

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE ET SUPERIEUR

.....
UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE
BOBO-DIOULASSO (UPB)

.....
INSTITUT DU DEVELOPPEMENT
RURAL
(IDR)



MEMOIRE N°.....
BURKINA FASO
Unité-Progrès-Justice

**Mémoire de DEA de biologie appliquée et modélisation de
systèmes biologiques (BAMSB)**

Présenté et soutenu par

Patrick Djim-Madjim MADINGAR (Pharm. D)

Thème :

*"Etude expérimentale de la réponse immune anti-salive de
glossine chez le bovin et évaluation d'une stratégie vaccinale
utilisant les antigènes salivaires de glossine"*



Soutenu publiquement le 16 Mai 2014 devant le jury:

Président : **Pr Georges Anicet OUEDRAOGO**
Membres : **Pr Adrien Marie Gaston BELEM**
Dr Bienvenu Martin SOMDA

Maître de stage : **Dr Zakaria BENGALY**

DEDICACES

Ce travail est dédié à :

*Ma très chère mère Koubra Marie MOUSSA (in
memoriam) ;*

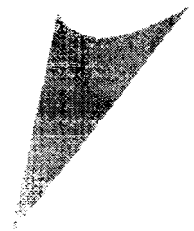
Mon très cher père Jérôme A. MADINGAR;

Ma sœur et mes frères ;

*Mes oncles, tantes, cousins, cousines, amis (es) et
connaissances ;*

*Ma tendre compagne Marlyse SINARE ainsi qu'à toute sa
famille de même que Richard OUEDRAOGO et sa famille;*

*Mes confrères pharmaciens et amis de la Jeune chambre
internationale (JCI) ainsi qu'à tous ceux qui m'ont
encouragé et soutenu dans la poursuite de mes études car
être dans la vie active comme travailleur et poursuivre
des études n'est pas toujours chose aisée.*



REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements vont à l'adresse:

- De **Dr Valentine C. YAPI-GNAORE**, Directrice générale du CIRDES qui a bien voulu nous accepter comme stagiaire au sein de son institution;
- De l'**Université polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB)** à travers les Prs **Georges Anicet OUEDRAOGO** et **Jean Bosco OUEDRAOGO**, pour cette initiative de création de l'école doctorale de Biologie appliquée et modélisation des systèmes biologiques (BA/MSB);
- Du Pr **Adrien Marie Gaston BELEM** de l'UPB, notre directeur de mémoire pour avoir consenti à nous encadrer;
- Des partenaires financiers tels que **AIRES-Sud** (Appui intégré pour le renforcement scientifique des équipes du Sud) et le **programme qualité Afrique de l'Ouest-phase II-composante de l'UEMOA** pour avoir financé le **Projet anti-salivaire de tsé-tsé (PAST)** sur lequel nous avons réalisé cette étude;
- De **Dr Zakaria BENGALY**, Directeur scientifique du CIRDES, notre maître de stage pour avoir toujours été à nos côtés pour nous soutenir et nous encourager;
- De **Dr El Hadj Hassane ADAKAL**, chef de l'Unité de Recherche sur les Bases biologiques de la lutte Intégrée (URBIO), qui m'a reçu pour le stage au sein de son unité;
- Des Drs **Mahamoudou SANOU**, ancien Directeur général du Centre national de transfusion sanguine (CNTS) et **Honorine DAHOUROU**, Directrice générale du CNTS pour nous avoir donné l'autorisation de pouvoir faire ce DEA;
- Des Drs **Martin Bienvenu SOMDA** et **Émilie Thérèse DAMA** sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé car, de notre situation d'étudiant et de travailleur, chef de service des laboratoires et parfois intérimaire du directeur régional du CRTS, ils ont su nous épauler et surtout nous comprendre pour la réalisation de certaines tâches;
- Des techniciens de laboratoires **Léopold MILLOGO**, **Mèmè YOULE**, **Maurice KONKOBO**, **Souleymane SYLLA**, **Adrien ZOUNGRANA** et **Hassane SAKANDE**, pour leur disponibilité constante. Merci d'avoir partagé avec moi votre expérience très enrichissante;
- Des techniciens de l'insectarium **Guy SANOU**, **Bakoffi OUATTARA**, **Simon Pierre KABORE**, **Pacôme SIE**, **Issiaka BARRY**, **Dénis OUEDRAOGO** pour leur disponibilité et soutiens multiformes dans la réalisation de nos activités de recherche;
- De **Saïdou BOLI** et des stagiaires **André ZONGO** et **Sayouba OUEDRAOGO** particulièrement pour leurs appuis dans nos travaux ainsi qu'aux autres stagiaires **Hermann Sié PODA**, **Soumaïla PAGABELEGUEM**, **Ange TOE** pour leur sympathie et amitié;
- De tous les chercheurs et à tout le personnel du CIRDES pour leur sympathie;
- Des Drs **Patrick E. KAFANDO**, **Issiaka SONDE**, **Madina A. DIALLO**, **Lamini PITROIPA** et à tous les autres confrères de l'Ordre régional des pharmaciens du Burkina Faso;
- De tous les étudiants de la **promotion 2011-2012 de DEA/BAMSB de l'UPB**.

Table des matières

DEDICACES	i
REMERCIEMENTS	ii
RESUME	v
ABSTRACT	vi
SIGLES ET ABREVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX, PHOTOGRAPHIES ET FIGURES	viii
LISTE DES ANNEXES	ix
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	4
Chapitre 1 : LES TRYPANOSOMOSSES ANIMALES AFRICAINES	4
1.1. Epidémiologie et impact économique	4
1.2. Agent pathogène	4
1.2.1. Morphologie-locomotion	4
1.2.2. Classification	5
1.2.3. Cycle évolutif	6
1.3. Vecteurs	8
1.3.1. Vecteurs cycliques : la glossine	8
1.3.2. Vecteurs mécaniques.....	10
1.4. Symptomatologie et physiopathologie	10
1.5. Stratégies de lutte	11
1.5.1. Lutte biologique.....	12
1.5.2. Lutte anti-parasitaire.....	12
1.5.3. Lutte anti-vectorielle	12
Chapitre 2 : CONCEPT DE LA TRYPANOTOLERANCE	14
2.1. Définition	14
2.2. Mécanisme de la trypanotolérance	14
2.3. Description et répartition des races bovines trypanotolérantes et trypanosensibles	16
2.3.1. Races trypanotolérantes.....	16
2.3.2. Races trypanosensibles.....	17
2.3.3. Races bovines issues du croisement entre zébus et taurins.....	17
CHAPITRE 3 : Protéines salivaires des arthropodes hématophages, rôles et applications	18
3.1. Composés salivaires et hémostase chez l'hôte	19

3.1.1.	Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire	19
3.1.2.	Inhibiteurs de la coagulation du sang	21
3.1.3.	Inhibiteurs de la vasodilatation	22
3.2.	Effets des antigènes salivaires sur la réponse immunitaire de l'hôte	22
3.2.1.	Réaction inflammatoire	22
3.2.2.	Immunomodulation induite par les protéines salivaires.....	23
3.2.3.	Développement de biomarqueurs d'exposition à la piqûre des arthropodes hématophages.....	24
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE		26
Chapitre 1 : MATERIEL ET METHODES.....		26
1.1.	Matériel	26
1.1.1.	Matériel biologique	26
1.1.2.	Matériel de laboratoire	27
1.2.	Méthodes	28
1.2.1.	Obtention de la salive de glossines	28
1.2.2.	Dosage des protéines salivaires	29
1.2.3.	Exposition expérimentale des bovins aux piqûres de <i>Glossina morsitans</i> <i>submorsitans</i>	30
1.2.4.	Epreuve de challenge avec <i>T. congolense</i>	31
1.2.5.	Dosage des anticorps anti-salivaire par ELISA-indirect.....	32
1.2.6.	Analyses statistiques.....	34
Chapitre 2 : RESULTATS ET DISCUSSION.....		35
2.1.	Résultats	35
2.1.1.	Salivation des glossines et dosage des protéines salivaires.....	35
2.1.2.	Réponse humorale IgG dirigée contre la salive de glossine.....	36
2.1.3.	Evolution des paramètres du cours infectieux	37
2.2.	Discussion.....	41
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		45
REFERENCES WEBOGRAPHIQUES.....		54
ANNEXES		I

RESUME

Les trypanosomoses animales africaines (TAA) sont à l'origine de nombreux dommages chez le bétail en Afrique subsaharienne, notamment chez les bovins qui sont la principale cible de cette parasitose. En absence d'un vaccin, la méthode privilégiée dans la lutte contre les TAA est la lutte contre les glossines, principaux vecteurs de ces maladies. Le piégeage est actuellement la méthode la plus utilisée dans les évaluations entomologiques pour le choix des zones prioritaires pour l'implantation des campagnes de lutte anti-vectorielle (LAV) ou pour évaluer leur efficacité. Cependant, cette méthode de référence présente certaines limites, si bien qu'il s'avère nécessaire de développer de nouveaux outils plus efficaces afin de cibler les zones où les populations sont les plus exposées au risque de transmission des trypanosomes. Tout récemment, de nombreuses études ont montré le rôle de la salive des arthropodes hématophages dans le développement de biomarqueurs d'exposition et la mise au point de stratégies vaccinales. L'objectif de notre étude a été de comparer les réponses anticorps IgG dirigées contre les antigènes salivaires de *Glossina morsitans submorsitans* par la technique ELISA-indirect chez des bovins de différentes sensibilités à l'infection trypanosomienne (zébu Peulh, trypanosensible et baoulé, trypanotolérant) et exposés à différentes intensités de piqûres. Par ailleurs, nous avons utilisé un protocole expérimental afin d'évaluer le potentiel vaccinal de la salive de cette mouche chez ces bovins pré-exposés aux piqûres de glossines. L'analyse de la réponse anti-salive présente des caractéristiques épidémiologiques intéressantes car (i) permet de discriminer les bovins exposés aux piqûres de tsé-tsé des non exposés et (ii) corrèle fortement avec les niveaux d'exposition, comme souhaité pour un biomarqueur d'exposition. Ce biomarqueur pourrait être utilisé comme méthode alternative ou complémentaire aux piégeages dans le cadre de la *Pan African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign*, pour un meilleur (i) ciblage des zones prioritaires pour l'implantation des campagnes de LAV et (ii) suivi des impacts de la LAV à réduire les contacts bovin/tsé-tsé. Cependant, même si aucune immunisation n'a pu être observée avec les antigènes salivaires totaux de glossine, l'approche vaccinale développée au cours de cette étude pourrait être poursuivie par l'étude de certaines protéines salivaires spécifiques afin d'identifier de potentiels candidats comme cibles vaccinales.

Mots clés : Trypanosomoses animales africaines, glossine, bovin, réponse anti-salive, biomarqueur et ELISA-indirect.

ABSTRACT

African animal trypanosomiasis (AAT) are the causes of a lot of damages among livestock in sub-Saharan Africa, particularly in cattle which are the main target of this disease. In the absence of a vaccine, the preferred method in the fight against the AAT is the control of tsetse flies which are the main vectors of these diseases. The trapping is currently the best method used in the choice of the priority zones for the implantation of the vector control campaigns or to evaluate their impacts. However, this reference method presents some limits, so that it is important to develop new tools that are more efficient in targeting areas where populations are exposed to a high risk of trypanosomes' transmission. Recently, many studies have demonstrated the role of the saliva of bloodsucking arthropods in the developing of biomarkers of exposure and in vaccinal strategies. The objective of our study was to compare the IgG antibody responses directed against whole salivary antigens of *Glossina morsitans submorsitans* by indirect-ELISA in cattle of different susceptibilities to the trypanosome infection (zebu Peulh, trypanosusceptible and baoulé, trypanotolerant) and exposed to different intensities of tsetse bites. Furthermore, we used an experimental protocol in order to evaluate the vaccinal potential of the saliva of this fly in these pre-exposed cows to tsetse bites. The analysis of the response against saliva antigens of tsetse presents interesting epidemiological features by the fact that it (i) permits to discriminate cattle exposed to tsetse bites from unexposed ones and (ii) correlates strongly with the levels of exposure, as expected with a biomarker of exposure. This biomarker could be used as an alternative or complementary method to tsetse trapping within the Pan African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign for better (i) targeting priority areas for the implementation of the vector control campaigns and (ii) monitoring of impacts of the vector control to reduce cattle/tsetse contacts. However, even if no protection has been observed with whole saliva antigens, the approach developed in this survey could be pursued by the study of some specific salivary proteins in order to identify potential candidates as vaccine targets.

Keywords: African animal trypanosomiasis, tsetse, cattle, anti-saliva response, biomarker and indirect-ELISA.

SIGLES ET ABREVIATIONS

- ABTS:** [2, 2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]
- ADN :** Acide désoxyribose nucléique
- ADP :** Adénosine diphosphate
- AMP:** Adénosine monophosphate
- ATP:** Adénosine triphosphate
- BCA:** *Bicinchonic acid*
- BSA:** *Bovine serum albumin*
- CDC:** *Center for disease control and prevention*
- CIRDES:** Centre international de recherche – développement sur l'élevage en zone subhumide
- DDT:** Dichloro-diphényl-trichloroéthane
- DO:** Densité Optique
- ΔDO:** Variation de la densité Optique
- ELISA:** *Enzyme linked immunosorbent assay*
- H₂O₂:** Peroxyde d'hydrogène
- IFN-γ:** Interféron-γ
- Ig:** Immunoglobuline
- IL:** Interleukine
- ILRI:** *International livestock research institute*
- ITC:** *International trypanotolerance centre*
- kDa:** kiloDalton
- LAV:** Lutte anti-vectorielle
- PAAT:** *Program against african trypanosomiasis*
- PAST:** Projet anti-salive de Tsé-tsé
- PATTEC:** *Panafrican tsetse fly and trypanosomiasis eradication campaign*
- TAA:** Trypanosomose animale africaine
- THA:** Trypanosomose humaine africaine
- TNFα:** *Tumor necrosis factor α*
- \$US:** Dollar américain

LISTE DES TABLEAUX, PHOTOGRAPHIES ET FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Répartition des bovins d'expérimentation par groupe d'exposition	30
<u>Tableau II</u> : Gamme de BSA du kit de dosage de BCA	35
<u>Tableau III</u> : Influence du niveau d'exposition et de la durée d'exposition	37
<u>Tableau IV</u> : Effets de variables sur l'hématocrite	39

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

<u>Photo 1</u> : Glossine prenant un repas sanguin	8
<u>Photo 2</u> : Tube <i>Falcon</i> contenant des glossines lors de séances de salivation	28
<u>Photo 3</u> : Plaque ELISA de dosage de protéines salivaires	29
<u>Photo 4</u> : Cage de glossines fixées aux flancs du zébu pour un repas sanguin	30
<u>Photo 5</u> : Couverture des cages à l'aide d'un tissu noir	30
<u>Photo 6</u> : Glossines gorgées après un repas sanguin	30
<u>Photo 7</u> : Mesure de l'hématocrite	32
<u>Photo 8</u> : Section du tube à l'interface <i>Buffy coat</i> - globules rouges	32
<u>Photo 9</u> : Dépôt du <i>Buffy coat</i> sur la lame	32
<u>Photo 10</u> : Plaque ELISA après révélation et lecture	33
<u>Photo 11</u> : Spectrophotomètre pour lecture de densités optiques	33

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Ultrastructure des trypanosomes	5
<u>Figure 2</u> : Cycle parasitaire de trypanosome chez le bovin	7
<u>Figure 3</u> : Classification des glossines	9
<u>Figure 4</u> : Aire de répartition des glossines en Afrique	10
<u>Figure 5</u> : Principe de l'ELISA indirect	33
<u>Figure 6</u> : Droite de régression lors du dosage des protéines salivaires	35
<u>Figure 7</u> : Réponse anti-salivaire chez les zébus Peulh et les baoulés	36
<u>Figure 8</u> : Evolution de l'hématocrite chez les zébus Peulhs et les baoulés	38
<u>Figure 9</u> : Evolution de la parasitémie chez les zébus Peulh et les baoulés	40

LISTE DES ANNEXES

<i><u>Annexe 1</u> : Protocole de salivation</i>	<i>I</i>
<i><u>Annexe 2</u> : Protocole dosage de protéines salivaires</i>	<i>II</i>
<i><u>Annexe 3</u> : Fiche de recueil de données pendant l'exposition expérimentale</i>	<i>III</i>
<i><u>Annexe 4</u> : Fiche de suivi de paramètres du cours infectieux</i>	<i>IV</i>
<i><u>Annexe 5</u> : Estimation de la parasitémie selon l'échelle de Paris</i>	<i>V</i>
<i><u>Annexe 6</u> : Protocole ELISA salive totale</i>	<i>VI</i>

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les trypanosomoses animales africaines (TAA) ou *Nagana* sont une maladie parasitaire causée par des protozoaires flagellés, sanguicoles appartenant à la famille des *Trypanosomastidae* et au genre *Trypanosoma* (*T.*). Ces parasites se multiplient dans le sang, la lymphe et divers organes des mammifères et des reptiles. Leur transmission à l'hôte est généralement réalisée par un insecte hématophage qui peut être un vecteur cyclique (glossines ou mouches tsé-tsé) ou mécanique (tabanidés, stomoxes et hippoboscides) (Murray *et al.*, 1979 ; Itard et Frézil, 2003).

Après plus d'un demi-siècle de recherches et de lutte contre les TAA, elles constituent toujours un frein majeur au développement de l'élevage du bétail dans les zones humides et subhumides de l'Afrique subsaharienne infestées de glossines (Affognon *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005). On estime que 60 millions de personnes, plus de 50 millions de bovins et environs 100 millions de petits ruminants sont exposés au risque des trypanosomoses dans 38 pays d'Afrique subsaharienne, soit près du tiers des superficies terrestres du continent (Itard *et al.*, 2003; Vreysen *et al.*, 2013). De nos jours, les TAA sont considérées comme la maladie bovine la plus importante en Afrique subsaharienne, provoquant chaque année 25,4% de morbidité, 17,8% de mortalité et 10% de réduction de la traction animale (Affognon *et al.*, 2005). Par ailleurs, elles entraînent aussi des pertes de production agricoles et animales qui sont d'environ 4 à 4,5 milliards \$US par an (Kristjanson *et al.*, 1999 ; Holmes, 2013).

Beaucoup de centres de recherche (CIRDES, ILRI, ITC, etc.) et des acteurs au développement œuvrent pour éradiquer les TAA. En l'absence d'un vaccin, lié en partie à la grande variabilité antigénique du trypanosome (Duvallet, 2006), les principales stratégies employées pour l'éradication des TAA demeurent (i) l'utilisation des molécules à visées curatives ou prophylactiques, (ii) la promotion de bétail trypanotolérant et (iii) la lutte anti-vectorielle (LAV) utilisant différentes stratégies (Vreysen *et al.*, 2013).

De nos jours, la LAV est la méthode de lutte de choix contre les trypanosomoses. Pour être efficaces et moins coûteuses, les stratégies de LAV ont besoin en amont et en aval d'une bonne évaluation entomologique afin de mieux cibler les zones prioritaires pour la LAV et aussi pour évaluer l'efficacité de cette lutte. Actuellement, l'identification des zones à risque de transmission ou l'évaluation de l'efficacité des programmes de lutte se font grâce à des méthodes d'évaluation entomologique (captures par piégeage). Mais la mise en place régulière de ces moyens de

surveillance entomologique pose des problèmes du fait de la faible attractivité des pièges. Ces méthodes sont également indirectes et deviennent moins efficaces dans les zones de faibles densités glossiniennes (Bouyer *et al.*, 2010). De plus, le déploiement des pièges sur de vastes zones géographiques s'avère difficile, d'où la nécessité de développer de nouveaux outils alternatifs ou complémentaires aux méthodes d'évaluation entomologique pour les programmes de LAV afin d'être plus performants dans le ciblage des zones prioritaires d'intervention et dans l'évaluation de l'efficacité de la lutte.

