

**CIRAD-EMVT**  
Ta 30/B Campus international Baillarguet  
34398 MONTPELLIER cedex 05

**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE**  
23, chemin des capelles  
31076 TOULOUSE cedex 03

**CIRDES**  
Centre international de recherche pour le développement d'élevage en zone sub-humide  
01 BP 454 BOBODIOULASSO 01  
BURKINA FASO

**CERTIFICAT D'ETUDE APPROFONDIE VETERINAIRE**  
**PATHOLOGIE ANIMALE EN REGION CHAUDE**

## **MEMOIRE DE STAGE**

**ESSAI D'IMMUNISATION DE  
BOVINS CONTRE *GLOSSINA PALPALIS*  
*GAMBIENSIS* (DIPTERE, GLOSSINIDAE) A  
PARTIR D'ANTIGENES  
INTESTINAUX**

Par

Salif WANE



## Mes remerciements

A Monsieur Marc DESQUESNES qui m' a proposé ce sujet très intéressant et un encadrement très précieux

A Monsieur Philippe JACQUIET qui a accepté de lire le document. Il a aussi apporté des modifications qui ont amélioré considérablement le rapport

A Mes frères, sans eux je ne pourrai participer aux cours du CEAV

A Maryline LOQUET qui n'a ménagé aucun effort pour la mise en forme du rapport et au soutien moral même loin de moi

A Madame Sylvie, sans elle, la présentation du rapport serait compromise

Aux techniciens du CIRDES qui m'ont aidé à faire les manipulations qu'a nécessité l'expérience

A Thomas et Mélanie qui m'ont donné un coup de main très précieux

A Mathilde qui a mis à ma disposition sa chambre pour finaliser le rapport

A tous ceux de près ou de loin qui ont apporté leur aide à la réalisation de ce mémoire.

# Sommaire

<u>Introduction</u>	1
 <b>Première Partie : Synthèse bibliographique</b>	
<u>1. Anatomie de l'appareil digestif des Glossines</u>	3
<b>1.1. Description générale</b>	
<b>1.2. Structure et ultrastructure du mésentéron</b>	4
<b>1.2.1. Structure épithéliale du mésentéron</b>	4
1.2.1.1. Cellules épithéliales irrégulières	
1.2.1.1.1. Cellules épithéliales hypertrophiées (mycétocyte)	4
1.2.1.1.2. Cellules épithéliales sécrétrices et absorbantes	5
1.2.1.2. Cellules épithéliales régulières	
<b>1.2.2. Structures spécialisées du mésentéron</b>	6
1.2.2.1. La membrane péritrophique (MP)	
1.2.2.2. La chambre de filtration	
1.2.2.3. Le mycétome	
<b>1.2.3. Les formations rubanées du cytoplasme et le "revêtement nucléaire" des cellules épithéliales du mésentéron</b>	7
1.2.3.1. Les formations rubanées	
1.2.3.2. Le "revêtement nucléaire"	
 <u>2. Les symbiotes des Glossines</u>	9
<b>2.1. Conception et définition</b>	9
<b>2.2. Localisation des symbiotes</b>	10

2.3. Rôles des symbiotes	11
2.3.1. Apport de complément nutritionnel	11
2.3.2. Interactions des symbiotes avec éléments pathogènes transmis (Trypanosome)	11
2.4. Acquisition des symbiotes	12
2.5. Conséquences de la destruction des endosymbiotes de l'hôte	13
2.5.1. Sur la survie des mouches	
2.5.2. Sur la fécondité des mouches	
2.5.3. Sur la capacité vectorielle	
<b><u>3. Intestin moyen comme cible des stratégies de contrôle</u></b>	<b>16</b>
3.1. Faisabilité d'un vaccin anti-intestin moyen	17
3.2. Intestin moyen comme site d'attaque immune	18
3.3. Exemples de l'intestin moyen comme cible immunitaire	19
3.3.1. Vaccination contre <i>Boophilus microplus</i>	20
3.3.2. Vaccination contre <i>Lucilia cuprina</i>	21
3.3.3. Vaccination contre les autres arthropodes	21

## **Deuxième Partie : Matériels et méthodes**

<b><u>1. Matériels</u></b>	<b>23</b>
1.1. Matériels techniques	24
1.1.1. Loupes :	
1.1.2. Pinces DUMONT	

