

Figure 9 : Saignement de rats



Cliché : J. KABORE

Figure 10 : Elevage de rats



Cliché : J. KABORE

Figure 11 : Alimentation de glossines



Cliché : J. KABORE

RESUME

L'ehrlichiose des ruminants (cowdriose) et les trypanosomoses animales africaines sont des maladies à transmissions vectorielles. La cowdriose est due à *Ehrlichia ruminantium*. Il existe une grande diversité antigénique au sein de cette espèce qui empêche la mise au point d'un vaccin efficace. Les glossines sont les vrais vecteurs biologiques des trypanosomoses animales. L'objectif de cette étude est d'une part, d'étudier les conditions d'isolement d'*Ehrlichia ruminantium in vitro* et d'autre part, d'étudier la compétence vectorielle des glossines d'élevage du CIRDES en vue de leur éradication sur le terrain par la Technique de l'Insecte Stérile (TIS). Cette étude nous a permis d'isoler les souches d'*Ehrlichia* BK4338 (E055), BK242/P/S ; de déterminer la dose de challenge qui est la dilution 1:50^{ème} et d'évaluer les taux d'infection des glossines vis-à-vis de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei*. *Glossina morsitans submorsitans*, *Glossina palpalis gambiensis* et *Glossina tachinoides* générales ont été infectées *in vitro* sur du sang de rats atteints de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* par l'intermédiaire d'une membrane de cellophane. Les glossines ont été maintenues sur du sang sain de bœuf ou de porc défibriné et ce, après une trentaine de jours. Une vingtaine de glossines furent disséquées afin de déterminer les taux d'infection. Nos résultats montrent que la proportion de glossines infectées par *T. vivax* est élevée par rapport à celle des glossines infectées par *T. brucei* que par *T. congolense*. Ces résultats révèlent aussi une inégalité des taux d'infection entre mâles et femelles. Par contre, les résultats globaux montrent que les mâles sont plus susceptibles que les femelles. Les mâles et femelles de *Glossina morsitans submorsitans* infectées par *T. vivax* et les mâles de *Glossina morsitans submorsitans* infectées par *T. congolense* ont été appliquées à des moutons. Ces glossines infectées ont pu assurer l'installation, la multiplication, la maturation des trypanosomes en leur sein : ces glossines sont alors compétentes à transmettre l'infection. Puis, elles sont arrivées à transmettre les trypanosomes. Ainsi, malgré tous les facteurs divers, ces glossines ont préservé leur compétence vectorielle.

Mots clés : Adaptation, *Ehrlichia ruminantium*, Culture *in vitro*, Compétence vectorielle, Glossines, Trypanosomes pathogènes.