Depuis les années 1990, des études ont montré que la salive des arthropodes hématophages n'est pas neutre dans la réussite du repas sanguin (Ribeiro, 1995). En effet, lors du repas sanguin ces arthropodes injectent au site de la piqûre un cocktail de composés salivaires bioactifs (molécules anti-hémostatiques, anti-inflammatoires et immunomodulatrices) permettant (i) la réalisation d'un repas sanguin efficace (Ribeiro et Francischetti, 2003) et (ii) l'établissement des parasites présents dans leurs glandes salivaires chez leurs hôtes mammifères (Gillespie *et al.*, 2000). Parmi ces protéines salivaires, certaines ont la propriété d'induire chez l'hôte vertébré une synthèse d'anticorps spécifiques. Il a ainsi pu être montré que l'évaluation de ces anticorps dirigés contre certains composés salivaires (salive totale, peptides synthétiques ou protéines recombinantes) pouvait être utilisée comme biomarqueur d'exposition à la piqûre de certains arthropodes hématophages comme les moustiques (Remoue *et al.*, 2006), les tiques (Lane *et al.*, 1999), les triatomés (Schwarz *et al.*, 2009a) ou encore les phlébotomes (Vlkova *et al.*, 2012). Dans les trypanosomoses, les premiers biomarqueurs ont été mis au point dans la maladie du sommeil ou trypanosomose humaine africaine (THA). Ces biomarqueurs ont été proposés comme outils d'évaluation du risque de transmission de la THA et des campagnes de lutte contre les tsé-tsé (Caljon *et al.*, 2006a; Poinsignon *et al.*, 2008).

Au regard de ces résultats chez l'homme, le CIRDES a exécuté un projet intitulé « Projet anti-salive de tsé-tsé ou PAST ». La première phase de ce projet a permis de mettre au point des biomarqueurs d'exposition à la piqûre de glossine chez l'homme (Dama *et al.*, 2013) et chez le bovin (Somda *et al.*, 2013).

Notre travail s'est inscrit dans la deuxième phase du projet PAST en conditions expérimentales (étable sous-moustiquaire au CIRDES).

Nos objectifs étaient (i) d'analyser le biomarqueur anti-salive en fonction des intensités de piqûres et de la race bovine (baoulés, bovins trypanotolérants et zébus Peulh, bovins trypanosensibles) et (ii) de faire une épreuve de challenge à *T. congolense* chez ces bovins (baoulés et zébus Peulh) pré-immunisés par la salive de glossine.

Ce travail est subdivisé en deux parties dont la première est consacrée à la revue de la littérature relative à notre thématique de recherche et la seconde à l'étude expérimentale proprement dite.

**PREMIERE PARTIE :
REVUE DE LA LITTERATURE**

PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE

Chapitre 1 : LES TRYPANOSOMOSES ANIMALES AFRICAINES

Les méfaits de la glossine semblent connus depuis l'antiquité puisque des textes anciens mentionnent la piqûre d'insecte entraînant la mort du bétail dans les contrées reculées de la haute Egypte. Mais ce n'est qu'en 1929 que l'historique de la mouche tsé-tsé et des trypanosomes a été écrite par Hegg (Leveissere et Penchenier, 2005).

1.1. Epidémiologie et impact économique

On estime à 50 millions de bovins ainsi que 230 millions de moutons, 40 millions de chèvres exposés au risque de la trypanosomose animale sur 10 millions km² d'Afrique subsaharienne (Itard, 2000), qui offrent pourtant de fortes potentialités fourragères et agricoles (MacLennan, 1981).

Cette maladie entraîne chaque année le décès de 3 millions de têtes de bétail, la perte de 500 000 tonnes de viande et celle d'un million de tonne de lait. Il est clair que la trypanosomose est une contrainte majeure pour le développement de l'agriculture en Afrique subsaharienne et plus spécifiquement de l'élevage car on note (Pangui, 2001):

- Une réduction du cheptel de 30 à 50% ;
- Une réduction de la production en viande et en lait d'au moins 50% ;
- Une réduction d'environ 5 à 10% de la valeur totale de la production agricole ;
- Un dépeuplement de zones agricoles riches ;
- Une paupérisation continue des populations rurales ;
- Un renforcement de l'exode rural ;
- Un maintien de la dépendance des pays de zones infestées vis-à-vis de l'extérieur.

1.2. Agent pathogène

1.2.1. Morphologie-locomotion

Les trypanosomes sont des kinétoplastidés qui possèdent un flagelle leur servant à se déplacer. Ils vivent dans le sang, la lymphe et divers tissus des mammifères. Ils se présentent sous une grande variété de forme et de taille suivant le genre et le stade d'évolution (figure 1). Leur déplacement hélicoïdal est amorcé par une ondulation de leur flagelle attaché à la membrane cytoplasmique, constituant ainsi une membrane ondulante.

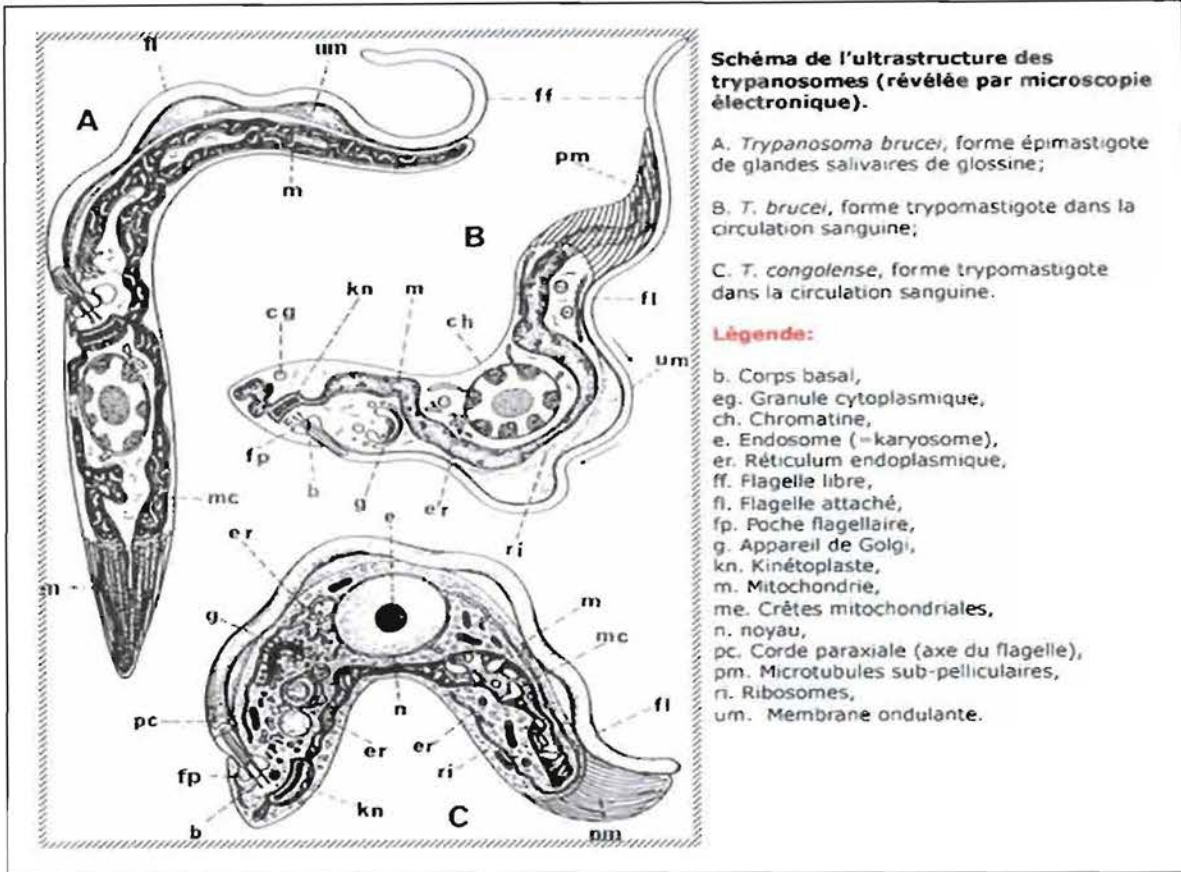


Figure 1: Ultrastructure des trypanosomes (Vickerman, 1985)

1.2.2. Classification

Le genre *Trypanosoma* est scindé en deux groupes:

- La section *Stercoraria* composée de trois sous-genres dans laquelle les parasites sont transmis par la contamination des fèces de l'insecte;
- La section *Salivaria* incluant cinq sous-genres dans laquelle les parasites sont transmis par inoculation avec la salive.

C'est au groupe des *Salivaria* que se rattachent les trois espèces pathogènes principales responsables des TAA: *T. vivax* (sous-genre *Duttonella*), *T. congolense* (sous-genre *Nannomonas*) et *T. brucei* (*b.*) *brucei* (sous-genre *Trypanozoon*).

En marge des trypanosomes pathogènes pour le bétail, il existe deux sous-espèces du complexe *brucei* pathogènes pour l'homme. Il s'agit de:

- *T. b. gambiense*, agent de la maladie du sommeil dans sa forme chronique en Afrique occidentale et centrale. Il n'est théoriquement pathogène que pour l'homme;
- *T. b. rhodesiense*, agent d'une anthroponose, est présent en Afrique de l'Est. Il est responsable de la THA d'évolution aiguë chez l'homme.

1.2.3. Cycle évolutif

Les trypanosomes se multiplient habituellement par scissiparité ou division binaire dans le sens longitudinal. Ils peuvent aussi se reproduire par voie sexuée et échanger ainsi du matériel génétique entre eux. Ce phénomène reste apparemment rare dans la nature.

a) Chez la glossine

La contamination des glossines se fait lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté, repas au cours duquel les glossines absorbent des formes trypomastigotes courtes. Ces dernières subissent des transformations au niveau de l'appareil digestif de la mouche pour donner des formes allongées en perdant notamment leur membrane de glycoprotéine et deviennent en ce moment non infectieuses. Elles migrent par la suite vers les glandes salivaires de la mouche.

A ce niveau, les trypomastigotes procycliques se fixent par leur flagelle et se transforment en épimastigotes qui se transforment à leur tour en trypomastigotes métacycliques avec l'apparition d'un manteau antigénique de nature glycoprotéique et redeviennent infectieux. Une fois matures, ces formes infectantes se détachent des cellules épithéliales salivaires et restent dans la salive par laquelle elles pourraient être transmises à l'hôte lors d'autres repas sanguins.

Le siège et la durée du cycle évolutif sont variables d'une espèce de trypanosome à l'autre : elle a une durée de 20-30 jours pour *T. brucei* spp au niveau de la trompe de la glossine, 12-18 jours pour *T. congolense* qui va de l'intestin moyen de la glossine vers son hypopharynx et 5-14 jours pour *T. vivax* dont le siège du cycle est le proboscis.

b) Chez l'hôte-bovin

Notre sujet portant sur la trypanosomose bovine, nous nous intéresserons donc à cet hôte tout le long de cette étude.

Lors du repas sanguin, la glossine injecte à l'hôte des formes métacycliques infectantes présentes dans ses pièces buccales. Ces dernières se multiplient au point d'inoculation pendant plusieurs jours provoquant une réaction inflammatoire locale appelée chancre d'inoculation ou trypanome. Puis, les trypanosomes migrent vers le ganglion de drainage en empruntant la voie lymphatique avant d'être dans la circulation générale.

La durée de la période prépatente (de l'inoculation à la détection du parasite dans le sang) est de 1-3 semaines en fonction de l'espèce et de la souche de trypanosome

en cause, du nombre de trypanosomes injecté par la glossine et de certaines conditions favorisantes comme l'état d'immunité de l'hôte (Clausen *at al.*, 1993).

Les trypanosomes africains ont la propriété de modifier leur spécificité antigénique leur permettant d'échapper au système immunitaire de leur hôte (Clausen *at al.*, 1993) rendant ainsi difficile la mise au point d'un vaccin contre les trypanosomoses (Holmes, 2013). Ce phénomène, connu sous le nom de «variation antigénique», est dû à l'expression d'un gène codant pour une glycoprotéine variable de surface (GVS), ce qui a pour conséquence une évolution des trypanosomes dans le sang par « vague parasitémique » (Vickerman, 1985).

La figure 2 nous montre les différents stades du cycle de reproduction des trypanosomes chez le bovin et chez la glossine.

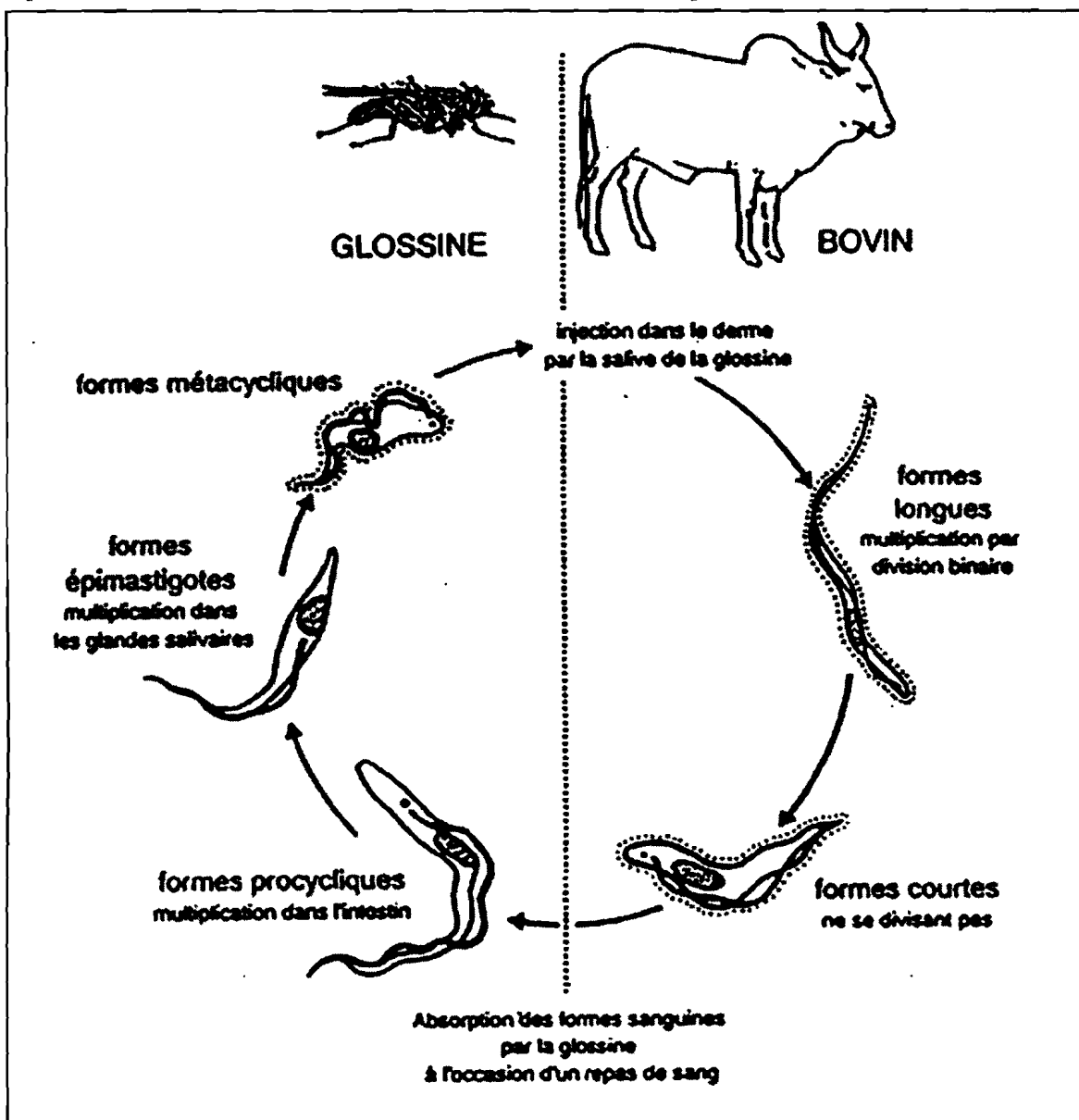


Figure 2 : Cycle parasitaire de trypanosomes chez le bovin (Authié *et al.*, 1999)

1.3. Vecteurs

1.3.1. Vecteurs cycliques : la glossine

a) Description

Le nom tsé-tsé donné aux glossines, vectrices de cette maladie, provient de leur dénomination par les africains de l'ethnie Matabélé (Zimbabwe) en référence au bruit accompagnant son vol. Ce nom a été popularisé par les écrits de Gordon Cummings («*Five years of a hunter's life in the far interior of Africa*», 1850). Il désigne aujourd'hui l'ensemble des 31 espèces ou sous-espèces rattachées au genre *Glossina* (De La Rocque et Cuisance, 2005).

La glossine ou mouche tsé-tsé est un diptère avec une seule paire d'ailes, repliée en ciseaux sur le dos au repos (photo 1) et dont les deux sexes sont hématophages avec pour hôtes nourriciers de prédilection les bovidés et suidés. Cependant, d'autres sont opportunistes et sont obligées d'adapter leur régime aux conditions de leur vie.



Photo 1: Glossine prenant un repas sanguin (Bouyer, 2009)

b) Classification-habitats-répartition

En fonction des particularités morphologiques telles que les organes génitaux externes des mouches mâles et des particularités bio-écologiques (préférences d'habitat et trophiques), le genre *Glossina* est subdivisé en trois groupes ou sous-genres taxonomiquement distincts (figure 3):

- Le groupe *morsitans* (sous-genre *Glossina stricto sensu*) qui comprend sept espèces de taille moyenne. On les rencontre en zones savanicoles et dans les forêts claires. Leur distribution et abondance sont souvent conditionnées par la présence de la faune sauvage. Ce sont des vecteurs majeurs des THA et des TAA.

- Le groupe *palpalis* (sous-genre *Nemorhina*) qui regroupe 9 espèces de petite taille. Ces espèces se rencontrent dans les zones humides, dans les galeries forestières, le long des réseaux hydrographiques, mais aussi dans les plantations de café, cacao, manguiers ou bananiers. Ce sont des vecteurs de trypanosomes pathogènes pour l'homme et pour l'animal.
- Le groupe *fusca* (sous-genre *Austenina*) qui compte 15 espèces de grande taille d'une moindre importance économique. Elles vivent dans les régions forestières ou des mosaïques forêt-savane et se nourrissent rarement sur l'homme. Leur rôle vecteur est important, essentiellement pour la faune sauvage (Duvallat, 2006).