1.1.3. Cryotubes	
1.1.4. Microscopes	
1.1.5. Boîtes de pétrie	
1.1.6. Plateau d'alimentation et membranes	
1.1.7. Bain marie et azote liquide	
1.1.8. Sonificateur	
1.1.9. Potter	
1.1.10. Cages	
1.1.11. Pondeires	
1.2. Matériels biologiques	24
1.2.1. Mouches	
1.2.2. Les bovins	
<b><u>2. Méthodes</u></b>	26
2.1. Récolte des antigènes ( jabots et intestins moyens )	26
2.2. Préparation des antigènes	26
2.3. Protocole expérimental	27
2.3.1 Protocole de challenge zéro des mouches	27
2.3.2. Immunisation des animaux	27
2.3.2.1. Protocole challenge 1 des mouches	
2.3.2.2. Protocole challenge 2 des mouches	
2.4. Contrôle de l'infection des mouches	29
2.5. Méthodes d'exploitation statistique des résultats	29

2.5.1. *Comparaison de moyenne*

2.5.2 *Test de l'écart réduit*

## **Troisième Partie : Résultats et Discussion**

<b><u>1. Résultats</u></b>	31
1.1. <i>Mortalité</i>	32
1.2. <i>Taux de ponte</i>	33
1.3. <i>Poids moyen des pupes</i>	35
1.4. <i>Taux d'infection</i>	37
<b><u>2. Discussion</u></b>	37
<b>Conclusion</b>	42
<b>Annexes</b>	
<b>Références bibliographiques</b>	43

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: schéma de l'anatomie du tube digestif et glandes annexes

Figure 2 représentation schématique de l'appareil digestif de la glossine

Figure 3: représentation schématique de la structure interne du proventricule

Figure 4: représentation schématique du jabot et intestin moyen de la glossine

Figure 5: structure et ultrastructure de l'appareil digestif de la glossine

Tableau 1: protocole expérimental

Tableau 2: mortalité des mouches nourries sur bovin non immunisés (lot zéro) et bovins immunisés (lot1)

Tableau 3: : mortalité des mouches nourries sur bovin non immunisés (lot zéro) et bovins immunisés (lot 2)

Tableau 4: taux de ponte des mouches nourries sur bovin immunisés (lot1) et bovins non immunisés (lot zéro)

Tableau 5: : taux de ponte des mouches nourries sur bovin immunisés (lot 2) et bovins non immunisés (lot zéro)

Tableau 6: poids moyen des pupes pondues par les mouches nourries sur bovins non immunisés (lot 0) et immunisés (lot1)

Tableau 7: poids moyen des pupes pondues par les mouches nourries sur bovins non immunisés (lot 0) et immunisés (lot2)

Graphique 1: mortalité cumulée du lot 1

Graphique 2: comparaison de mortalité cumulée sur deux lots différents pour le bovin immunisé par **IMJ**

Graphique 3: comparaison de mortalité cumulée sur deux lots différents pour le bovin immunisé par **JJP**

Graphique 4: comparaison de mortalité cumulée sur deux lots différents pour le bovin témoin immunisé

Graphique 5: comparaison de mortalité cumulée sur deux lots différents pour le bovin immunisé par **IMP**

Graphique 6: comparaison de mortalité des mouches nourries sur bovins non immunisés (lot 0) et bovins immunisés (lot 2)

Graphique 7: comparaison de taux de ponte des mouches nourries sur bovins immunisés (lot 2) et non immunisés (lot 0)

Graphique 8: comparaison du poids moyen des pupes issues de mouches nourries sur bovins immunisés (lot 2) et non immunisés (lot 0)

Photo 1: cages à mouches posées sur des pondoirs

Photo 2: séance de manipulation des mouches pour séparer les mâles des femelles

Photo 3: bovin d'expérience dans la cour de l'étable

Photo 4: pose de cages à mouches

Photo 5: contention de l'animal pour la pose de cages à mouches

Photo 6 et 8: pose des cages à mouches sur l'animal infecté par *Trypanosoma congolense*

Photo 7: retrait des cages pour vérifier le nombre de mouches gorgées

# **INTRODUCTION**

Il existe de vastes espaces fourragers en Afrique tropicale. Paradoxalement, ces pâturages couvrant plusieurs millions kilomètres carrés sont dans des régions infestées de Glossines vectrices de trypanosomoses humaine et animale. La trypanosomose bovine constitue un frein majeur à la production animale dans ces pays d'Afrique tropicale.

Les méthodes de contrôle de cette maladie n'ont pas abouti à des résultats complètement satisfaisants, que ce soit au niveau de la limitation des vecteurs ou utilisation des médicaments contre le trypanosome. Par ailleurs, des phénomènes de résistance aux trypanocides et insecticides sont apparus. De plus, le développement d'un vaccin contre le parasite est entravé par des phénomènes de variations antigéniques.