LA CLASSIFICATION ZOOLOGIQUE DES GLOSSINES

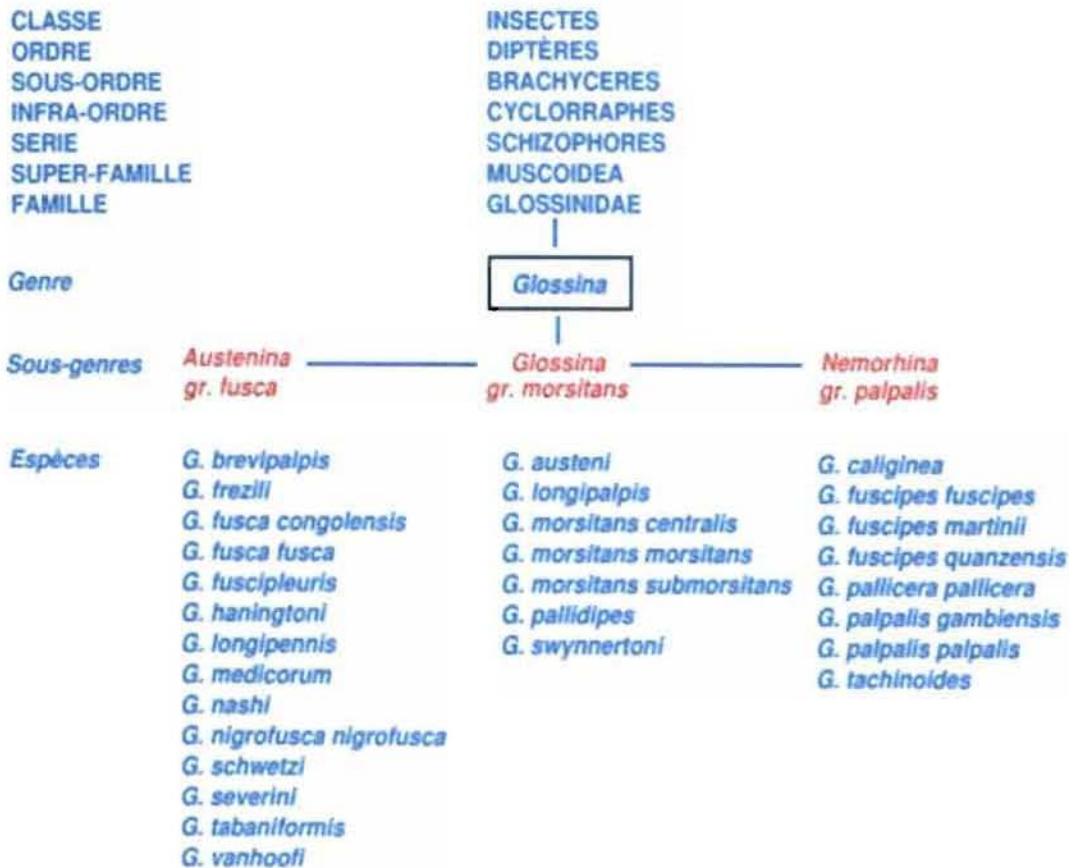


Figure 3 : Classification des glossines (tiré de Bouyer, 2006).

Les glossines sont des mouches exclusivement africaines et continentales répandues soit depuis les savanes boisées Nord soudanienne jusqu'aux savanes guinéennes et à la forêt dense humide équatoriale, soit depuis la limite sur des steppes sahéliennes (13^{ème} ou 14^{ème} degré de latitude Nord) juste vers le 15^{ème} degré de latitude Sud en Angola (Itard *et al.*, 2003) (Figure 4).

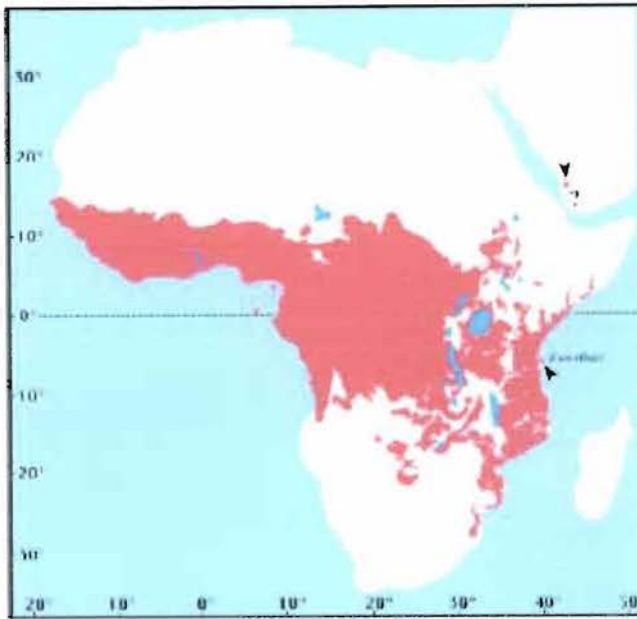


Figure 4 : Aire de répartition des glossines en Afrique (Brunhes et al., 2006)

1.3.2. Vecteurs mécaniques

Les trypanosomes sont aussi transmis de manière mécanique par l'intermédiaire de divers insectes piqueurs appelés vecteurs mécaniques à l'occasion d'un repas sanguin commencé sur un animal infecté et complété sur un animal sain. Cette transmission est rapide et se fait entre deux repas de sang assez proches (Desquesnes, 1997).

Les principaux arthropodes impliqués sont principalement les tabanidés, les stomoxes et les hippoboscides. Ils sont les principaux vecteurs de *T. evansi* mais peuvent également intervenir dans les trypanosomoses habituellement transmises de manière cyclique par les glossines: *T. congolense*, *T. brucei* et *T. vivax*.

1.4. Symptomatologie et physiopathologie

L'évolution des TAA est très variable suivant le trypanosome en cause et l'espèce ou la race d'animaux. Les zébus sont très sensibles aux infections provoquées par *T. congolense* ou *T. vivax*. A l'opposé, les taurins de l'Afrique de l'Ouest présentent une résistance remarquable leur permettant de vivre dans des régions où les autres races ne peuvent subsister.

Les TAA se traduisent donc par un syndrome de gravité très variable. Tous les modes d'évolution sont possibles de l'infection aiguë, mortelle en 3 à 4 semaines, à l'infection chronique durant des mois, voire des années (Authié et al., 1999).

Les animaux chroniquement infectés ont une consommation alimentaire réduite et deviennent cachectiques. L'amaigrissement est presque constant à une période

avancée de la maladie d'autant plus que l'évolution de cette dernière est plus lente (Sidibé, 1996 ; Bengaly, 2003 ; Itrad et Frézil, 2003). Leur croissance est freinée et des effets négatifs sur la reproduction sont observés (Authié *et al.*, 1999). Au dernier stade de la maladie, on observe une faiblesse extrême: l'animal reste couché et les membres antérieurs repliés sous le corps. La maladie évolue soit vers la mort par épuisement soit vers la guérison après une longue période de convalescence. On observe également une phase d'hyperthermie (température >40°C) correspondant au premier pic de parasitémie après une période d'incubation de 8 à 50 jours. Elle est suivie d'une hypertrophie des nœuds lymphatiques (pré-scapulaire, pré-cruraux), des œdèmes, une conjonctivite purulente ou parfois une opacification de la cornée associée à une kératite, un larmolement bilatéral, des symptômes nerveux chez les équidés se traduisant par l'affaiblissement de train postérieur, la parésie voire la paralysie.

Le nombre de globules rouges, la teneur en hémoglobine et l'hématocrite chutent d'une valeur moyenne de 30% à 35% jusqu'à une valeur souvent inférieure à 25% voire 14% dans certains cas pour l'hématocrite, reflétant l'anémie, symptôme majeur des trypanosomoses (Itard, 2000). L'anémie est la conséquence d'une érythrophagocytose provoquée par les macrophages et d'une hémolyse due à des substances élaborées par les trypanosomes (la « *congopaine* » pour *T. congolense*) et des complexes antigène-anticorps à la surface des hématies (Itard et Frézil, 2003). Une hypocomplémentémie se traduisant par une réduction de la fraction C3 du complément (Authié, 2003) et une baisse hormonale (hypophysaire, thyroïdienne et gonadique) peuvent également être décelées.

1.5. Stratégies de lutte

Nombre de méthodes de lutte existent contre les TAA. Elles découlent de l'épizootie de la maladie et doivent en effet agir sur les éléments ou facteurs qui conditionnent l'existence des trois protagonistes de la maladie: parasites, hôtes et vecteurs.

Diverses méthodes de lutte ont été envisagées telles que la tentative de mise au point d'un vaccin, l'utilisation de la chimioprophylaxie et de la chimiothérapie avec des molécules trypanocides, des approches entomologiques visant à éliminer voire éradiquer les vecteurs, la promotion du bétail trypanotolérant, etc. La tendance actuelle est la lutte intégrée associant plusieurs méthodes de lutte: préventives (chimioprophylaxie, lutte anti-vectorielle, élevage de bovins trypanotolérants) et curatives (chimiothérapie).

1.5.1. Lutte biologique

Elle se traduit par la mise en application de méthodes basées sur l'utilisation de prédateurs et de parasites de glossines (champignons, virus, toxines de *Bacillus thuringiensis*, etc.) et de pupes (fourmis, oiseaux, etc.). Cette méthode de lutte est écologiquement acceptable, mais très peu appliquée dans la pratique courante.

L'élevage de bovins trypanotolérants constitue également l'un des moyens de lutte biologique contre la trypanosomose bovine. Cette composante de lutte biologique offre à la différence des premières, moins d'inconvénients sur l'environnement (Dia et Desquesnes, 2003).

1.5.2. Lutte anti-parasitaire

Les stratégies de lutte actuelles sont basées sur les méthodes préventives (chimioprophylaxie) et curatives (chimiothérapie).

La chimioprophylaxie consiste à l'administration de trypanocides à activité préventive. La durée de protection des animaux exposés à l'affection varie en fonction du produit utilisé et de la dose à administrer.

La chimiothérapie est quant à elle très largement utilisée pour la lutte contre les trypanosomes affectant les bovins et repose sur l'utilisation des molécules trypanocides (Touré, 1973). On estime qu'environ 35 millions de doses de trypanocides sont utilisées chaque année en Afrique subsaharienne (Tettey, 2008; Vreysen *et al.*, 2013). Neuf médicaments trypanocides, appartenant à 5 familles chimiques différentes sont utilisés de façon plus ou moins intensive en médecine vétérinaire (Chartier *et al.*, 2000). Cependant, ces mesures prophylactiques connaissent des limites, notamment les résistances des parasites aux molécules utilisées (Touré, 1973).

1.5.3. Lutte anti-vectorielle

Le but de la LAV est de réduire le plus rapidement possible la population de vecteurs et d'atteindre des niveaux suffisants pour avoir un impact sur la transmission, réduisant ainsi de façon significative la transmission ou même en l'interrompant (Cattand, 2001).

Les techniques de lutte sont choisies en fonction des connaissances des conditions épidémiologiques et environnementales, ainsi que de la disponibilité des ressources matérielles et humaines. Une large panoplie de techniques a été développée sur la base des connaissances de l'écologie de la mouche tsé-tsé.

En effet, c'est dans les années 1940 qu'elle a été mise en place après la découverte du Dichloro-diphényl-trichloro-éthane (DDT) et autres composés organochlorés de longue rémanence, puis des insecticides à rémanence plus courte (Endosulfan®) (Douthwaite, 1992). Les pulvérisations insecticides, terrestres ou aériennes, ont connu des succès notamment au Nigéria, en Afrique du Sud et au Zimbabwe. Mais le coût de ces méthodes, leur impact sur l'environnement et la difficulté de prévenir les ré-invasions des zones éradiquées limitent leur application (Douthwaite, 1992). C'est ainsi que le piégeage a été introduit dans les années 1970 en remplacement de l'épandage d'insecticides (Cattand, 2001). Ceci pour la surveillance des densités des populations et aussi pour la lutte avec des résultats variables. Toutefois, ces techniques permettent difficilement d'atteindre l'éradication des populations de glossines. Elles doivent être, pour de meilleurs résultats, associées à d'autres procédés comme le contrôle des populations de glossines par le lâcher de mâles stériles qui est une technique non polluante et ciblée (Vreysen *et al.*; 2000; Bouyer, 2006). Son principe s'appuie sur le fait que les femelles ne s'accouplent en général qu'une fois dans leur vie. La réussite de cette technique repose sur le fait que les glossines mâles rendues stériles par irradiation aux rayons infrarouges vont par compétition s'accoupler avec les femelles sauvages. Ainsi, l'accouplement conduit au stockage d'un sperme non fertile et donc à l'absence de production de larve. C'est une technique très sophistiquée et de manipulation difficile (car utilise des sources radioactives) et son coût prohibitif la rend difficile sur le terrain (Ouedraogo, 1999). C'est alors qu'une autre méthode de contrôle des populations de glossines a été mise au point. Il s'agit de l'imprégnation d'insecticides dans le pelage d'animaux domestiques qui constitueront ainsi des appâts vivants. Ce bain ou ces pulvérisations d'insecticides sur le bétail ou « *poor on* », qui ne demandent pas d'infrastructures coûteuses tout en requérant certaines conditions, cassent les cycles parasites car les glossines qui s'alimentent sur du bétail traité périssent à la suite du repas. Elles peuvent même mourir avant de s'alimenter si l'insecticide est encore frais et elles ne contaminent pas le bétail.

Chapitre 2 : CONCEPT DE LA TRYPANOTOLERANCE

2.1. Définition

La pression glossinienne dans certaines zones est telle que seuls les animaux trypanotolérants (races taurines) peuvent y vivre. Ces taurins sont : les N'Damas, les Baoulés, les Lagunaires, etc. Cependant, la « trypanotolérance » n'est pas synonyme de « trypanorésistance ». En effet, la « trypanorésistance » se définit comme l'aptitude qu'ont certains animaux africains à résister à l'infection ou à contrôler le cycle vital du parasite (Bishop et Mackenzie, 2003). Le mot « trypanotolérance », quant à lui, traduit l'aptitude de certaines races animales à vivre et produire dans des zones à glossine alors que d'autres à qui l'on ne connaît pas cette propriété, y succomberaient. C'est un caractère racial se traduisant par la faculté à sécréter rapidement des anticorps, IgG essentiellement (Roelants, 1986) à un taux suffisamment élevé afin de compenser le changement de la couche antigénique superficielle des trypanosomes (Bélemsaga, 2001).

Du point de vue biologique, elle se définit comme « *une propriété héréditaire qui permet à certaines espèces, races ou individus de vivre normalement dans un milieu naturel infectant, en hébergeant des trypanosomes pathogènes sans présenter de signes cliniques de maladie* » (Coulomb et al., 1977). Elle est liée au milieu infectant car certains ruminants sauvages (buffles, antilopes, phacochères...) en contact permanent, depuis des milliers d'années, avec des glossines infectées sont trypanotolérants (Itard, 2000). Mais elle peut être influencée par de nombreux facteurs, notamment l'état de santé des individus (état nutritionnel, physiologique, biochimique et immunologique) et à l'environnement (Lhoste, 1980 ; Bélemsaga, 2001). Ce qui fait d'elle un caractère non absolu.

2.2. Mécanisme de la trypanotolérance

Les connaissances actuelles indiquent qu'il est régi par au moins trois caractéristiques :

- L'aptitude à contrôler la parasitémie ;
- La capacité de développer une réaction immunitaire efficace ;
- La capacité de résistance à l'anémie.

a) Aptitude à contrôler la parasitémie

La rémission d'un accès de parasitémie est le fait que des anticorps soient dirigés contre les antigènes de surface du trypanosome.

Des études ont montré que l'aptitude supérieure des animaux trypanotolérants à contrôler la parasitémie est associée à une meilleure réponse immunitaire (Murray et Dexter, 1988) caractérisée par une production d'anticorps en nombre élevé.

b) Capacité de développer une réaction immune efficace

La principale caractéristique immunologique des bovins trypanotolérants identifiée à ce jour est leur capacité de produire des réponses IgG élevées et durables contre les antigènes de trypanosomes (Taylor, 1998). Cependant, les IgM sont transitoires et montrent peu de différences entre bovins sensibles et résistants tandis que les anticorps IgG sont beaucoup plus marqués et durables chez les bovins trypanotolérants. Au cours des infections secondaires homologues, la rapidité d'élimination des parasites chez les animaux trypanotolérants semble être liée à de meilleures réponses anamnétiques contre la GVS qui induit l'apparition d'auto-anticorps anti-tryptophane « *like* » par réaction croisée et du « *Tumor necrosis factor alpha* » (TFN α). Ce dernier favorise la différenciation des lymphocytes B et le passage des anticorps dans le système nerveux central qui indique que l'immunité acquise au cours des réinfections successives contribue à exacerber le phénomène de résistance innée (Aubry, 2010). En outre, les bovins trypanotolérants maintiennent, en cas d'infection, des niveaux de complément plus élevés que les bovins sensibles, qui développent une hypo-complémentémie sévère (Authié et Pobel, 1990). Cette capacité de contrôler l'activité complémentaire sérique pourrait être impliquée dans les mécanismes de la trypanotolérance, puisque le fragment C3 du complément joue un rôle clé dans la genèse des réponses immunes, dans le « *switch* » isotypique et dans la production de lymphocytes B mémoires (Authié *et al.*, 1999).

c) Capacité de résistance à l'anémie

Indifféremment du mode d'infection (naturelle ou expérimentale), les résultats des études ont confirmé une tolérance supérieure des taurins à l'anémie, la race N'Dama en particulier. En effet, l'anémie est une conséquence bien connue de la trypanosomose et sa mesure (par l'hématocrite) donne une indication fiable de la gravité de la maladie. Les différences de chute de l'hématocrite permettent de séparer de manière significative les zébus des taurins au cours d'une infection naturelle (Roelants *et al.*, 1987 ; Clausen *et al.*, 1993), d'une infection cyclique expérimentale ou d'une infection expérimentale à la seringue (Murray *et al.*, 1979; Clausen *et al.*, 1990). L'intérêt de l'hématocrite comme marqueur de la

trypanotolérance a été particulièrement mis en évidence par les recherches menées au sein du réseau africain d'étude du bétail trypanotolérant. Une certaine corrélation a été montrée entre la valeur de l'hématocrite et la productivité (Trail *et al.*, 1991).

2.3. Description et répartition des races bovines trypanotolérantes et trypanosensibles

2.3.1. Races trypanotolérantes

Les bovins trypanotolérants appartiennent à l'espèce taurine (*Bos taurus*) ou à certaines populations métissées issues du croisement de zébus et de taurins.

Les caractères généraux du taurin d'Afrique occidentale sont, d'après Doutressolle (1947), les suivants : « *C'est un animal rectiligne, médioligne, ellipométrique. La tête est courte à cornes fortes, à tronc ample et trapu, à robe fauve foncée et aux extrémités noires. La brachycéphalie est nette, la tête forte et courte, le front large, la face raccourcie, le chignon à sommet écarté...* ». Le garrot est épais, les lombes manquent de largeur. La coupe est courte, plus horizontale que chez le zébu. Physiologiquement, le taurin est bien adapté aux régions chaudes et humides (Bélemsaga, 2001). Les taurins sont subdivisés en deux types « génétiques » : les taurins à longues cornes et les taurins à courtes cornes.

a) Taurins à longues cornes d'Afrique occidentale

Ils sont représentés par les races N'Dama et Kouris. La race N'Dama (la plus importante en effectif) possède des cornes en lyre, une robe fauve ou brune. Elle est désignée sous la dénomination générale de « bovins de Guinée ». La race Kouri quand à elle, possède des cornes à forme bulbeuse caractéristique. Elle vie en bordure et sur les îles du lac Tchad.

De nos jours, on rencontre la race N'Dama au Sénégal (parfois légèrement métissée avec des zébus Peulh), en Côte d'Ivoire (le long des frontières guinéenne et malienne), au Mali (dans la région du Sud-Ouest, en particulier à Yanfolila, mais dont le degré de pureté est très faible). Les N'Dama de Yanfolila ont été importés au Burkina Faso (Samandéni et Gaoua). La race se rencontre également en Guinée Bissau, en Sierra Léone et au Libéria (Bélemsaga, 2001).

b) Taurins à courtes cornes d'Afrique occidentale

Ces taurins ont une robe variable avec très fréquemment une dominance de la couleur noire ou blanche. Ce type génétique que l'on rencontre depuis la Côte d'Ivoire jusqu'au Tchad est désigné par de nombreuses appellations qui ont chacune

été décrite comme une race particulière : Baoulé (Côte d'Ivoire), Muturu (Nigéria), Somba et Lagunaire (Bénin, Togo), bovin Lobi-Gouin (Burkina Faso), Bakosi (Cameroun), bovins Nuba (Soudan), etc. (Bélemsaga, 2001).