La Glossine vectrice de la trypanosomose ingère, pendant la prise du repas de sang les composants du système immunitaire de son hôte comme les anticorps, le complément et les cellules effectrices du système immunitaire.

D'après plusieurs études sur l'interaction entre l'hôte et l'arthropode, il a été montré que l'hôte n'est exposé qu'à un répertoire limité d'antigènes de l'insecte hématophage. Ces antigènes sont des molécules que l'arthropode sécrète avec la salive au cours du repas sanguin et qui sont localisées dans les pièces buccales. Par conséquent, il est improbable que les anticorps et autres composants immunitaires absorbés par l'insecte, pourraient avoir une spécificité pour les organes digestifs internes comme l'intestin, parce que ces organes ne sont pas réellement exposés au système immunitaire de l'hôte.

Ainsi, est venue l'idée que l'intestin des arthropodes pourrait être une cible d'une réponse immunologique protectrice. Cette idée relativement récente a coïncidé avec la fabrication d'un vaccin contre la tique du bétail *Boophilus microplus* à partir d'une protéine intestinale.

Des expériences faites avec des glossines sur lapins ou souris ont rapporté soit des mortalités augmentées, soit des fécondités diminuées des arthropodes nourris sur animaux immunisés par des extraits d'organes internes.

Notre expérience vise à reproduire contre les Glossines, un mode d'immunisation réalisé contre les tiques.

Notre travail est divisé en deux parties :

⇒ Une synthèse bibliographique qui résume les différentes tentatives d'immunisation des animaux avec des organes internes d'arthropodes hématophages

⇒ Une partie expérimentale où nous avons comparé la mortalité, le nombre de pupes produites, le poids moyen de ces pupes. Puis, nous calculons le taux de ponte des mouches (Glossines) nourries sur bovins immunisés avec l'intestin moyen postprandial, l'intestin moyen à jeun et le jabot.

**PREMIERE PARTIE:**  
**Synthèse bibliographique**

## 1. Anatomie de l'appareil digestif des Glossines

### 1.1. Description générale

L'appareil digestif des glossines, comme celui des autres insectes comprend : le pharynx, l'œsophage, le jabot, le proventricule, l'intestin (fig 1, fig 2).

La juxtaposition du labre et de la gouttière labiale constituent le Canal alimentaire. Il se prolonge dans la capsule céphalique par le pharynx, tube dirigé de bas en haut et d'arrière en avant, aboutissant à la pompe cibariale, dont la paroi antérieure, simple, est mue par de puissants muscles dilatateurs, la paroi extérieure étant sclérifiée.

A la sortie de la pompe cibariale se trouve un sphincter (sphincter œsophagien antérieur) auquel fait suite l'œsophage. Ce dernier pénètre dans la cavité thoracique jusqu'à la face ventrale du proventricule. Il est situé dans la partie antérieure du thorax et se présente sous la forme d'une " selle de cheval " (Itard J.,1976).

A sa face dorsale s'abouche l'intestin, à sa face ventrale l'œsophage et le canal du jabot. Le proventricule (fig 3) secrète la membrane péritrophique qui forme un tube. Ouverte à son extrémité postérieure, elle détermine sur toute sa longueur deux régions : l'une endopéritrophique limitée par les parois internes de la membrane et l'autre ectopéritrophique comprise entre les parois externes de la membrane et la muqueuse intestinale.

Dans la partie antérieure de l'abdomen se trouve le jabot. C'est un diverticule ventral de l'œsophage qui se remplit de sang au moment des repas et se vide dans les cinq à trente minutes qui suivent (fig 4).

L'intestin chez les glossines comprend trois parties : l'intestin antérieur ou stomodeum, l'intestin moyen ou mésentéron et l'intestin postérieur ou proctodeum.