Contrairement aux N'Dama, les taurins à courtes cornes ne sont que très rarement confiés aux populations à tradition pastorale. Ils sont plutôt sédentaires et constituent dans l'économie des villages un appoint occasionnel aux revenus des cultures.

2.3.2. Races trypanosensibles

Les zébus furent les derniers introduits en Afrique suite aux migrations et invasions arabes et indiennes (Hanotte *et al.*, 2002). Leur diffusion s'est accrue à la faveur de l'épidémie de la peste bovine à la fin du XIX^{ème} siècle. Ils furent gardés à cause de leur résistance spécifique au stress hydrique et à leur adaptation à l'habitat. Ils ont une aire d'extension qui coïncide globalement avec la bande sahélienne comprise entre les isohyètes 200-300 mm (Hanotte *et al.*, 2000). Dans les régions marginales où les pâturages et les sources d'eau sont aléatoires. Leur élevage constitue souvent le seul moyen de valorisation des terres (Jahnke, 1984). On les classe en zébus à courtes cornes, à cornes en lyre moyenne et haute (Doutressolle, 1947).

Les races de zébus sont nombreuses, très variées et réparties principalement dans les zones indemnes de glossines. Ils possèdent par ailleurs des caractéristiques zootechniques plus intéressantes pour les éleveurs car sont plus grands que la plupart des taurins (1,1-1,5 m), plus lourds (240-410 kG), plus productifs avec des robes de couleurs variées.

2.3.3. Races bovines issues du croisement entre zébus et taurins

Il existe aussi les produits de croisement entre les zébus trypanosensibles et les taurins trypanotolérants qui ont le plus souvent un comportement intermédiaire vis-à-vis de la pathogénicité des trypanosomes (Murray *et al.*, 1982). Ces opérations de métissage font craindre la perte de la pureté des races indigènes (zébus et taurins). Ce croisement entre deux races bovines peut être provoqué soit par les éleveurs soit favorisé par la transhumance des zébus vers les zones australes plus humides à la recherche de pâturage et de sources d'eau pendant la saison sèche. En effet, le petit gabarit des taurins trypanotolérants est le prétexte pour les soumettre à des opérations intenses de métissage avec les zébus qui ont un grand format propice à la culture attelée, à la production de viande et de lait.

CHAPITRE 3 : Protéines salivaires des arthropodes hématophages, rôles et applications

L'embranchement des arthropodes est de très loin celui qui possède le plus grand nombre d'espèces animales répertoriées (5-10 millions) (Ødegaard, 2000). Parmi ces arthropodes, 14 000 espèces sont hématophages (Ribeiro, 1995). On estime que seulement 2-3% seraient des vecteurs de maladies humaines et animales (Ribeiro, 1995). Les maladies transmises par ces derniers sont de réels problèmes de santé publique dans le monde, particulièrement en Afrique subsaharienne.

Chez certains arthropodes vecteurs de maladies (culicidés, tabanidés, phlébotomes, etc.) seule la femelle est hématophage. Elle a besoin des protéines contenues dans le sang pour la maturation de ses œufs. Chez d'autres arthropodes comme les glossines, les tiques, les triatomés et les stomoxes, les deux sexes sont hématophages. La forme et l'agencement des pièces buccales des arthropodes sont caractéristiques de leur mode d'alimentation. Selon que l'espèce soit omnivore, végétarienne, carnivore ou qu'elle se nourrisse de liquide, les pièces buccales seront de type broyeur, piqueur, suceur ou lécheur.

Selon la nature des pièces buccales, deux stratégies de prise de repas sanguin ont été décrites:

- la solénophagie : caractéristique de ceux à trompe longue qui prélèvent le sang directement dans le capillaire sanguin grâce à leurs appendices permettant de perforer les tissus de l'hôte. C'est le cas des Culicidés, des Rudividés, des glossines.
- la telmophagie : stratégie adoptée par les arthropodes qui prélèvent le sang (mais aussi la lymphe et des débris cellulaires) à partir de micro-hématomes cutanés créés par rupture physique des tissus et des parois vasculaires par cisaillement grâce à leur appendice court et lacérant. Cette stratégie se rencontre chez certains arthropodes tels que les tabanidés, les stomoxes, les tiques, etc.

Lors du repas sanguin, l'arthropode doit localiser dans un premier temps un vaisseau sanguin ; c'est la phase du « *probing* » ou d'exploration qui consiste à un tâtonnement du derme par ses pièces buccales. Chez la glossine, les pièces buccales comprennent une partie piqueuse, l'haustellum ou proboscis qui est longue, grêle et enchâssée entre deux palpes maxillaires recouverts de poils. Il comprend le labre, l'hypopharynx et le labium. Ce dernier, portant à son extrémité des dents

lamellaires, pénètre et recherche activement un capillaire sanguin en dilacérant les tissus pour former un micro hématome à partir duquel le sang est aspiré. Ceci engendre une réponse de la part de l'hôte de type hémostatique, inflammatoire et immunitaire permettant de minimiser les pertes de sang des capillaires, veinules et artérioles en quelques secondes (Ribeiro, 1987).

Les arthropodes hématophages, pour contrer ces réponses de l'hôte, injectent un mélange bioactif de protéines salivaires à plusieurs reprises durant la pénétration des pièces buccales, lesquelles sont présumées assurer des rôles divers. Certains composants salivaires sont impliqués dans la facilitation de la prise du repas sanguin grâce à leurs propriétés pharmacologiques telles que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'inhibition de la coagulation, la vasodilatation et l'inhibition de la réaction inflammatoire de l'hôte au site de la piqûre (Ribeiro et Francischetti, 2003). D'autres sont impliqués dans des phénomènes d'immunomodulation de la réponse immunitaire de l'hôte vertébré et peuvent influencer la transmission ou l'établissement de pathogènes inoculés lors du repas (Gillespie *et al.*, 2000).

3.1. Composés salivaires et hémostase chez l'hôte.

Pour faciliter la prise de repas sanguin, les arthropodes hématophages injectent des microquantités de salive afin de contrarier la réponse hémostatique (mécanisme permettant à maintenir la fluidité du sang dans les vaisseaux sanguins par un arrêt de saignement et empêchement de thrombose) de l'hôte induite par la piqûre. Les protéines impliquées dans ces réactions sont les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, les inhibiteurs de la coagulation du sang et les inhibiteurs de la vasodilatation.

3.1.1. Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

L'un des éléments important de la première étape de la cascade hémostatique est la faculté qu'ont les plaquettes sanguines d'interagir avec différentes molécules de leur matrice extracellulaire comme le collagène et la fibronectine donnant lieu à une agrégation plaquettaire qui joue un rôle important dans l'hémostase chez les mammifères. Elle est la première ligne de défense de tout individu car permet d'éviter la perte de sang lors d'une blessure et se met en place très rapidement. La lésion de l'endothélium par les pièces buccales entraîne une libération d'Adénosine diphosphate (ADP) par les cellules endommagées et de collagène par les cellules sous-endothéliales. Les plaquettes présentes dans le sang, s'activent et adhèrent entre elles et au sous-endothélium, afin de réagir à cette augmentation d'ADP.

Elles changent alors de conformation et libèrent leurs contenus dans leurs granules denses qui contiennent notamment de l'ADP, de la sérotonine et du thromboxane A₂ (TXA₂). L'ADP renforce l'agrégation plaquettaire (Shattil et al., 1994) tandis que la sérotonine et le TXA₂ provoquent une vasoconstriction qui participe à l'hémostase en diminuant le flux sanguin. Ces mécanismes se traduisent par une agrégation plaquettaire qui forme un thrombus blanc limité au niveau des lésions endothéliales par des prostaglandines et l'«*Endothélium-derived relaxing factor*» (EDRF) qui est un rétrocontrôle empêchant tout risque de thrombose (formation de caillot sanguin dans le vaisseau).

La salive des arthropodes contient un cocktail et une diversité structurale et fonctionnelle de molécules anti-agrégantes qui empêchent la formation du thrombus plaquettaire, fluidifiant le sang et permettant ainsi une prise du repas sanguin plus rapide et complète. C'est le cas des apyrases (ATP-diphosphohydrolase) qui sont des protéines de grande importance dans la prise de repas sanguin car jouent un rôle sur le temps du «*probing*» et dans la neutralisation de l'ADP. Elles hydrolysent en effet l'ADP et l'Adénosine triphosphate (ATP) en Adénosine monophosphate (AMP) et en phosphate inorganique qui sont des antagonistes de l'activation des plaquettes (Ribeiro, 1995 ; Poinsignon, 2005 ; Poinsignon et al., 2008). Cette protéine est retrouvée chez de nombreuses espèces selon le pH optimal d'action. C'est ainsi que trois classes ont été décrites chez différents hématophages :

- Une 1^{ère} appartenant à la famille des 5'-nucléotidases identifiée chez des moustiques (*Aedes (Ae.) aegypti*, *Anophèles (An.) gambiae*, *Culex*), des glossines (*G. morsitans*), des tiques molles (*Ornithodoros savignyi*) et dures (*Boophilus microplus*) et de tabanidés (*Chrysops sp*);
- Une deuxième, enzymatiquement activée, a été à l'origine identifiée dans les glandes salivaires de punaise de lit, *Cimex lectularius* (Valenzuela et al., 1998) et par la suite confirmée chez *Phlebotomus (P.) papatasi* (Valenzuela et al., 2001) et *Lutzomyia (L.) longipalpis* (Charlab et al., 1999);
- Enfin, une 3^{ème} identifié dans la puce *Xenopsylla cheopis*, possédant une séquence protidique qui ressemble à celle des protéines de la famille des nucléotidases CD 39 trouvées dans l'endothélium (Andersen et al., 2007).

En plus des apyrases, d'autres anti-agrégants plaquettaires existent. Il s'agit des prostaglandines similaires à celles rencontrées chez l'homme qui assurent l'inhibition de l'activité des plaquettes chez certaines espèces de tiques telles que *Ixodes scapularis* et *Amblyomma americanum* (Ribeiro et al., 1992).

Chez la glossine, deux protéines majeures impliquées dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire ont été identifiées (Mant *et al.*, 1981), l'une d'elle ayant une activité anti-thrombine, le « *Tsetse thrombin inhibitor* » (TTI), composé majeur retrouvé chez *G. m. morsitans* (Cappello *et al.*, 1998) et l'autre, les « *Tsetse salivary growth factor* » (TSGF 1 & 2) ayant une activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire (Li et Askoy, 2000).

3.1.2. Inhibiteurs de la coagulation du sang

Parallèlement à l'agrégation plaquettaire, le système de la coagulation plasmatique a tendance à s'activer spontanément. Le fibrinogène du plasma se transforme en un réseau de fibrine insoluble qui va consolider le caillot plaquettaire et donner un caillot (de fibrine) qui retient les globules rouges.

Ce processus fait intervenir une cascade d'activation de précurseurs circulant inactifs qui doivent être clivés (par la perte de leur chaîne protéique) pour être activés. Les facteurs plasmatiques, désignés par des chiffres de I à X (suivis d'un « a » quand ils sont activés sous effet des ions calcium) sont essentiellement synthétisés par le foie. Les facteurs II, VII, IX et X se comportent comme des enzymes du groupe sérine-protéase et sont capables d'activer d'autres facteurs. Cette activation peut se faire via deux voies, une voie intrinsèque (système de contact) et une voie extrinsèque (effraction cellulaire).

La plupart des arthropodes hématophages ont mis au point des stratégies afin de détourner le processus de coagulation. Certains produisent des facteurs anticoagulants, d'autres synthétisent des molécules qui interagissent à différents niveaux de la formation du caillot et donc bloquent l'action des facteurs de coagulation. Elles ciblent spécifiquement les protéines de type sérine-protéase ou les complexes de coagulation dans le but de bloquer ce processus le temps que l'arthropode prenne son repas sanguin (Valenzuela *et al.*, 2002).

Certains arthropodes hématophages sélectionnent dans leur salive au moins une substance anti-thrombine telle que l'anophéline (peptide de 6,5 kDa) chez *An. Albimanus* (Francischetti *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 1999) et d'autres composés salivaires qui ont une action directe sur la thrombine. C'est le cas de la « *Tsetse thrombin inhibitor* » qui est le composé le plus retrouvé dans les glandes salivaires de *G. m. morsitans* (Cappello *et al.*, 1996 ; Cappello *et al.*, 1998).

3.1.3. Inhibiteurs de la vasodilatation

Les vasodilatateurs injectés au site de piqûre permettent d'augmenter le flux sanguin par dilatation des vaisseaux et de contrer l'effet de vasodilatateurs endogènes (thromboxane et sérotonine) libérés par l'activation de plaquettes lors de la réponse hémostatique de l'hôte. Certains vasodilatateurs ont été caractérisés au niveau moléculaire. C'est le cas d'une myéloperoxydase à activité catéchol oxydase/peroxydase retrouvée chez *An. albimanus* et *An. gambiae* qui détruit la sérotonine et la noradrénaline produites par l'hôte (Ribeiro et Nussenzveig, 1993); de deux tachykinines, les « sialokinine 1 & 2 » qui stimulent la production de l'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales et engendrent une vasodilatation chez *Aedes* (Brunelleschi *et al.*, 1990 ; Eglezos *et al.*, 1991); des amines vasodilatatrices (adénosine et AMP) de salive de phlébotomes (*P. papatasi*) (Ribeiro *et al.*, 1999) et des prostaglandines (PG-E2 et PG-F2) chez les tiques (Browman *et al.*, 1996 ; Ribeiro *et al.*, 1992).

Chez la glossine par contre, deux protéines sont impliquées dans la vasodilatation. Il s'agit des TSGF1 et 2 (~53 kDa) qui sont également impliquées dans l'agrégation plaquettaire (Li et Askoy; 2000).

3.2. Effets des antigènes salivaires sur la réponse immunitaire de l'hôte

3.2.1. Réaction inflammatoire

La salive des arthropodes hématophages intervient dans l'inhibition de la réaction inflammatoire occasionnée par la destruction des tissus par leurs pièces buccales (Ribeiro *et al.*, 1991). La présence de macrophages semble être indispensable à la mise en place de l'inflammation. En effet, il a été montré dans le modèle murin que l'injection de la salive d'*An. stephensi* n'entraînait une inflammation de la peau qu'en présence de macrophages (Demeure *et al.*, 2005). Les polynucléaires neutrophiles (PN) et les monocytes, quant à eux, libèrent des cytokines (IL1, IL6 et TNF α) responsables de la douleur (Cook *et al.*, 2002) mais aussi de la sérotonine et l'histamine entraînant une augmentation de la perméabilité des vaisseaux. Ainsi donc, de nombreuses molécules interagissent pour générer la douleur qui accompagne l'inflammation (Millan, 1999).

Les arthropodes possèdent dans leur salive des composés capables d'inhiber la sensation de la douleur perçue par l'hôte. Des composés salivaires à effets anti-nociceptif comme l'apyrase (diminuant le niveau d'ATP), les anti-histamines et les protéines se liant à la sérotonine sont retrouvées dans la salive de tiques et de

triatomes (Paesen *et al.*, 1999) tout comme l'hamadarine (protéine D7 de forme courte, 16kDa) retrouvée chez *An. stephensi*. Ces derniers inhibent le système de contact en empêchant l'activation réciproque entre le facteur XIIa et la kallikréine en présence du zinc (Isawa *et al.*, 2002).

3.2.2. Immunomodulation induite par les protéines salivaires

Afin d'assurer le succès de son repas, l'arthropode est amené à contrecarrer l'action du système immunitaire du vertébré. De ce fait, un contrôle rapide du système immunitaire du vertébré par l'arthropode dès les premiers instants de la piqûre s'avère nécessaire par l'injection de protéines salivaires qui vont activer la mise en place de mécanismes immunitaires innés et adaptatifs du vertébré (Wikel, 1981). Ce contrôle peut s'exercer sur certains systèmes effecteurs de l'appareil immunitaire ou directement influencer le fonctionnement de ce dernier.

Des études ont montrées que les protéines salivaires sont de puissants modulateurs de la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte. Ces protéines sont de ce fait capables d'induire une réponse qui pourrait jouer un rôle clé dans la protection/susceptibilité de l'hôte à l'infection du fait qu'elles peuvent également entraîner une réorientation de la réponse immunitaire et créer un micro-environnement permissif à la transmission des pathogènes (Ribeiro, 1989; Nuttall *et al.*, 2000). En effet, chez la souris, la co-inoculation d'extraits de glandes salivaires d'*Ae. aegypti* et du virus sindbis entraîne une augmentation de réponse de type Th2 alors que la réponse de type Th1 est diminuée (Schneider *et al.*, 2004). La sialokinine, présente dans la salive des moustiques du genre *Culex* et *Aedes*, bien qu'ayant un effet vasodilatateur, est aussi capable d'induire un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en favorisant une réponse de type Th2 avec production d'IL4 et d'IL10 (Zeidner *et al.*, 1999).

L'induction d'une réponse Th1 par la salive n'est donc pas un phénomène couramment observé même si la production d'IFN γ a été rapportée par l'exposition aux piqûres d'anophèles (Donovan *et al.*, 2007). La salive de certains arthropodes tels que les phlébotomes contient une vaste gamme de composés ayant des propriétés immuno-suppressives qui facilitent l'infection (Gillespie *et al.*, 2000). Ce sont essentiellement des cytokines de type Th1 (IL12, IFN γ), Th2 (IL5, IL4, IL10) de même que des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , GM-CSF) (Edelman *et al.*, 2000). Des études ont montrées que les Th1 orientent la réponse immunitaire vers une réponse lymphocytaire de type Th2 (Caljon *et al.*, 2006b) et inhiberaient

localement la réponse pro-inflammatoire de l'hôte. Ce qui pourrait avoir pour conséquence qu'une pré-exposition à la piqûre de certains arthropodes entraînerait une protection contre les futurs challenges vis-à-vis de ces derniers.

3.2.3. Développement de biomarqueurs d'exposition à la piqûre des arthropodes hématophages

Le système immunitaire de l'hôte vertébré étant capable de reconnaître certaines protéines salivaires, il peut développer une réponse spécifique contre ces dernières et peut aussi être utilisée pour la mise au point des biomarqueurs d'exposition à la piqûre de certains arthropodes vecteurs de maladie. En effet, dans les réponses dirigées contre la salive totale d'arthropodes hématophages, on a pu montrer que des protéines recombinantes spécifiques ou des peptides salivaires spécifiques ont une association significative avec l'exposition humaine aux piqûres de certains arthropodes tels que les tiques, les phlébotomes, les triatomes et les moustiques (Fontaine *et al.*, 2011).

C'est ainsi que certaines études ont montré que deux protéines recombinantes de la salive de *L. longipalpalis*, la LJM17 et la LJM11, pourraient être des biomarqueurs de l'exposition à la piqûre de ce vecteur et donc prédictifs du risque de leishmaniose viscérale chez l'homme et le chien (Souza *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2010).