Du proventricule jusqu'aux tubules de malpighi, l'intestin moyen est divisé en trois parties selon leur fonction ; le segment antérieur, le segment moyen et le segment postérieur. Le segment postérieur possède dans sa région iléale ou antérieure courte une muqueuse doublée d'une couche de chitine. Lui font suite le colon et le rectum. Les parois internes du

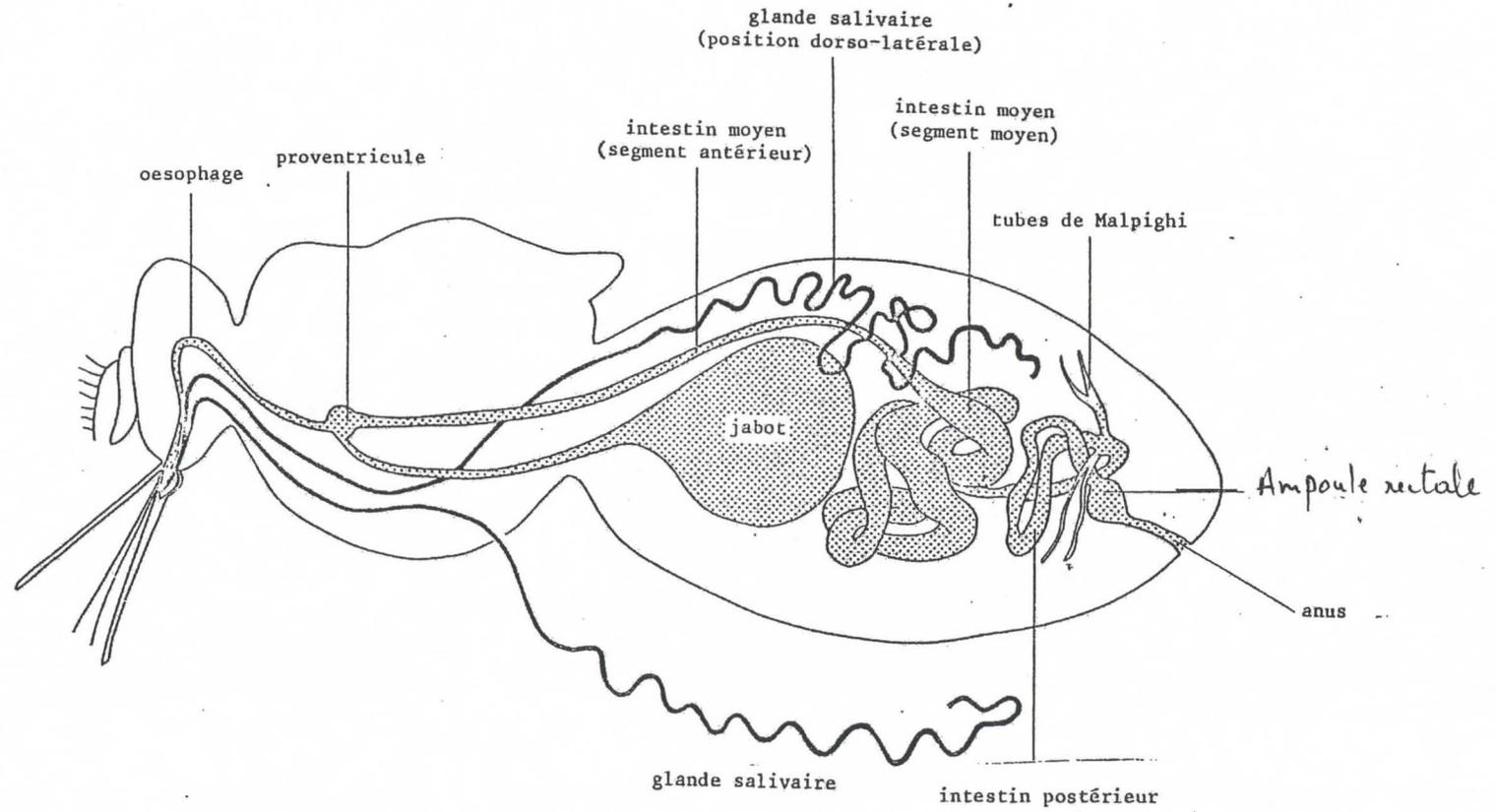


Figure 1 : schéma de l'anatomie interne du tube digestif et des glandes annexes.