Des isotypes IgG1 et IgG4 spécifiques à la salive de triatomes, vecteurs de la maladie de Chagas, ont été détectés chez des individus exposés aux piqûres de triatomes ou atteints de la maladie de Chagas (Nascimento *et al.*, 2001). Récemment, les réponses IgG spécifiques à deux protéines recombinantes de 14 et 21 kDa de la salive de *Triatoma infestans* ont été décrites comme potentiels biomarqueurs d'exposition et pourraient servir au diagnostic précoce de nouvelles piqûres et à la surveillance de nouvelles ré-invasions de triatomes à travers la détection des zones prioritaires (Schwarz *et al.*, 2009a) et de campagne de lutte anti-vectorielle (Drame *et al.*, 2010).

Aussi, des anticorps IgG spécifiques à la salive de glossine ont été détectés chez des lapins (Ellis *et al.*, 1986) et des humains (Poinsignon *et al.*, 2008) exposés aux piqûres de ces insectes. Alors, l'évaluation de la réponse anticorps spécifique à la salive de glossines chez ces individus exposés pourrait s'avérer comme un indicateur d'exposition aux piqûres de glossines. D'autres études ont également montré que la réponse de l'hôte contre les protéines salivaires de glossines pourrait servir de marqueur d'exposition et constituerait un outil pour l'évaluation du risque de

transmission des trypanosomes (Poinsignon *et al.*, 2008). Elle permettrait également d'utiliser les protéines immunogéniques Tsal-1 et Tsal-2 comme de potentiels candidats biomarqueurs d'exposition (Caljon *et al.*, 2006a). Il apparaît donc que la réponse immune contre la salive de glossines, évalue directement les contacts animaux/glossines et pourraient être une méthode alternative ou complémentaire dans l'évaluation du degré d'exposition des hôtes vertébrés.

Ainsi, une étude récente a montré que l'utilisation de la réponse aux antigènes salivaires de *G. p. gambiensis* pourrait être prometteuse dans l'évaluation de l'exposition des hôtes à la piqure de la mouche tsé-tsé (Dama *et al.*, 2013). Par ailleurs, celle de Somda *et al.* en 2013, avait montré que la salive totale de glossine pourrait servir de biomarqueur d'exposition en milieu naturel chez des bovins vivant en milieu infesté de tsé-tsé.

C'est dans le but d'évaluer la réponse anti-salive de glossine comme biomarqueur d'exposition chez les bovins et de tester une stratégie vaccinale anti-transmission que s'inscrit notre travail.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

La présente étude a été expérimentale. Le matériel suivant a été utilisé.

1.1.1. Matériel biologique

a) Glossines

G. m. submorsitans provenant des colonies de l'insectarium du CIRDES (Bobo-Dioulasso, Burkina Faso) ont été utilisées à la fois pour les expositions expérimentales des bovins aux piqûres de glossines et pour la récolte de protéines salivaires qui ont servis comme antigènes pour l'évaluation de la réponse anti-salivaire.

b) Bovins

Des bovins, au nombre de 20 (10 Baoulés, race trypanotolérante et 10 zébùs Peulh, race trypanosensible), âgés de 2-3 ans ont été achetés à Dori (ville au Nord du Burkina Faso, zone indemne de glossines) pour les zébùs Peulh et dans la région de Gaoua (ville au Sud-Ouest du Burkina Faso, zone infestée de tsé-tsé) pour les baoulés. Ils ont été ensuite transférés dans la grande étable sous-moustiquaire du CIRDES (300 m²) et mis en quarantaine pendant deux mois. Au cours de cette quarantaine, ils ont été gardés sous surveillance vétérinaire avant le démarrage de l'expérimentation.

La surveillance vétérinaire a consisté à un blanchiment par l'administration de vaccins contre la pasteurellose et le charbon symptomatique, à un traitement par un déparasitant interne associé à un antibiotique (Ivomec® et Tenaline®), un déparasitant externe (Vadfène®) et un trypanocide (acéturate de diminazène (Bérénil®) à la dose de 7 mg/kg) associé d'une supplémentation en vitamines (Stressvitam®). L'alimentation des bovins était à base de fourrage et de tourteaux de coton ainsi que d'une supplémentation en sels de manière régulière. L'eau était fournie *ad libitum*. Ces bovins ont été ensuite exposés à diverses intensités de piqûres de *G. m. submorsitans*, suivies d'une épreuve de challenge à *T. congolense*.

c) Rongeurs et trypanosomes

Des souris NMRI disponibles à l'animalerie du CIRDES ont été utilisées pour la production de parasites sanguicoles. Ces souris ont été irradiées aux rayons gamma puis infectées par la souche cryostabilisée Ser. 71 de *T. congolense*. Après 10 jours d'infection, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'éther, puis saignées par ponction cardiaque après ouverture du thorax pour la récolte des trypanosomes.

Ces parasites ont été ensuite utilisés pour des épreuves de challenge des bovins (baoulés et zébus Peulh) antérieurement exposés aux piqûres de glossines.

1.1.2. Matériel de laboratoire

Différents matériels ont été utilisés parmi lesquels nous pouvons citer :

☞ Pour les prélèvements:

- Des tubes secs sous vide, *VACUETTE Thermo* de 10 mL pour la récolte du sérum (pour la sérologie);
- Des tubes sous vide avec anticoagulant (héparine), *VACUETTE Thermo* de 10 mL pour la mesure de l'hématocrite et de la parasitémie;
- Des aiguilles *VENOJECT Thermo*.

☞ Pour la mesure de l'hématocrite:

- Des tubes capillaires à hématocrite et de la pâte à modeler (plasticine) ;
- Une centrifugeuse à microhématocrite (*Thermo HERAEUS Pico 17 SIGMA*) ;
- Un abaque *Mikro Hämatokrit SIGMA* pour lecture des valeurs de l'hématocrite.

☞ Pour la détermination de la parasitémie:

- Un crayon « *diamant* » pour la coupure des tubes capillaires afin de récolter le *Buffy coat*;
- Des lames et lamelles à microscopie ;
- Un microscope de type *LABORLUX S* pour la lecture de la parasitémie.

☞ Pour la salivation de glossines:

- Un tapis chauffant réglé à 37°C;
- Des lames à microscopie;
- Des tissus moustiquaires et des bracelets élastiques;
- Des tubes Eppendorf de 1,5 mL;
- Des tubes Falcon de 50 mL et du papier aluminium;
- Une micropipette.

☞ Pour la mise en œuvre des tests immunoenzymatiques par ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) indirect :

- Des plaques en polystyrène *Polysorp* de 96 puits à fond plat et à fond rond ;
- Une balance de précision de type *SARTORIUS L610 D* (précision à 10^{-2} g, sensibilité $\leq \pm 5 \cdot 10^{-6}$ kg) pour mesures des solutés ;
- Un pH mètre *BASIC 20 « CRISON »*;

- Un spectrophotomètre de type *Labsystems MULTISKAN MCC/340* couplé à un ordinateur pour la lecture de densités optiques ;
- Un incubateur à plaque ;
- Des pipettes et micropipettes *VWR* et *GILSON* à canal unique et à canaux multiples.

1.2. Méthodes

1.2.1. Obtention de la salive de glossines

Elle a été mise en œuvre selon un protocole bien défini (Annexe 1), développé par Gidudu *et al.* (1995) et modifié par Poinsignon *et al.* (2007).

Les glossines (*G. m. submorsitans*) provenant de l'insectarium du CIRDES, mâles et femelles (sexe ratio=1), ont été privées de nourriture 2 à 3 jours précédents la salivation afin de stimuler leur appétit. Elles ont été ensuite réparties par groupes de 4 à 6 dans des tubes Falcon de 50 mL recouverts de papier aluminium et dont l'ouverture a été refermée par du tissu moustiquaire bien propre, stérilisé à l'étuve et dépourvu d'insecticide (photo 2). Sur un dispositif de lames à microscopie disposé sur un tapis chauffant réglée à 37°C (température moyenne de l'homme, un des hôtes nourriciers des glossines), nous avons déposé quelques dizaines de microlitres du tampon de salivation (Hepes 10mM-EDTA 5mM-NaCl 150mM).

Les tubes contenant les glossines ont été par la suite déposés sur le dispositif de lames qui repose sur le tapis chauffant, permettant ainsi aux glossines de passer leur proboscis à travers les mailles de la moustiquaire pour saliver dans le tampon de salivation. Après quelques minutes de salivation, le mélange tampon/salive est récolté pour les deux sexes dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Une solution d'inhibiteur de protéase (*Mannheim, Germany, Roche diagnostics*) est ensuite ajoutée au mélange tampon-salive à raison de 40 µL pour 1mL de salive. Ces tubes sont enfin conservés à -80°C jusqu'au dosage des protéines salivaires.

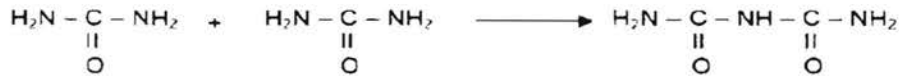


*Photo N°2: Tube Falcon contenant des glossines lors d'une séance de salivation.
(Photo Madinaar D. P.)*

1.2.2. Dosage des protéines salivaires

Le principe du protocole est basé sur le fait qu'en milieu alcalin (NaOH), toutes les molécules possédant au moins deux liaisons peptidiques de type $\begin{matrix} -C-NH- \\ || \\ O \end{matrix}$ ou $\begin{matrix} -C-NH_2 \\ || \\ O \end{matrix}$ peuvent former avec les ions Cu^{2+} un complexe bleu violet.

Cette coloration apparaît également lors de la condensation de deux molécules d'urée d'où le nom de méthode de biuret.



Il est à noter qu'il faut au minimum trois ou quatre liaisons peptidiques pour que le complexe formé donne une coloration notable.

Le protocole de dosage de protéines salivaires est une technique colorimétrique quantitative basée sur le test de l'acide bicinchonique (kit BCA). Il a été utilisé pour déterminer la concentration des protéines salivaires.

Pour ce faire, une gamme de concentrations décroissantes à partir d'une solution étalon de BSA (*Bovine serum albumin*, 2 000 µg/mL) a été constituée. La solution de la gamme de BSA et l'échantillon salivaire à doser sont déposés en double dans une plaque en polystyrène, à raison de 25 µL/puits. Ensuite, nous avons ajouté 200 µL de water reagent ou WR (préparé dans le rapport 25 BCA réactif A, 25 BCA réactif B pour 1 BCA réactif C) dans chaque puits (Annexe 2). Après une incubation de la plaque (photo 3) pendant 30 minutes à température ambiante, nous avons fait sa lecture au spectrophotomètre à 540 nm. A partir des DO (Densité Optique) de la gamme de BSA, une droite de régression des DO a été tracée en fonction de la concentration de la gamme de BSA (figure 6). Cette droite étant une fonction affine d'équation $y = ax + b$ (où «y» est la DO de l'échantillon, «a» la pente, «x» la concentration de BSA et «b» l'ordonnée à l'origine). Nous avons pu calculer la concentration des protéines salivaires de l'échantillon en utilisant la formule:

$$X = (DO_{\text{échantillon}} - b) / a$$

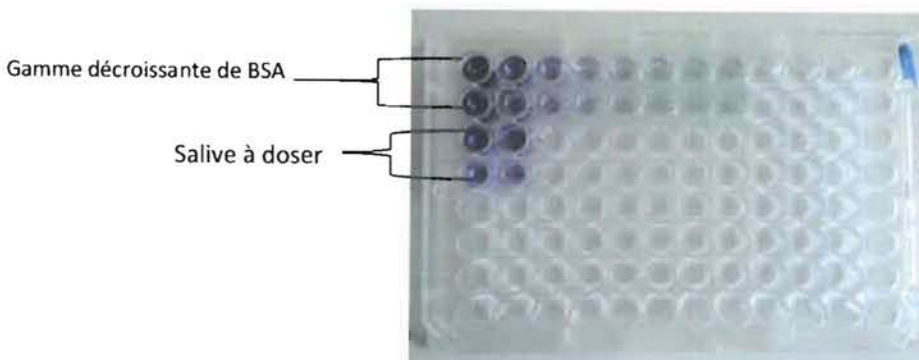


Photo N°3: Plaque ELISA de dosage de protéines salivaires (Photo Madingar D. P.)

1.2.3. Exposition expérimentale des bovins aux piqûres de *Glossina morsitans submorsitans*

Afin d'analyser la réponse anti-salivaire en fonction de l'intensité d'exposition et de la race, deux races bovines de différentes sensibilités à l'infection trypanosomienne (baoulés, race trypanotolérante et zébus Peulh, race trypanosensible) ont été exposées à diverses intensités de piqûres par *G. m. submorsitans*. Elles ont été exposées une ou deux fois par semaine aux piqûres pendant 1 heure/exposition selon les groupes du tableau ci-après :

Tableau I : Répartition des bovins d'expérimentation par groupe d'exposition

	Effectif Groupe 1 Faiblement exposé : 1 fois par semaine (5♀ X5♂ de glossine)	Effectif Groupe 2 Fortement exposé : 2 fois par semaine (25♀ X25♂ de glossine)	Effectif Groupe 3 Non exposé ou groupe témoin
Zébus Peulh	4	4	2
Baoulés	4	4	2
Total	8	8	4

Les cages de glossines ont été fixées sur les flancs rasés des bovins et recouvertes de tissus noirs pour faciliter la prise du repas sanguin des glossines (photos 4 et 5).



Photo N°4 : Cages de glossines fixées aux flancs du zébu pour un repas sanguin. (Photo Madingar D. P.)



Photo N°5 : Couverture des cages à l'aide d'un tissu noir pour le repas. (Photo Madingar D. P.)

Après chaque exposition, les cages contenant les tsé-tsé étaient récupérées et mises au congélateur afin d'endormir les glossines pour un examen visuel de leur abdomen afin d'apprécier leur état d'engorgement (photo 6).



Photo N°6 : Glossines gorgées après des expositions aux bovins. (Photo Madingar D. P.)

L'exposition expérimentale a duré 11 semaines. Un prélèvement sanguin (10 mL) était fait une fois la semaine au niveau de la veine jugulaire pour chacune des vaches. Les prélèvements sanguins ont été centrifugés à 2 000 g pendant 15 minutes à température ambiante et les sérums ont été collectés et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Chaque bovin disposait d'une fiche sur laquelle étaient notés l'appréciation de la qualité d'engorgement des mouches, les dates d'exposition, les dates de prélèvements sanguins et les problèmes rencontrés au cours des expérimentations (Annexe 3).

1.2.4. Epreuve de challenge avec *T. congolense*

Pour évaluer l'impact de l'immunomodulation induite par la salive sur la réponse humorale ou cellulaire d'une part et l'établissement de l'infection chez les baoulés et zébus Peulhs d'autre part, les animaux des groupes n°1 et 2, ainsi que ceux des contrôles ont été soumis à une épreuve de challenge par inoculation d'une dose de *T. congolense* (10^3 parasites/mL) par voie intraveineuse à l'aide d'une seringue. Pendant cette épreuve, un prélèvement sanguin a été fait tous les deux jours au niveau de la jugulaire sur des tubes héparinés pour le suivi hebdomadaire de deux paramètres du cours infectieux (hématocrite, parasitémie) sur une durée de 22 jours.

1.2.4.1. Hématocrite

Cette technique a nécessité l'utilisation de tubes capillaires à microhématocrite. Après le prélèvement du sang à partir de la veine jugulaire dans un tube hépariné, les tubes capillaires de 75 mm de longueur et 0,5 mm de diamètre intérieur ont été utilisés pour la détermination des hématocrites. Ensuite, ils ont été bouchés à l'une de leurs extrémités avec de la pâte à modeler (plasticine) puis soumis à une centrifugation de 13 000 tours/min pendant 5 min à l'aide d'une centrifugeuse à micro hématocrite de type SIGMA™ 201M. Le contenu des tubes capillaires se sépare alors en trois couches, de bas en haut, on a :

- Les globules rouges près de la pâte à modeler;
- Une mince couche de globules blancs à l'interface globule rouge-sérum, constituant le *Buffy coat* (zone de concentration des parasites);
- Une couche claire de sérum.

L'hématocrite, représentant le pourcentage du volume occupé par les globules rouges dans un volume de sang total donné, permet d'apprécier l'anémie et s'exprime, après centrifugation du sang, par le rapport entre la colonne globulaire (constituée à 95 % par les globules rouges) et la totalité de la colonne de sang.

La lecture des valeurs de l'hématocrite a été ensuite réalisée à l'aide d'une échelle (abaque) de lecture d'hématocrite (photo 7).

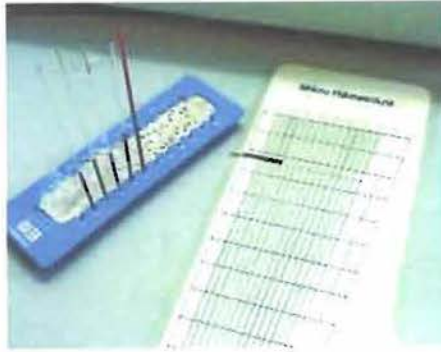


Photo N°7: Mesure de l'hématocrite.
(Photo M. Desquesnes)

1.2.4.2. Parasitémie

Après lecture de l'hématocrite, le tube capillaire a été coupé à environ 1 mm au dessous de l'interface globules rouges/globules blancs/sérum (photo 8) : le « *Buffy coat* » où sont concentrés les trypanosomes. Ce dernier a été ensuite déposé entre lame et lamelle (photo 9) puis observer au microscope selon la méthode de Murray (Murray *et al.*, 1977), au grossissement de 10 x 40.



Photo N° 8 : Section du tube à l'interface serum - globules rouges. (Photo M. Desquesnes)



Photo N° 9 : Dépôt du Buffy coat sur la lame. (Photo M. Desquesnes).

Une fiche individuelle était disponible pour chaque bovin où étaient notées toutes les informations utiles: la parasitémie, l'hématocrite, les dates de prélèvements sanguins ainsi que les autres problèmes constatés au cours de l'infection (Annexe 4).

1.2.5. Dosage des anticorps anti-salive par ELISA-indirect

L'ELISA indirect est une réaction immuno-enzymatique colorée qui permet de doser les anticorps IgG dans le sérum par l'action du substrat d'une enzyme (Magniez, 2008). Dans notre cas, il s'est agit d'anticorps (Ac) de classe IgG dirigés contre les Ag de la salive de glossine. Son principe repose sur la sensibilisation des microplaques en polystyrène à fond plat (phase solide) par des antigènes solubles (5 µg/mL). Les immunoglobulines spécifiques des sérums à tester se fixent sur les

antigènes préalablement fixés. Le complexe antigène-anticorps ainsi formé est par la suite révélé par ajout d'anti-globulines d'espèces marquées à la peroxydase et un complexe substrat/révéléateur (H_2O_2 /ABTS) (figures 5).

La lecture des plaques s'est faite au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm (Photo 10-11) après deux heures d'incubation.

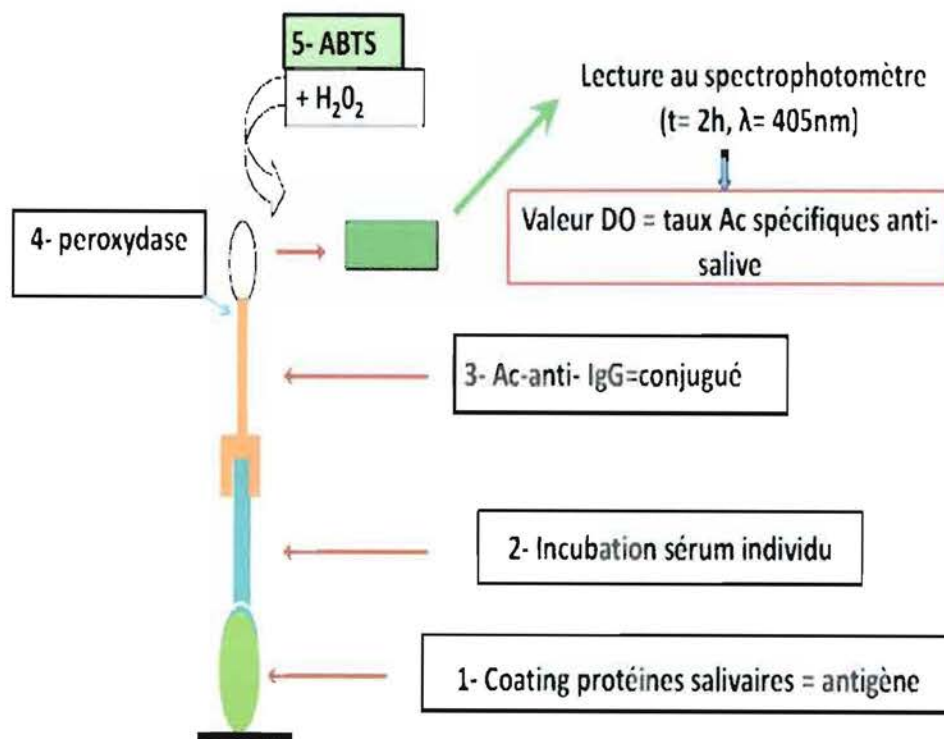


Figure 5 : Principe de l'ELISA-indirect

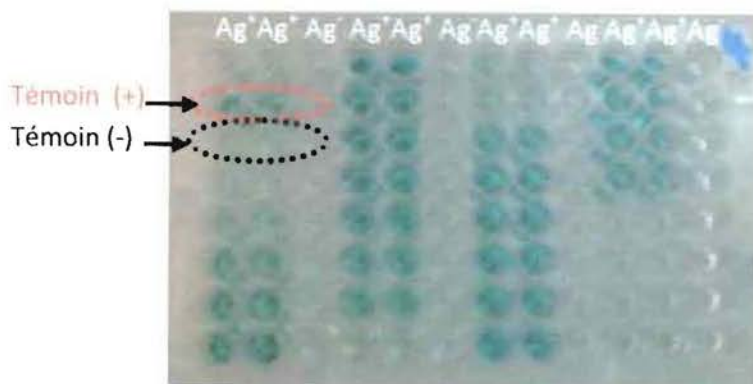


Photo N°10 : Plaque Elisa polysorp après révélation et lecture. (Photo Madingar D. P.)

Ag⁺ : puits sensibilisé avec les Ag salivaires
Ag⁻ : puits non sensibilisé



Photo N°11 : Spectrophotomètre pour lecture de densités optiques (Photo Madingar D. P.)

1.2.6. Analyses statistiques

Microsoft Excel 2007 a servi à la réalisation d'une base de données pour tous les paramètres (hématocrite, parasitémie et sérologie anti-salivaire) et au tracé des courbes de suivi. La parasitémie évaluée en nombre de parasites par champ microscopique a été convertie en variable quantitative (nombres de parasites (n) par volume (mL) de sang, nombres entiers) grâce à l'échelle de Paris et *al.* (1982) (Annexe 5). Nous avons ensuite fait une transformation logarithmique de la parasitémie en $\ln(n+1)$ pour obtenir des valeurs quantitatives moins dispersées afin de parvenir à une meilleure représentation de l'évolution du taux de parasites au cours de l'infection.

Des analyses multivariées par régression linéaire ont été également faites dans le but de dégager les facteurs potentiels pouvant expliquer:

- (i) la variabilité de la réponse anticorps IgG anti-salivaire (variable quantitative continue);
- (ii) la variabilité de l'hématocrite (variable quantitative continue)

Trois modèles par régression linéaire mixte ont été construits. Deux modèles de régression linéaire mixtes (logiciel JMP 7.0®, SAS *Institute Inc.*), dans lesquels nous avons testé l'influence de facteurs sur la réponse anti-salivaire pour le premier modèle chez les zébus Peulh et le deuxième modèle chez les baoulés: les niveaux d'exposition aux tsé-tsé et la durée de l'exposition ont été incorporés en variables fixes et le numéro de l'animal en variable aléatoire pour tenir compte des données répétées chez un même animal.

Pour des problèmes d'ajustement du modèle, l'effet groupe d'exposition qui n'a pas été significatif (ni seul, ni en interaction avec d'autres variables) n'a pas été intégré au modèle. Par ailleurs, il était difficile de construire un modèle à partir des données de la parasitémie au vu des parasitémies nulles au début de l'infection. Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

1.2.7. Limites de l'étude

Cependant, au cours de nos travaux, certains problèmes ont été rencontrés :

- l'acquisition tardive d'un financement complémentaire de la part de l'UEMOA qui a causé un décalage dans les travaux d'expérimentation et dans l'acquisition de réactifs et consommables de laboratoire;
- deux baoulés ont dû être écartés pour cause de maladie dont on ignorait l'origine (grande plaie au niveau de l'anus pour le premier et diarrhée pour le second).

Chapitre 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Résultats

2.1.1. Salivation des glossines et dosage des protéines salivaires

La salive de 1 000 glossines (500 mâles et 500 femelles), *G. m. submorsitans*, a été récoltée par notre méthode dite de salivation. La quantité totale de salive récoltée est de 15 mL soit une moyenne de 15 µL de salive par glossine.

Le tableau II montre les concentrations de la gamme de BSA et les DO de cette gamme lues au spectrophotomètre à 540 nm. A partir de ce tableau, nous avons tracé la courbe d'étalonnage des DO de la gamme de BSA en fonction de la concentration de la gamme (figure 6). Puis, nous avons calculé la concentration des protéines salivaires en utilisant le rapport $X = (DO_{\text{salive}} - b) / a$, X étant la concentration des protéines salivaires.

La quantité de matière protéique salivaire récoltée au cours de notre étude a été de 462 µg/mL x 15 mL, soit 6 930 µg, ce qui correspond à 6,93 µg par glossine

Tableau II : Gamme de BSA du kit de dosage de BCA

Concentration de gamme BSA (µg/mL)	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	0
DO moyenne	1,29	0,66	0,34	0,18	0,08	0,02	0	0

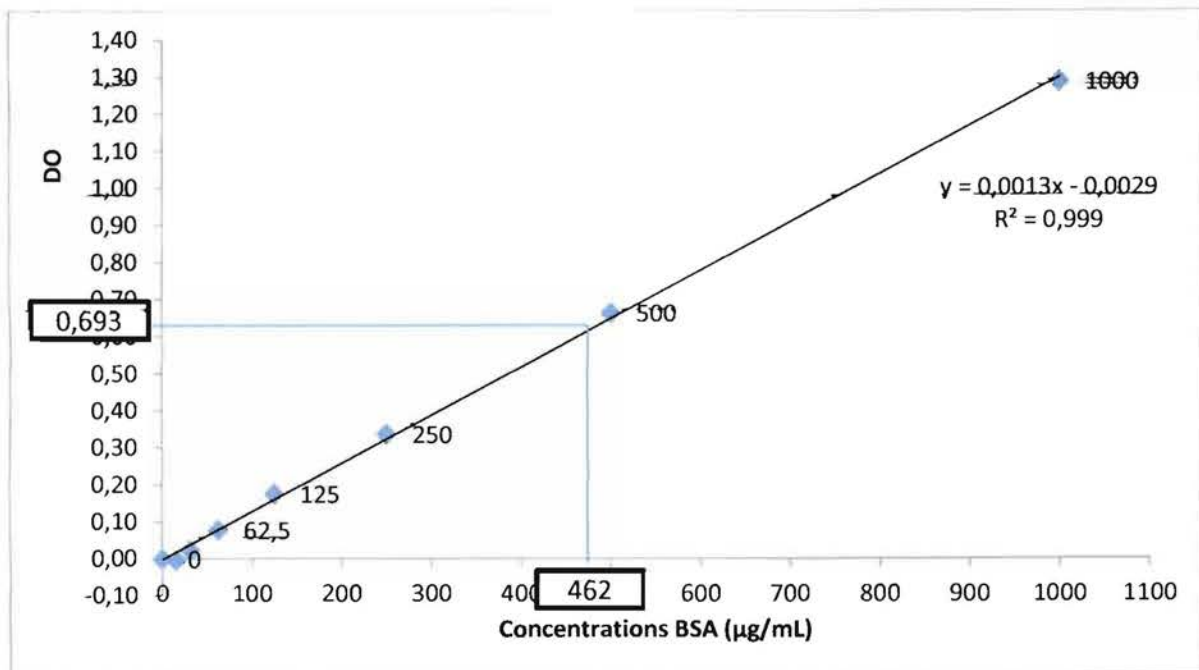


Figure 6 : Droite de régression de la gamme de BSA

Les numéros des bovins ont été incorporés en variable aléatoire dans la régression. Le modèle chez les zébus Peulh a montré que le niveau d'exposition et la durée de l'exposition aux piqûres de tsé-tsé sont significativement associés à une augmentation de la réponse anti-salivaire ($p=0,0031$ et $p<0,0001$ respectivement). Chez les baoulés, seule la durée de l'exposition aux piqûres de tsé-tsé a un effet significatif sur la réponse anti-salivaire ($p<0,0001$).

Tableau III: Influence du niveau d'exposition et de la durée de l'exposition sur la réponse anti-salivaire de *G. m. submorsitans*.

Race bovines	Variables		Moyenne des moindres	p
			carrés de la $\Delta DO \pm$ erreur standard	
Zébus Peulh	Groupe d'exposition	Contrôle (G3)	0,02±0,09	
		Faible (G1)	0,27±0,07	0,0031
		Forte (G2)	0,61±0,07	
	Durée d'exposition (semaines)		-	<0,0001
Baoulés	Groupe d'exposition	Contrôle (G3)	0,02±0,09	
		Faible (G1)	0,09±0,04	0,4162
		Forte (G2)	0,15±0,04	
	Durée d'exposition (semaines)		-	<0,0001

2.1.2.2. Niveaux de réponse anti-salivaire en fonction de la race bovine

La figure 7 montre que pour un même groupe d'exposition, les réponses anti-salivaire sont plus élevées chez les zébus Peulh par rapport aux baoulés. Une analyse stratifiée par date (du début à la fin de l'exposition) de la réponse anti-salivaire par comparaison des groupes d'exposition (faiblement et fortement exposés) au groupe contrôle (non exposé) démontre que chez les zébus Peulh, les réponses anti-salivaire étaient significativement augmentées à partir de la 4^{ème} semaine pour le groupe fortement exposé et à partir de la 6^{ème} semaine pour le groupe faiblement exposé, et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation (figure 7-A). Chez les baoulés les réponses étaient significatives uniquement à deux dates (6^{ème} et 7^{ème} semaines) dans le groupe fortement exposé (figure 7-B).

2.1.3. Evolution des paramètres du cours infectieux

2.1.3.1. Evolution de l'hématocrite

Les courbes moyennes d'évolution de l'hématocrite (figure 8) ont pratiquement la même allure chez les zébus Peulh comme chez les baoulés quelque soit le groupe (non exposé, faiblement ou fortement exposés).

Elles montrent deux phases:

- ✓ Une phase de latence de 0-6 jours chez les zébus Peulh et de 0-4 jours chez les baoulés pendant laquelle les hémocrites restent constants;
- ✓ Une phase descendante qui correspond à une baisse accélérée de l'hémocrite jusqu'à dépasser le seuil de 24% (état d'anémie de l'animal) pour la plupart des bovins.

Sachant que les valeurs normales de l'hémocrite chez les bovins sont comprises entre 24 et 46% (Belliera et Cordonner, 2010), nous remarquons sur la figure 8-A, que les courbes ne montrent visiblement aucune différence en fonction des différents groupes d'exposition chez les zébus avec le seuil de 24% (trait rouge sur les figures) qui n'est dépassé qu'en fin d'infection (J20 à J22) respectivement pour les groupes faiblement exposé, fortement exposé et groupe témoin. Par contre chez les baoulés (figure 8-B), l'évolution se fait différemment de celle de l'espèce précédente. On observe une baisse accélérée de l'hémocrite dans le groupe fortement exposé. Il atteint rapidement le seuil de 24% à partir du 10^{ème} jour. A l'inverse, il paraît plus stable dans le groupe témoin et celui faiblement exposé et reste légèrement au dessus de 24% jusqu'à la fin de l'expérience.

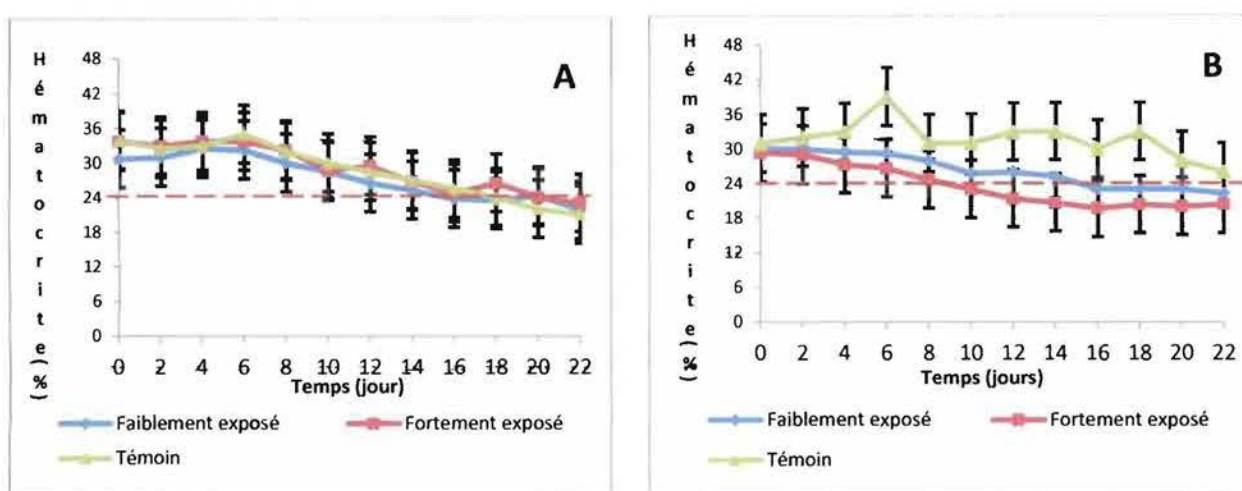


Figure 8 : Evolution de l'hématocrite chez les zébus Peulh (A) et baoulés (B)

Nous avons construit un modèle linéaire mixte par introduction des groupes d'exposition, le nombre de jours post-infection et les races bovines comme variables fixes, et en mettant un effet aléatoire sur le numéro des bovins pour comprendre l'évolution de l'hématocrite (variable quantitative). La formule utilisée a été:

$$Y_i = \sum_{k=0}^k \beta_k X_k + A_i = \beta_0 + \beta_1 R_i + \beta_2 T_i^2 + \beta_3 T_i^3 + \beta_3 R_i * T_i + A_i$$

Avec :

Y_i : hématoците moyen.

X : variables explicatives ou dépendantes, $k \in \mathbb{N}$. X peut correspondre à R_i (race, i =zébu ou baoulé) et T_i (nombre de jours post-infection, $i=0, \dots, 22$). R_0 (race baoulé) est la modalité de référence.

A_i : effet aléatoire sur le numéro de l'animal (i =zébu1,.....zébu10, pour les zébus Peulhs et i =baoulé1,.....baoulé8, pour les baoulés).

Pour chaque animal il y a 11 répétitions. $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ et β_3 sont des paramètres estimés ou coefficients associés aux variables fixes du modèle.

Les résultats du modèle (logiciel R.3.0.2.) sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV: Effets des variables sur l'hématoците

Variabiles fixes	Paramètre estimé (β)	Erreur standard (ET)	p
Intercept	29,170813	1,2673136	0,0001
Temps	0,703848	0,3278195	0,033
Race zébu Peulh	3,900962	1,6491514	0,031
Temps ²	-0,333540	0,0705672	0,0001
Temps ³	0,019087	0,0042102	0,0001
Temps*race zébus Peulh	-0,255857	0,0762562	0,001

Le modèle montre que durant l'infection, l'hématoците diminue significativement avec le temps (tableau IV) après la phase de latence. De plus, les zébus Peulh ont des hématoцитes qui baissent significativement plus vite que ceux des baoulés (effet de la variable temps), comme attendu. L'effet «intensité de l'exposition aux piqûres de tsé-tsé ou groupe d'exposition» n'a pas été significatif et a été retiré du modèle.

2.1.3.2. Evolution de la parasitémie

Les graphes de suivi de la parasitémie présente une allure similaire quelque soit le groupe d'exposition (témoin non exposé, faiblement et fortement exposés) et l'appartenance raciale du bovin (zébus Peulh, baoulés).

Ces graphes peuvent être divisés en 3 phases:

- une phase de latence ou période prépatente durant les 4 premières semaines, qui correspond au temps nécessaire pour que les parasites deviennent détectables dans le sang;
- une deuxième phase ou phase ascendante (4-10^{ème} jour) qui correspond à une croissance exponentielle des taux de parasites dans le sang.

Elle est juxtaposable à celle de la baisse de l'hématocrite (figure 8), indiquant que les trypanosomes sont responsables de l'anémie chez ces animaux infectés;

- une troisième phase où les parasitemies atteignent un plateau. Au 22ème jour post-inoculation, tous les bovins ont été traités à une dose d'acéturate de diminazène (7 mg/kg).

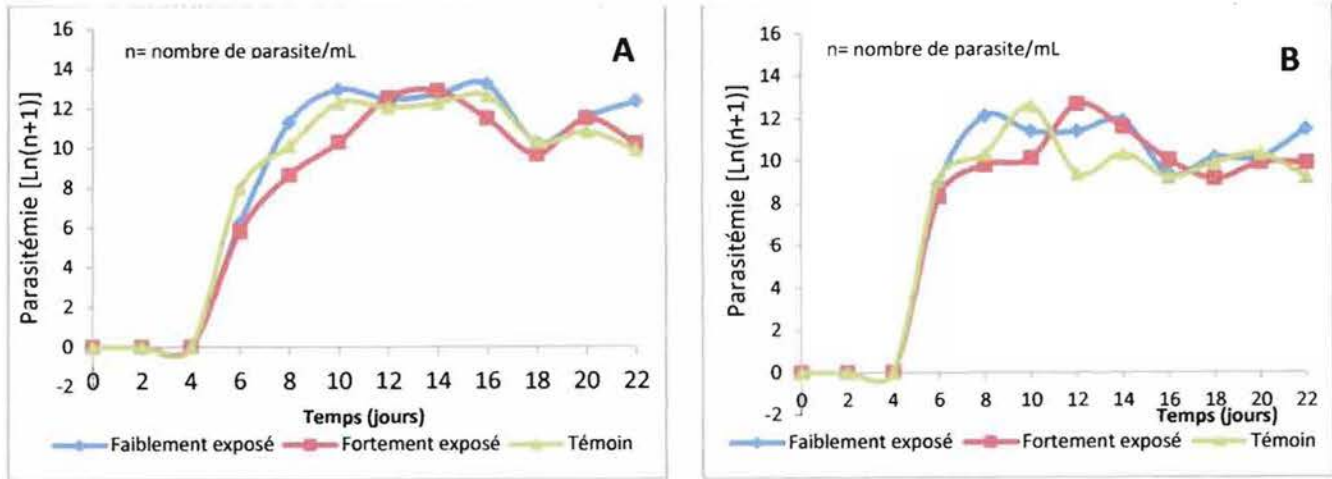


Figure 9 : Evolution de la parasitémie chez les zébus Peulh (A) et les baoulés (B)

2.2. Discussion

La technique de salivation utilisée a permis de récolter des protéines salivaires de glossine en quantité suffisante. Elle est certes très fastidieuse et longue, mais permet de travailler sur un matériel de composition proche de la salive injectée par la glossine à l'hôte lors du repas sanguin (Poinsignon *et al.*, 2007). Cette technique nous a permis de récolter une quantité moyenne de 6,93 µg de protéines salivaires par glossine. Cependant, cette dernière reste inférieure à la quantité de protéines totales contenues dans une paire de glandes salivaires de glossine qui est de 10 µg (Caljon *et al.*, 2006b). Nous avons préféré cette méthode de récolte des protéines salivaires par rapport à la dissection des glandes salivaires (qui donnent plus de protéines) utilisée dans d'autres protocoles (Van Den Abbeele *et al.*, 2010) car les protéines des glandes sont différentes des protéines de la salive. L'ajout d'une solution d'inhibiteur de protéase à la salive récoltée (1 : 25) a permis d'inhiber l'action des différentes protéases se trouvant dans la salive totale, susceptibles de la dénaturer.