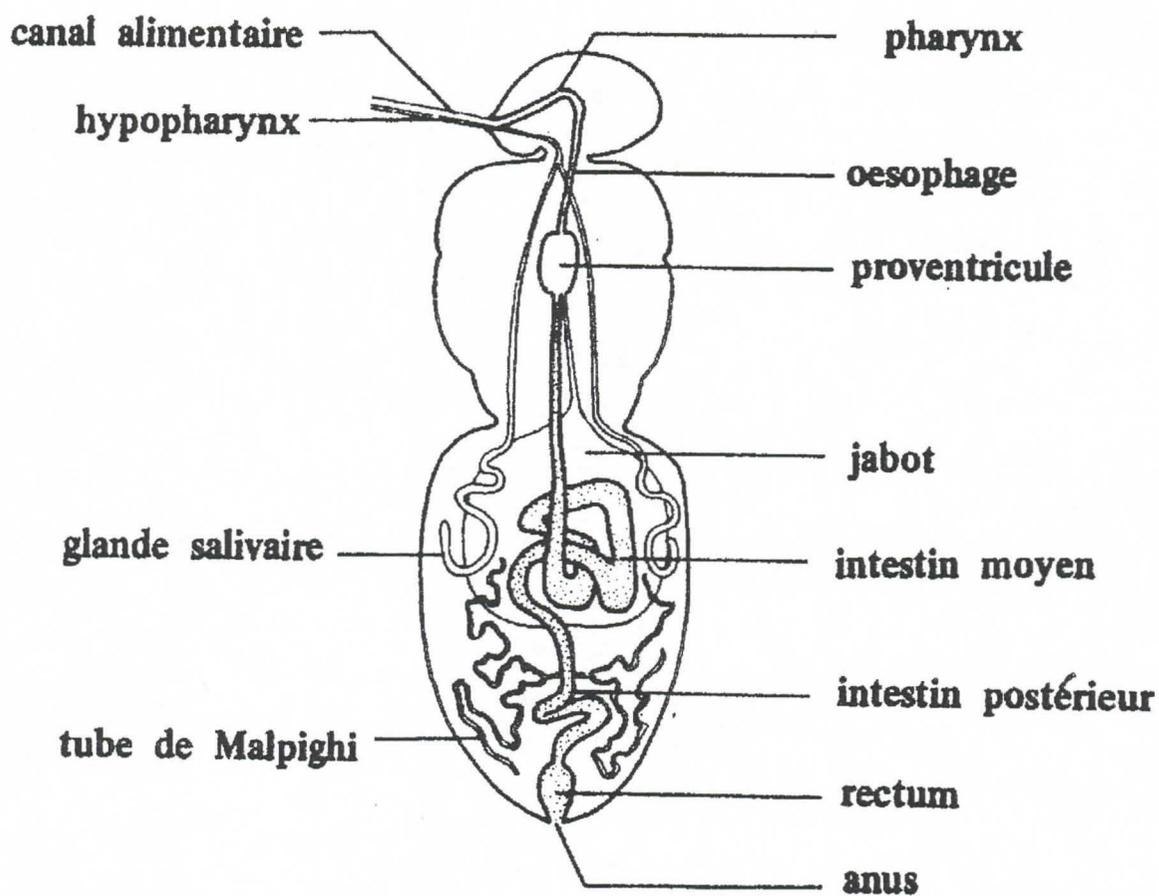


Figure 2: Représentation schématique de la structure (simplifiée) de l'appareil de la glossine.  
Le corps est vu par sa face ventrale, la tête par sa face latérale.

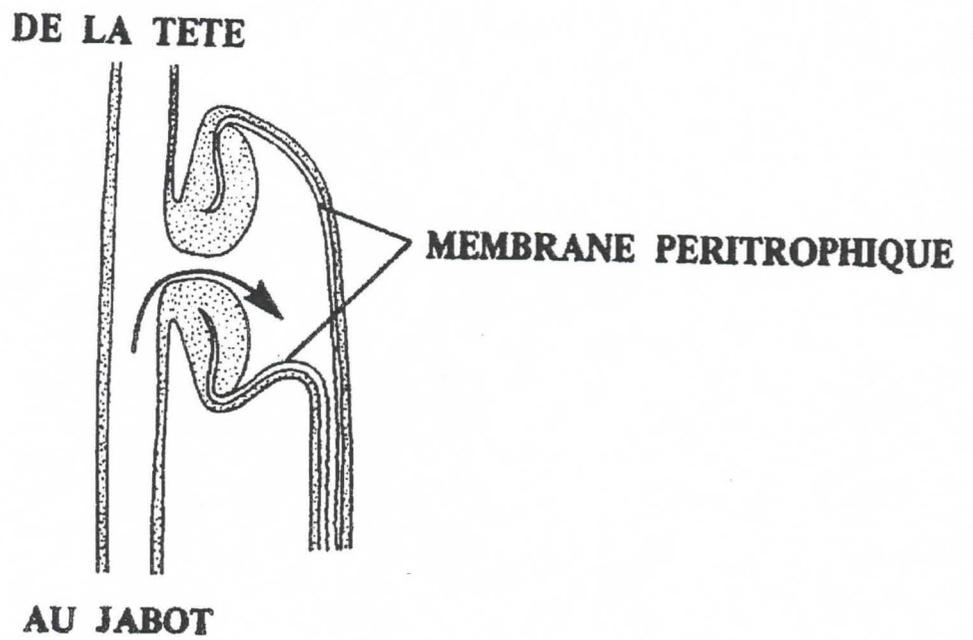


Figure 3: Représentation schématique de la structure interne du proventricule. La flèche indique le trajet suivi par le repas sanguin pour aller du jabot à l'intestin moyen.

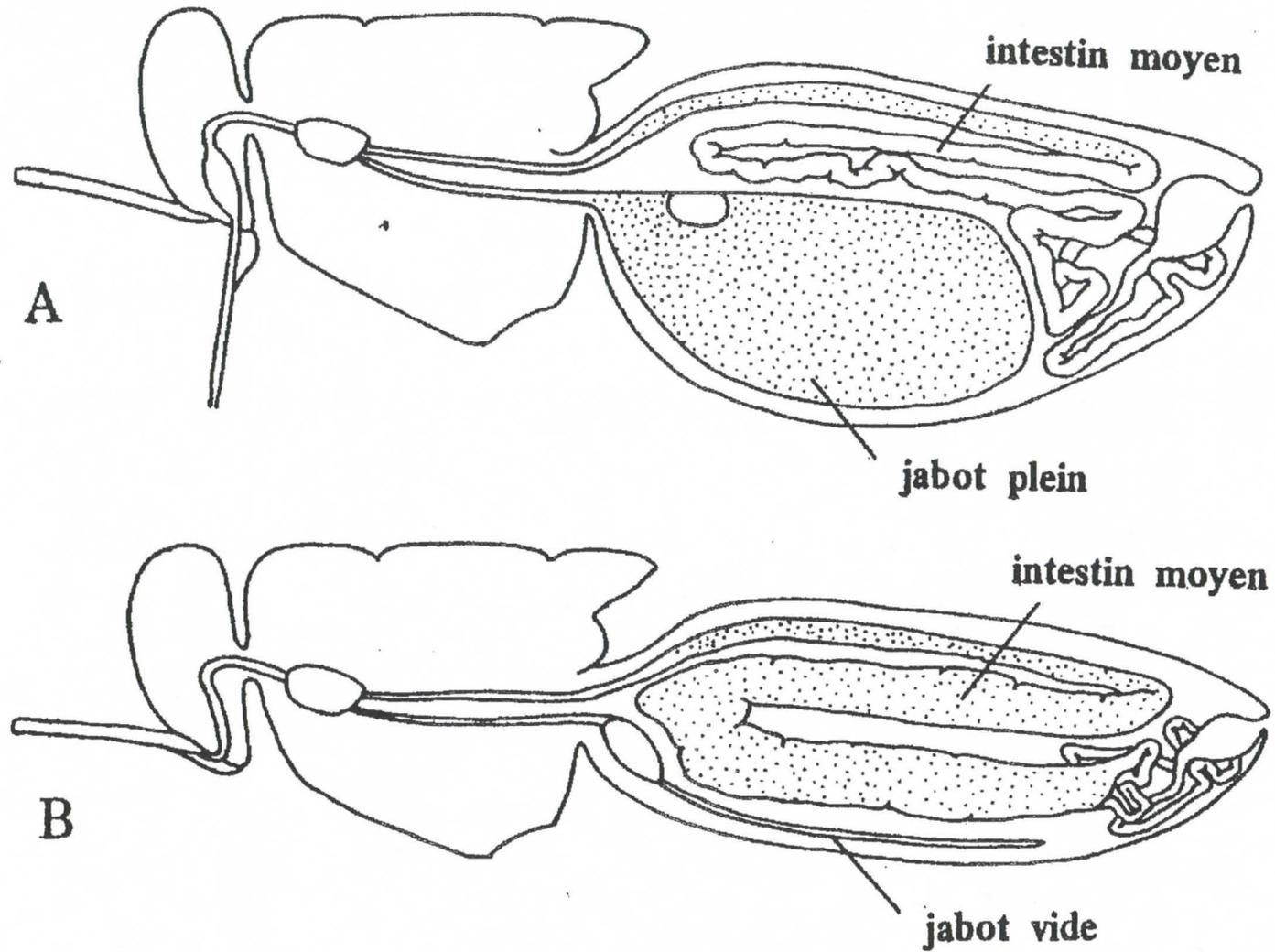


Figure 4: Représentation schématique du jabot et de l'intestin moyen de la glossine : A, immédiatement après le repas de sang ; B, quelques heures plus tard.

colon et rectum sont revêtues d'une couche de chitine garnies de petites épines dirigées vers l'arrière, entraînant et délimitant la membrane pérotrophique. Le rectum est dilaté en ampoule et renferme des papilles rectales (Itard J., 1976). Le proctodeum commence au point d'insertion des tubes de malpighi et se termine à l'anus.