Au cours de notre étude, nous avons évalué la réponse IgG contre la salive de *G. m. submorsitans* chez des bovins de différentes sensibilités à l'infection trypanosomienne (zébus Peulh, race trypanosensible et baoulés, race trypanotolérance) et exposés à différentes intensités de piqûres de tsé-tsé. L'analyse des réponses IgG anti-salive a montré une bonne cinétique d'apparition de la réponse liée aux expositions répétées de tsé-tsé. Cette réponse augmente graduellement jusqu'à atteindre un plateau, qui reste assez stable malgré les stimulations avec la salive de glossine. De plus, nos résultats montrent que la réponse anti-salive a permis de discriminer les bovins en fonction de leurs niveaux d'exposition aux piqûres de tsé-tsé. Cette valeur discriminatoire de la réponse anti-salive liée aux niveaux d'exposition a été également rapportée dans des études expérimentales antérieures menées avec d'autres arthropodes hématophages tels que les phlébotomes (Vlkova *et al.*, 2012) ou les triatomes (Schwarz *et al.*, 2009). Cependant, des différences importantes ont été observées entre les animaux du même groupe d'exposition ou entre races (zébu, baoulé) pour ce qui est des niveaux de réponse.

Ces résultats suggèrent qu'au niveau individuel, l'évaluation de la réponse anti-salive peut donc être influencée par le fond génétique du bovin ou d'autres facteurs qui pourraient affecter la réactivité des lymphocytes B vis-à-vis des antigènes salivaires. Néanmoins, au niveau populationnel, les taux d'anticorps IgG contre les antigènes

salivaires de tsé-tsé semblent constituer un indicateur du niveau moyen d'exposition du troupeau à la piqûre par les glossines. Par ailleurs, des variations de réponses anti-salivaire ($\Delta DO_t - \Delta DO_{t_0}$) plus élevées ont été observées chez les zébus Peulh par rapport aux baoulés. Ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait qu'il existe un effet mémoire chez ces baoulés indépendamment du degré d'exposition vu qu'ils proviennent des zones infestées de glossines (Gaoua, Sud-Ouest du Burkina Faso) par rapport aux zébus Peulh provenant du Nord du Burkina Faso (zone indemne de glossine) qui découvrent l'exposition aux glossines.

Les résultats de l'exposition expérimentale montrent clairement que la réponse anti-salivaire peut être utilisée comme outil pour évaluer (i) les niveaux d'exposition des troupeaux aux piqûres de tsé-tsé et (ii) l'impact des interventions anti-vectorielles sur les contacts bovins/tsé-tsé. Dans ce cadre l'outil anti-salivaire pourrait être utilisé comme une méthode complémentaire ou alternative aux méthodes d'évaluation entomologique de référence (piégeage).

Des souris pré-exposées aux piqûres de phlébotomes non infectés, ont été protégées contre une infection ultérieure à *Leishmania major*, justifiant ainsi la potentielle utilisation de ces antigènes salivaires comme candidats vaccinaux (Kamhawi, 2000). Ces acquis dans la leishmaniose nous ont donc inspiré à tester le rôle protecteur de la réponse anti-salivaire contre une infection à *T. congolense*. Ainsi, des bovins de différentes sensibilités à l'infection trypanosomienne antérieurement sensibilisés à la salive de tsé-tsé, ont été sujets à une épreuve de challenge à *T. congolense*. Pendant l'infection qui a duré trois semaines, nous avons étudié l'évolution de deux paramètres du cours infectieux: la parasitémie et l'hématocrite.

Si l'on considère le paramètre « hématocrite », contrairement à la salive de phlébotomes, les expositions antérieures aux piqûres de tsé-tsé semblent plutôt exacerber l'infection chez les baoulés et zébus Peulh en général. Le caractère intracellulaire des leishmanies par rapport aux trypanosomes qui sont extracellulaires pourrait expliquer en partie ces différences. Des résultats similaires aux nôtres ont été trouvés chez des souris pré-exposées aux glossines et infectées par la suite à *T. b. brucei* (Caljon *et al.*, 2006b). Les données de la parasitémie n'ont pas permis de différencier les bovins en fonction des niveaux d'exposition aux tsé-tsé et de la race bovine.

Enfin, notre protocole expérimental utilisant l'infection artificielle des trypanosomes suite à la sensibilisation des bovins avec les antigènes salivaires totaux de glossines ne montre aucune protection. Il pourrait par conséquent être amélioré en utilisant

des antigènes spécifiques comme potentielles cibles vaccinales en lieu et place de la salive totale qui peut être un cocktail de protéines à différents effets immunomodulateurs.

Nous n'avons donc pas observé d'effet d'immunisation par la salive sur l'établissement de l'infection, mais il faut noter que le faible nombre d'individus par groupe a rendu le pouvoir statistique des tests très faible.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude s'insérant dans la deuxième phase du projet anti-salivaire de tsé-tsé avait pour objectifs d'analyser la réponse anti-salivaire en fonction des intensités de piqûres et d'étudier les effets immunomodulateurs de la salive de cette mouche. Nos premiers résultats ont montré que l'évaluation de la réponse anticorps IgG dirigée contre les antigènes salivaires totaux de *G. m. submorsitans* permettait de discriminer les bovins (zébus Peulh, baoulés) en fonction de leurs niveaux d'exposition aux tsé-tsé et de la race bovine. De manière intéressante, le caractère discriminatoire de la réponse anti-salivaire est en faveur de son utilisation comme méthode alternative ou complémentaire aux méthodes d'évaluation entomologique pour (i) une lutte anti-vectorielle dans les zones de forts contacts bovins/tsé-tsé et (ii) une meilleure analyse de l'efficacité des campagnes de lutte anti-vectorielle.

Dans de nombreuses régions, du fait que l'élevage soit de type pastoral, et est associé à une grande mobilité des troupeaux en fonction des conditions climatiques (recherche de pâturages et de points d'eau), les densités apparentes de tsé-tsé mesurées par les pièges à des endroits fixes sont donc dans de nombreux cas peu représentatif de l'exposition réelle du bétail aux glossines. De ce fait, ce biomarqueur d'exposition présente beaucoup d'avantages par rapport aux méthodes entomologiques de référence (piégeages) car il évalue de manière directe le contact bovin/tsé-tsé qui semble bien corrélé avec le risque réel d'infection aux trypanosomes. Ce biomarqueur pourrait être mis à la disposition de la PATTEC (*Pan African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign*) et des autres programmes de lutte à travers le continent africain comme outil de décision.

Par ailleurs, la deuxième étape de notre étude a permis de développer une approche vaccinale anti-transmission basée sur une épreuve de challenge à *T. congolense* chez les bovins (baoulés et zébus Peulhs) pré-immunisés par la salive de *G. m. submorsitans*. Comme chez les souris pré-exposées aux piqûres de tsé-tsé, l'infection par la seringue des trypanosomes aux bovins pré-exposés aux piqûres de glossines, semble provoquer une exacerbation de l'anémie. Ces essais vaccinaux méritent d'être poursuivis par l'étude de certains antigènes salivaires spécifiques comme dans le modèle phlébotome, afin d'identifier de protéines salivaires comme potentielles candidats vaccins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Affognon H., Grace D., Dao D., Diall O., Randolph T. et Waibel H. (2005).** Contrôle de la trypanosomose animale dans la zone cotonnière de l'Afrique de l'Ouest: connaissance, attitude et pratiques (CAP) des éleveurs. In : 28^{ème} réunion du conseil scientifique international pour la recherche et la lutte contre les trypanosomes (CSIRLT). Addis-Abeba (Ethiopie), 252-253.
- Andersen J. F., Hinnebusch B. J., Lucas D. A., Conrads T. P., Veenstra T. D., Pham V. M. et Ribeiro J. M. (2007).** An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis* (Rat). *BMC Genomics*, 8, 102.
- Authié E. et Pobel T. (1990).** Serum haemolytic and C3 levels in bovine trypanosomiasis under natural conditions of challenge-early indication of individual susceptibility to disease. *Vet Parasitol.* 35, 43-59.
- 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, Elsevier, Paris* 10(1): 27-50.
- Authié E. (2003).** Trypanosomoses: physiopathologie et immunologie. In : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Tome 2 : Maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires. *Ed TEC & DOC.* Lavoisier. 1725-1737.
- Belemsaga D. M. A. (2001).** La trypanotolérance. In: Diagnostic et contrôle des hémoparasitoses animales et leurs vecteurs. Cours international de formation. CIRDES. Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). 113-121.
- Belliera S. et Cordonnier N., (2010).** Normes biologiques en médecine vétérinaire: les valeurs usuelles en hématologie vétérinaire. *Revue francophone des laboratoires* N°420, 16p.
- Bengaly Z. (2003).** Pathogénicité compare de trois types phylogéniques distincts de l'espèce *Trypanosoma congolense*. Thèse de doctorat es sciences. Université de Ouagadougou. UFR/SVT. 116p.
- Bishop S. C. et Mackenzie K. M., (2003).** Genetic management strategies for controlling infectious disease in livestock population. *Genet. Sel. Evol.* 35 (Suppl 1.): S3-S17.
- Bouyer J. (2006).** Ecologie des glossines du Mouhoun au Burkina Faso: intérêt pour l'épidémiologie et le contrôle des trypanosomoses africaines. Thèse de doctorat en entomologie médicale. Ecole doctorale de sciences chimiques et biologiques pour la santé. Faculté de science et techniques du Languedoc, Université de Montpellier II. 204p.
- Bouyer J. (2009).** Les tsé-tsé, mouches intelligentes ? 2^{ème} partie: La dispersion des glossines. *Insectes.* 153, 21-24.

Bouyer J., Solano P., Cuisance D., Itard J., Frézil J. L., Authié E. (2010). Control methods in Trypanosomosis. In: Lefèvre P.-C., Blancou J., Chermette J., Uilenberg G. (Eds). Infectious and parasitic diseases of livestock. Volume 2. Lavoisier, Paris. 1936-1943.

Bowman A. S., Dillwith J. W. et Sauer J. R. (1996). Tick salivary prostaglandins: Presence, origine and significance. *Parasitol Today*, 12 (10): 388-96.

Brunelleschi S, Ceni E., Giotti A. et Fantozzi R. (1990). Tachykinins stimulate lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase activity in neutrophils. *Eur J Pharmacol*, 186, 367-8.

Brunhes J., Cuisance D., Geoffroy B. (2006). Les glossines ou mouches tsé-tsé. Cédérom IRD.

Caljon G., Van Den Abbeele J., Sternberg J. M., Coosemans M., De Baetselier P. et Magèz S. (2006a). Tsetse fly saliva biases the immune response to Th2 and induces anti-vector antibodies that are a useful tool for exposure assessment. *International journal of parasitology*, 36(9): 1025-1035.

Caljon G., Van Den Abbeele J., Stijlemans B., Coosemans M., De Baetselier P. et Magez S. (2006b). Tsetse fly saliva accelerates the onset of *Trypanosoma brucei* infection in a mouse model associated with a reduced host inflammatory response. *Infection immunity*, 74(11): 6324-6330.

Cappello M., Bergum P. W., Vlasuk G. P., Furnidge B. A., Pritchard D. I. et Aksoy S. (1996). Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. *Am J Trop Med Hyg*, 54, 475-80.

Cappello M., Li S., Chen X., Li C. B, Harrison L. (1998). Tsetse thrombin inhibitor: bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(24): 14290-14295.

Cattand P. (2001). Epidémiologie de la trypanosomose humaine Africaine: une histoire multifactorielle complexe. *Médecine tropicale*; N°61: 313-322.

Charlab R., Valenzuela J. G., Rowton E. D. et Ribeiro J. M. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 15155-60.

Chartier C., Itard J. et Morel P.C. (2000). Précis de parasitologie vétérinaire tropicale, France, Maison Alfort, 305 p.

Clausen P.H., Sidibe I., Richard X., Bauer B. et Pohilt H. (1990). Susceptibility to African trypanosomiasis of West African Shorthorn (Baoule) and zebu cattle in Burkina Faso: a comparative study In: Livestock Production and Diseases in the

Tropics. Actes de la 6^è conférence internationale des institutes de médecine vétérinaire tropicale, Septembre 1989, Wageningen, Pays-Bas.

Clausen P. H., Sidibé I., Bassinga A., Richard X., Bauer B. et Pohilt H. (1993). Pathogenesis and pathology of African trypanomosis in Baoulé, N'Dama/Baoulé, cross bred and zebu cattle in Burkina Faso: Clinical performance under high natural tsetse challenge. *Tropical medicine parasitology*. 44 : 99-107.

Cook S. P. et McCleskey E. W. (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain*, 95, 41-7.

Coulomb J., Gruvel J., Morel P. C. (1977). La trypanotolérance: synthèse des connaissances actuelles. ISBN 2-85985-003-1, IEMVT, Maisons-Alfort, France. 277p.

Dama E., Cornélie S., Somda M. B., Camara M., Kambire R., Courtin F., Jamonneau V., Demette E., Seveno M., Bengaly Z., Solano P., Poinsignon A., Remoue F., Belem A. M. G., Bucheton B. (2013). Identification of *Glossina palpalis gambiensis* specific salivary antigens: towards the development of a serological biomarker of human exposure to tsetse flies in West Africa. *Microbes and Infection*, 15, 416-427.

De La Rocque S. et Cuisance D. (2005). La Tsé-tsé..., une mouche singulière et dangereuse ! *Insectes N°136* : 27-31.

Demeure C. E., Brahim K., Hacini F., Marchand F., Peronet R., Huerre M., St-Mezard P., Nicolas J. F., Brey P., Delespesse G. et Mecheri S. (2005). Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J Immunol*, 174, 3932-40.

Desquesnes M. (1997). Les trypanosomoses du bétail en Amérique latine, étude spéciale dans le plateau des Guyanes. In: Lekeux M. (2006). La trypanosomose bovine africaine: Généralités et situation au Bénin. Thèse de doctorat médecine vétérinaire N°72. Ecole nationale vétérinaire de Lyon, Université Claude-Bernard-Lyon I, 94 p.

Dia M. L. et Desquesnes M. (2003). Trypanosomose animale africaine : utilisation rationnelle des trypanocides. In : *Santé animales en Afrique de l'Ouest*. Fiche technique N°3, 8p.

Donovan M. J., Messmore A. S., Scrafford D. A., Sacks D. L., Kamhawi S. et McDowell M. A. (2007) Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infect Immun*. 75, 2523-30.

Douthwaite R. J., (1992). Non target effects of insecticides used in tsetse control operations. *Rev. mond. Zotech*. 8-14.

Doutressoule D. (1947). L'élevage en Afrique Occidentale Française. Larousse, Paris.

- Drame P. M., Poinsignon A., Besnard P., Le Mire J., Dos-Santos M. A., Sow C. S., Cornelie S., Foumane V., Toto J. -C., Sembene M., Boulanger D., Simondon F., Fortes F., Carnevale P., Remoue F. (2010).** Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva : an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide treated nets in malaria vector control. *Am J Trop Med Hyg.* 83:115-121.
- Edelman R., Tacket C. O., Wasserman S. S., Bodison S. A., Perry J. G. et Mangiafico J. A. (2000).** Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg.* 62, 681-5.
- Eglezos A., Andrews P. V., Boyd R. L. et Helme R. D. (1991).** Modulation of the immune response by tachykinins. *Immunol Cell Biol*, 69 (Pt 4), 285-94.
- Ellis J.A., Shapiro S. Z., Ole Moi-Yoi O. et Moloo S. K. (1986).** Lesions and saliva-specific antibody responses in rabbits with immediate and delayed hypersensitivity reactions to the bites of *Glossina morsitans centralis*. In : *Vet Pathol*, (23), 661-667.
- Fontaine A., Diouf I., Bakkali N., Misse D., Pages F., Fusai T., Rogier C., Almeras L., (2011).** Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit Vectors* 4, 187.
- Francischetti I. M., Valenzuela J. G. et Ribeiro J. M. (1999).** Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*, 38, 16678-85.
- Gillespie R. D., Mbow M. L., Titus R. G. (2000).** The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol*, 22, 319-31.
- Guidudu A.M., Cuisance D., Reifenberg J.M., Frezil, J.L. (1995).** Improving the salivation technic in the tsetse fly for the detection of infective metatrypanosomes: study of the effect of biologic and non-biologic factors in the probing behavior of the tsetse fly. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 48, 153-160.
- Hanotte O., Tawah C. L., Bradley D. G., Okomo M., Verjee Y., Ochieng J. et Rege J. E. O. (2000).** Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos Taurus* and indicine *Bos indicus* Y, specific allele among sub-saharan African cattle breeds. *Molecular Ecology.* 9, 387-396.
- Hanotte O., Bradley D. G., Ochieng J. W., Verjee Y., Hill E. W. et Rege J. E. O. (2002).** African pastoralism: genetic imprints of origins and migration. *Science*, 296, 336-339.
- Hill E. W., O'Gorman G. M., Agaba M., Gibson J.-P., Hanotte O., Kemp S. J., Nsessens J., Coussens P. M. et MacHugh D. E. (2005).** Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet Immunol Immunopathol.* 105. 247-258.
- Holmes P., (2013).** Tsetse transmitted trypanosomes: Their biology, disease impact and control. *Journal of Invertebrate pathology.* Elsevier 112, s 11-14.

- Isawa H., Yuda M. Orito Y. et Chinzei Y. (2002).** A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. *J Biol Chem*, 277, 27651-8.
- Itard J., (2000).** Trypanosomose animale africaine. In: Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Chartier C., Itard J., Morel P. C., Troncy P. M. Paris (France). *Edition Tec & Doc. Lavoisier*. 206-450p.
- Itard J. et Frézil J-L. (2003).** Trypanosomoses: symptômes et lésions. In: Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Tome 2 : Maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires. *Edition Tec & Doc. Lavoisier*. 1657-1667.
- Itard J., Cuisance D. et Tacher G. (2003).** Trypanosomoses: historique-répartition géographique. In: Principales maladies infectieuses et parasitaire du bétail. Europe et région chaudes. Volume 2: Maladie bactériennes, mycoses, maladies parasitaires. Edited by Lefèvre P.-C., Blancou J., Chermette R. Paris. *Lavoisier*. 1607-1625.
- Jahnke H. E. (1984).** Systèmes de production animale et développement de l'élevage en Afrique tropicale, CIPEA, Addis-Abeba, Ethiopie.
- Kamhawi S. (2000).** The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections. *Microbes Infect*, 2, 1765-73.
- Kristjanson P.M., Swallow B.M., Rawlands G.J., Kruska R.L., Leeuw P.N., (1999).** Measuring the cost of African Animal Trypanosomiasis, the potential benefits of control and returns to research *Agr syst* 59, 79-98.
- Lane R. S., Moss R. B., Hsu Y. P., Wei T., Mesirov M. L., Kuo M. M. (1999).** Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. *Am J Trop Med Hyg*. 61, 850-859.
- Leveissere C. et Penchenier L. (2005).** Manuel de lutte contre la maladie du sommeil. IRD éditions, Paris., 369 p.
- Lhoste P. (1980).** Evaluation de la trypanotolérance. Communication orale. Séminaire sur l'élevage et la sélection de bétail trypanotolérance. 15p.
- Li S. et Askoy S. (2000).** A family of genes with growth factor and adenosine deaminase similarity and preferentially expressed in the salivary glands of *Glossina morsitans morsitans*. *Gene*. 252 (1-2): 83-93.
- MacLennan K. J. R., (1981).** Tsetse-transmitted trypanosomiasis. In relation to the rural economy in Africa: Part 2. Technics in use for control or eradication of tsetse infestations. *World Animal Review*. 37, 9-19.
- Mant, M. J. et Parker K. R. (1981).** Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in-vitro platelet aggregation. *Br J Haematol*, 48(4): 601-608.