## 1.2. Structure et ultrastructure du mésentéron

Il est constitué d'un épithélium qui repose sur des tissus musculaires et conjonctif. Après le repas, le sang est séparé de la surface de l'épithélium par la membrane péritrophique.

Les premières études histologiques sur le mésentéron des tsétsés ont été effectuées par Wigglesworth (1929) (fig 5). Puis elles ont été suivies par celles de Moloo *et al* (1970) ; Jenni et Bohringer (1976) ; Brown (1980) qui font des observations partielles sur la structure du mésentéron.

### **1.2.1. Structure épithéliale du mésentéron**

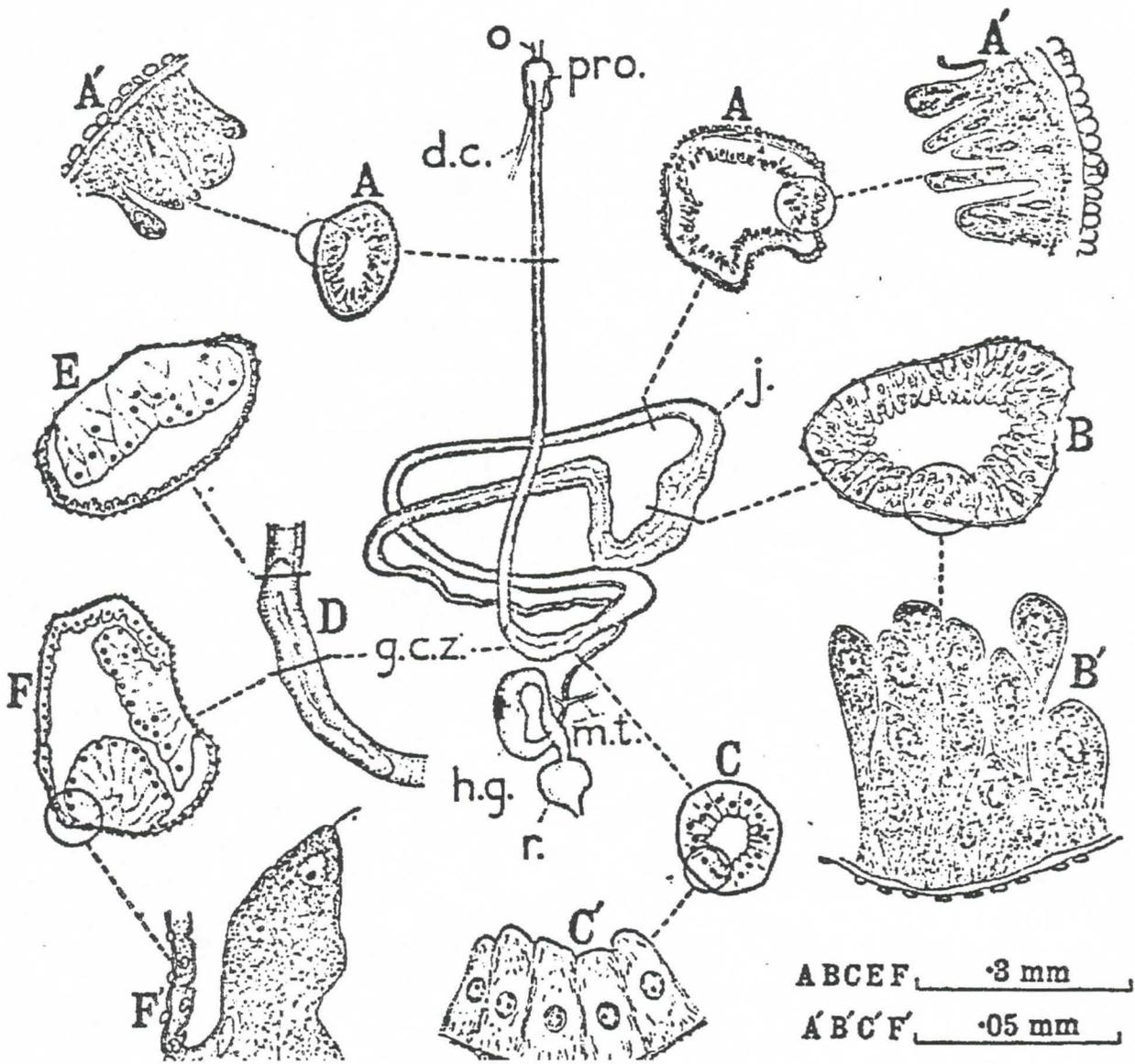
L'épithélium est constitué de quatre types de cellules pourvues d'une bordure de microvillosités caractéristiques et d'un labyrinthe basal.