- Millan M. J. (1999).** The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57, 1-164
- Murray, M., Murray, P.K., McIntyre, W.I. (1977).** An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71, 325-326.
- Murray P. K., Murray M., Vallace M., Morrisson W. I. et McIntire W. I. M. (1979).** Trypanosomiasis in Ndama and zebu cattle. An experimental investigation of susceptibility to *Trypanoma brucei*, *T. congolense* and mixed infection. ISCTRC, proceedings of the 15th meeting. Banjul, the Gambia.
- Murray M., Morrison W. I. et Whitelaw D. D., (1982).** Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Advance in parasitology*. 21, 1-68.
- Murray M., Dexter T. M. (1988).** Anemia of bovine african trypanosomiasis. *Acta tropica*, 45: 389-432.
- Nascimento R. J., Santana J. M., Lozzi S. P., Araujo C. N. et Teixeira A. R. (2001).** Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg.* (65), 219-226.
- Nuttall P.A., Paesen G. C., Lawrie C. H., Wang H. (2000).** Vector-host interactions in disease transmission. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2 (4): 381-6.
- Ødegaard, F. (2000).** How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, 583-597.
- Ouédraogo S. (1999).** Contribution à l'étude de l'efficacité et de la rémanence du triflumuron en pulvérisation sur tissu pour l'amélioration des techniques de lutte non polluantes contre les glossines ou mouches Tsé-tsé. Mémoire d'ingénieur du développement rural. Université polytechnique de Bobo-Dioulasso. 65 p.
- Paesen G. C., Adams P. L., Harlos K., Nuttall P. A. et Stuart D. I. (1999).** Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. *Mol Cell*, 3, 661-71.
- Pangui L. J. (2001).** La trypanosomose: une contrainte majeure de l'élevage en Afrique subsaharienne. Utilisation de trypanocides en Afrique subsaharienne. 29-33.
- Paris J.; Murray M. et Odimba F. (1982).** A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Tropica*, 39(4):307-316.
- Poinsignon A. (2005).** Diversité et fonctions des protéines salivaires chez les arthropodes vecteurs: Etude de la relation immunitaire homme/vecteur au cours de la Trypanosomose Humaine Africaine. Thèse pharmacie n° 58/2004. Unité de formation et de recherche, faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry, Université de Paris XI. 54 p.

Poinsignon A., Cornelie S., Remoue F., Grégaut P., Courtin D., Garcia A. et Simondin F. (2007). Human/vector relationship during human african trypanosomiasis: initial screening of immunogenic salivary proteins of *Glossina* species. *American journal of tropical medicine of hygiene*, 76(2): 327-333.

Poinsignon A., Remoue F., Rossignol M., Cornelie S., Courtin D., Grégaut P., Garcia A. et Simondin F. (2008). Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: An epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78 (5), 750-753.

Remoue F., Cissé B., Ba F., Sokhna C., Herve J. P., Boulanger D., Simondin F. (2006). Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100, 363-370.

Ribeiro J. M. (1987). Rôle of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol.* 32: 463-78.

Ribeiro J. M. (1989). Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp Parasitol.* 69, (1): 104-6.

Ribeiro J. M., Endris T. M. et Endris R. (1991). Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 100, 109-12.

Ribeiro J. M., Evans P. M., MacSwain J. L. et Sauer J. (1992). *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Exp Parasitol*, 74, 112-6.

Ribeiro J. M. et Nussenzveig R. H. (1993). The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. *J Exp Biol*, 179, 273-87.

Ribeiro J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious agent's discovery.* 4 (3); 143-152.

Ribeiro J. M., Katz O., Pannell L. K., Waitumbi J et Warburg A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol*, 202, 1551-9.

Ribeiro J. M. et Francischetti I. M. (2003). Role of arthropode saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol.* 48: 73-88.

Roelant G. (1986). Natural resistance to african trypanosomiasis. *Parasite immunology* (8): 1-10.

Roelants G. E., Fumoux F., Pinder M., Queval R., Bassinga A. et Authie E. (1987). Identification and selection of cattle naturally resistant to african trypanosomiasis. *Acta tropica*, 44: 55-66.

- Schneider B. S., Soong L., Zeidner N. S. et Higgs S. (2004).** *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and Th1/Th2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunol*, 17, 565-73.
- Schwarz A., Helling S., Collin N., Teixeira C. R., Medrano-Mercado N., Hume J. C., Assumpcao T. C., Marcus K.; Stephan C.; Meyer H. E., Ribeiro J. M., Billingsley P. F., Valenzuela J. G., Sternberg J. M. et Schaub G. A. (2009).** Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans* : development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e532.
- Schwarz A., Sternberg J.M., Johnston V., Medrano-Mercado N., Anderson J.M., Hume J.C., Valenzuela J.G., Schaub G.A., Billingsley P.F., (2009).** Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 39, 1021-1029.
- Shattil S. J., Ginsberg M. H. et Brugge J. S. (1994).** Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol*, 6(5): 695-704.
- Sidibé I. (1996).** Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense*, agent de la trypanosomose animale : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse de doctorat es sciences. Faculté de sciences et techniques du Languedoc, Université de Montpellier II. 92p.
- Somda M. B., Bengaly Z., Dama E., Poinsignon A., Dayo G. K., Sidibe I., Remoue F., Sanon A., Bucheton B. (2013).** First insights into the cattle serological response to tsetse salivary antigens: A promising direct biomarker of exposure to tsetse bites. *Veterinary Parasitology*, 197, 332-340.
- Souza A.P., Andrade B. B., Aquino D., Entringer P., Miranda J. C., Alcantara R., Ruiz D., Soto M., Teixeira C. R., Valenzuela J. G., De Oliveira C. I., Brodskyn C. I., Barral-Netto M. et Barral A. (2010).** Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e649.
- Taylor K. A. (1998).** Immune responses of cattle to African trypanosomosis. Protective or pathogenic? *International Journal for Parasitology*. 28: 219-240.
- Teixeira C., Gomes R., Collin N., Reynoso D., Jochim R., Oliveira F., Seitz A., Elnaiem D. E., Caldas A., De Souza A. P., Brodskyn C. I., de Oliveira C. I., Mendonca I., Costa C. H., Volf P. et Barrak A. (2010).** Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e 638.
- Tetty J. (2008)** Trypanocides vétérinaires: la recherche d'une similarité essentielle. In: Dargie J. (2008). Bulletin d'information sur les glossines et les trypanosomoses N° 14341-14538. Programme de lutte contre la trypanosomose africaine. Vol 31, partie 1, 170p

- Touré S. M. (1973).** Les trypanocides et leur utilisation en médecine vétérinaire. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 26 (4) : 113-122.
- Trial J. C. M., Wissocq N. et D'leteren G. D. M., (1991).** Field research on measurement and use trypanotolerance criteria to enhance trypanotolerant livestock productivity. Recent results quantifying trypanotolerance indicators. In: Towards increased use of trypanotolerance: current research and future directive. IRLAD/NAIROBI/KENYA. 2, p29-32.
- Valenzuela J. G., Charlab R., Galperin M. Y. et Ribeiro J. M. (1998).** Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *J Biol Chem*, 273, 30583-90.
- Valenzuela J. G., Francischetti I. M. et Ribeiro J. M. (1999).** Purification, cloning and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry*; 38 (34): 11209-15.
- Valenzuela J. G., Belkaid Y., Rowton E. et Ribeiro J. M. (2001).** The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol*, 204, 229-37.
- Valenzuela J. G., Pham V. M., Garfield M. K., Francischetti I. M. et Ribeiro J. M. (2002).** Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 32, 1101-22.
- Van Den Abbeele J., Caljon G., De Ridder K., De Baetselier P., Coosemans M., (2010).** *Trypanosoma brucei* modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission. *PLoS Pathog* 6, e1000926.
- Vickerman K., (1985).** Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Brit. Med. Bull.* 41, 105-114.
- Vikova M., Rohousova I., Hostomska J., Pohankova L., Zidkova L., Drahota J., Valenzuela J. G., Volf P. (2012).** Kinetics of Antibody response in Balb/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Neg Trop Dis* (6) 7: e1719. Doi:10.1371/journal.pntd.0001719.
- Vreysen M. J. B., Saleh K. M., Zhu Z. R. et Suleiman F. W. (2000).** Responses of *Glossina austeni* sticky panels and odours. *Med Vet Entomol.* 14 (3): 283-9.
- Vreysen M. J. B., Seck M. T., Sall B., Bouyer J., (2013).** Tsetse flies: Their biology and control using area-wide integrated pest management approaches. *J Invertebr Pathol* 112, S15-S25.
- Wikel S. K. (1981).** The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. *Am J Trop Med Hyg*, 30, 284-8.
- Zeidner N. S., Higgs S., Happ C. M., Beaty B. J. et Miller B. R. (1999).** Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunol.* 21, 35-44.

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

Aubry P. (2010). Médecine tropicale. <http://medecinetroropicale.free.fr>, (consulté le 06/03/2012).

Duvallet G. (2006). Maladie du sommeil : terrible fléau pour l'Afrique. http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/maladie-du-sommeil-terrible-fleau-pour-lafrique_664/c3/221/p4/ (**consulté le 22/03/2011**).

Magniez F. (2008). La technique ELISA. <http://biotechnologie.over-blog.com/article-18589062.html> (consulté le 08/04/2012).

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de salivation

- Les glossines sont privées de nourriture 2 à 3 jours précédents la salivation afin de stimuler leur appétit (les glossines auront les glandes salivaires gorgées de salive).
- Les glossines sont réparties par groupes de 4 à 6 dans des tubes Falcon de 50 mL recouverts de papier aluminium et fermés par de la moustiquaire (attention qu'elle soit bien propre).
- Une lame à microscopie où sont déposées quelques dizaines de microlitres du tampon de salivation (Hepes-EDTA-NaCl) est disposée sur une plaque chauffante à 37°C.
- Le tube contenant les glossines est posé sur la lame, permettant aux glossines de saliver. Environ 5 min de salivation (observer les glossines enfoncer leur proboscis dans le tampon de salivation) puis repos avant une nouvelle séance de salivation.
- Le mélange tampon/salive recueilli et regroupé par espèce dans des tubes qui sont conservés à -20°C ou à -80°C jusqu'à utilisation (ajouter 40 µL d'inhibiteur de protéase pour 1 mL de salive).

Tampon de salivation (pH 7,2)

	1 L	250 mL
Hepes 10 mM	2,38 g	0,6 g
NaCl 150 mM	8,76 g	2,2 g
EDTA 5 mM	1,86 g	0,46 g

Inhibiteur de protéase (Complete protease inhibitor cocktail tablets « Roche »)

Dissoudre 1 pastille dans 2mL de tampon de salivation (25 X solution)

Stockage : 1-2 semaine à 4°C

12 semaines à 20°C

Annexe 2 : Protocole dosage de protéines salivaires

La technique colorimétrique quantitative basée sur le test de l'acide bicinchoninique (BCA) est utilisée pour déterminer la concentration en protéines salivaires du mélange tampon/salivaire de glossine. Ce test est basé sur la réaction de biuret des protéines.

Le protocole est le suivant :

- Constituer une gamme de concentration décroissante de BSA (Bovine serum albumin) par une dilution en cascade à partir de la solution la plus concentrée.
- Mettre en duplicate 25 µL de chaque dilution de BSA de la gamme dans des puits d'une plaque en polystyrène (plaque ELISA). Aussi, déposer en duplicate 25 µL de l'échantillon salivaire à doser (tampon/salivaire)
- Ensuite, ajouter 200 µL de water reagent ou WR (préparé dans le rapport 25 BSA réactif A, 25 BCA réactif B pour 1 BCA réactif C) dans chaque puits.
- Après une incubation de la plaque pendant 30 min à température ambiante, on fait sa lecture au spectrophotomètre à 540 nm.

Le tout se faisant suivant le plan de plaque ci-après :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DIL1	DIL2	DIL3	DIL4	DIL5	DIL6	DIL7	TAMPON SALIVATION				
B												
C	ECH	ECH										
D												
E												
F												
G												
H												

DIL : dilution

ECH : échantillon salivaire (tampon/salivaire)

DIL1: 1000 µg/mL

DIL2: 500 µg/mL

DIL3: 250 µg/mL

DIL4: 125 µg/mL

DIL 5: 62, 5 µg/mL

DIL 6: 31, 25 µg/mL

DIL 7: 15,63 µg/mL

Tampon salivaire: 0 µg/mL

Annexe 3 : Fiche de recueil de données pendant l'exposition expérimentale

Groupe N° :

Bovin N° :

Type de vecteur utilisé pour l'exposition :

Durée de l'exposition :

Dates d'exposition :

Appréciation du repas sanguin

Semaine N°

Date 1 + ++ +++

Date 2... + ++ +++

Dates de prélèvements :

Date 1

Remarque :

Date 2

Remarque :

Suivi vétérinaire (problèmes constatés) :

.....
.....
.....
.....

Annexe 4 : Fiche de suivi de paramètres du cours infectieux

Groupe N° :

Bovin N° :

Type de parasite utilisé pour l'épreuve de challenge : *T. congolense*,
souche cryostabilisée Ser .71.

Dates de suivi de l'hématocrite et de la parasitémie

Paramètres	Date 1	Date 2	Date 3	Date 4	Date 5	Date 6	Date 7	Date 8	Date 9	Date 10	Date 11	Date 12
Hématocrite												
Parasitémie												

Suivi vétérinaire (problèmes constatés) :

.....

.....

.....

.....

Annexe 5 : Estimation de la parasitémie

Le nombre des trypanosomes par mL dans le sang examiné a été évalué selon la méthode de PARIS *et al.*, (1982)

Nombre de parasites par préparation ou par champs microscopique	Nombre de parasites par mL de sang
2 sur 40	2 000
4 sur 40	40 000
12 sur 40	120 000
1 par champ	10 000
2 par champ	20 000
5 par champ	50 000
6 par champ	60 000
8 par champ	80 000
10 par champ	500 000
15 par champ	750 000
20 par champ	1 000 000
30 par champ	1 500 000
50 par champ	2 500 000
60 par champ	3 000 000
80 par champ	4 000 000
100 par champ	5 000 000

Annexe 6 : Protocole ELISA-indirect

1. Coating ou sensibilisation des plaques en polystyrène

- Sortir un aliquot de salive du congélateur, le décongeler et le porter au vortex
- Diluer la salive avec du tampon carbonate/bicarbonate (0,1 M à pH 9,6) pour obtenir une concentration finale de 2 µg/mL
- Sensibiliser les plaques en polystyrène avec le mélange salive-tampon carbonate-bicarbonate
- Pour chaque échantillon à passer, prévoir 1 duplicate (Ag+), 1 puits avec seulement du tampon de coating (100 µL/puits sans antigène : Ag-)
- Prévoir également 3 puits pour le blanc, rien que les réactifs dans ces puits
- Incubation des plaques durant 2h30 à 37°C ou toute la nuit à 4°C
- Après le coating, vider, sceller et garder les plaques à -20°C si le test est programmé pour plus tard

2. 3 lavages en eau-tween 0,1%

3. Saturation avec Blocking buffer (soit TBS ou 0,2 g de caséine + 0,1% Tween + 100 mL PBS) :

- Mettre 300 µL/puits
- Incuber les plaques pendant 1h à 37°C

4. 3 lavages en eau-tween 0,1%

5. Incubation des sérums (dilution à faire dans les 1h de la phase de blocking ou avant de sortir les plaques sensibilisées du congélateur)

Dilution des sérums au 1/200^{ème} dans PBS-Tween 1% :

- Mettre 30 µL de sérum à tester dans des puits de plaques à fond ronds (plaque qui ne fixent pas les protéines ou plaques de dilution)
- Faire une 1^{ère} dilution au 1/10^{ème} dans des plaques à fond ronds : 10 µL de sérum pour 90 µL de PBS-Tween 1% par puits (agiter la plaque de dilution pour faciliter le mélange)
- Faire une 2^{ème} dilution au 1/20^{ème} dans les plaques à fonds plats (plaques ELISA ou plaques en polystyrène) : 5 µL de la 1^{ère} dilution au 1/10^{ème} pour 95 µL de PBS-Tween 1% par puits
- Mettre un pool négatif (duplicate) et 1 pool positif (duplicate)
- Incubation des plaques pendant 2 h sous agitation à 37°C

6. 3 lavages en eau-Tween 0,1%

7. Dépôt de l'Anticorps anti-IgG bovin HRP ou conjugué

- Dilution du conjugué au 1/4000 en tampon PBS-Tween 1%
 - Dépôt de 100 µL/puits
 - Incubation des plaques pendant 1h30 sous agitation à 37°C
8. **6 lavages en eau-Tween 0,1%**
9. **Révélation : ABTS + peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée ou H₂O₂)**
Pour une plaque : 10 mg ABTS + 10 mL tampon Citrate 0,05M + 10 µL H₂O₂ 30%
(à ajouter au dernier moment)
Ou pour 25 mL d'acide citrique, ajouter 125 µL d'ABTS et de 100 µL de H₂O₂ (cf. préparation substrats ci-dessous)
10. **Lecture : arrêter la révélation si la DO est comprise entre 0,8 et 1,2 à 405 nm**
DO (finale) = [(DO₁ + DO₂)/2] – DO (Ag-)

Préparation des tampons

Préparation du tampon PBS

- Na₂HPO₄ 1,21g
- KH₂PO₄ 0,20 g
- NaCl 8,00 g

QSP 1 litre d'eau distillée pH 7,4 (ajusté à l'aide de HCl)

Préparation du tampon carbonate/bicarbonate : 0,1 M, pH 9,6

- NaHCO₃ 0,1M 8,4g
- Ajuster pH à 9,6 avec Na₂CO₃ 0,1M 10,6 g

NB : pour 250 mL de NaHCO₃, ajouter environ 95mL de Na₂CO₃

Préparation du tampon citrate 0,05 M, pH 4

Préparer 10,5 g d'acide citrique (C₆H₈O₇) dans 1 litre d'eau distillée. Ajuster le pH à 4 avec du NaOH

Préparation du substrat

- **H₂O₂ ou eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène** : 500 µL d'H₂O₂ à 30% + 75 mL d'eau distillée, conserver au frais et à l'abri de la lumière. Ajouter H₂O₂ juste avant la révélation.
- **ABTS ou 2,2'-azino-di-[3-éthylbenzathiazoline sulfonate]** : 135 mg ABTS poudre pour 6,25 mL d'eau distillée, conserver au frais et à l'abri de la lumière.