#### *1.2.1.1. Cellules épithéliales irrégulières*

Ce sont des cellules de type pavimenteux dans le segment antérieur de l'intestin moyen. Dans la partie médiane du segment antérieur de l'intestin moyen, on trouve :

##### **1.2.1.1.1. Cellules épithéliales hypertrophiées (mycétocytes)**

L'ensemble de ces cellules forment le mycétome. Le mycétome héberge les symbiotes qui ont été classés, autrefois, dans les rickettsies. Actuellement il a été montré que ces symbiotes appartiennent à la famille des Entérobactérieace à l'intérieur de la gamma-3 subdivision des Protobactéries.



**Figure 5** : Anatomie, structure et ultrastructure de l'appareil digestif de *Glossina* sp

AA' : section transverse du segment antérieur ; BB' : section transverse du segment moyen ; CC' : section transverse du segment postérieur ; D : zone des cellules géantes ; E : section transverse à travers la fin des mycetocytes ; FF' : section à travers le milieu des mycetocytes ; F' : bactéroïdes à l'intérieur des mycetocytes. ( Wigglesworth, 1929 )

O : œsophage ; Pro : proventricule ; J : jabot ; Zcg : zone de cellules géantes ; tm : tubes de malpighi ; hg : intestin postérieur ; r : rectum

### 1.2.1.1.2. Cellules épithéliales sécrétrices et absorbantes

Elles se trouvent dans le segment moyen du mésentéron, constitués de plusieurs couches. Le segment se rétrécit graduellement vers son extrémité postérieure. Il est plus large et plus court que le segment antérieur de l'intestin moyen.

#### 1.2.1.2. Cellules épithéliales régulières

Elles sont cubiques dans la muqueuse du segment postérieur de l'intestin moyen. Toutes ces cellules sont pourvues à leur surface apicale d'une bordure en brosse très développée. Au microscope, la différenciation est faite de microvillosités disposées régulièrement. Les cellules sont cylindriques et mesurent 0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 0,2  $\mu\text{m}$  de longueur (Ladikpo, 1989). Ces dimensions sont très proches de celles observées par Brown, 1980 sur *Glossina morsitans*.

A la base des cellules épithéliales du segment postérieur, la membrane est plissée avec des invaginations riches en mitochondries. La concentration de mitochondries dans la membrane basale de ces cellules supportent le rôle actif de transport. Cette couche basale apicale de la membrane est impliquée dans l'adhésion des cellules voisines et forme des jonctions complexes. Ces jonctions sont tout à fait poreuses permettant le passage de larges molécules comme les immunoglobulines G (Hatfield, 1988 ; Vaughan *et al*, 1990 ; Alligham *et al*, 1992 ).

Les cellules épithéliales reposent sur une lame basale dense et épaisse. Elles sont séparées de la membrane plasmique par une zone claire. Cette zone apparaît à faible grossissement comme une matrice amorphe et homogène (Ladikpo, 1989). D'après Brown (1980), sa structure serait semblable à la structure grillagée observée dans la lame basale du mésentéron de *Aedes aegypti* (insecte, Diptère) par Terzakis (1967).

Selon ce dernier, une telle disposition reflète une association particulière de polysaccharides et de collagène. La lame basale se déforme au cours des repas sanguins et reprend sa forme initiale après digestion, cela explique les variations de son épaisseur. Ces

modifications polysaccharidiques sont à l'origine du polymorphisme des noyaux des cellules épithéliales.

On trouve des noyaux aplatis dans les zones d'étirement de l'épithélium et des noyaux sphériques dans les zones épaisses.

## 1.2.2. Structures spécialisées du mésentéron

### 1.2.2.1. La membrane péritrophique (MP)

Opdebeeck (1994) considère la membrane péritrophique comme un sac qui entoure les aliments ingérés pendant le repas sanguin.

Il est largement accepté que cette membrane joue un rôle de barrière mécanique à beaucoup de cellules, bien qu'elle en laisse passer certaines comme l'hémoglobine (Rudzinska et al, 1982). Elle protège l'intestin contre les abrasions de particules alimentaires.

Cette membrane composée de trois couches, se forme à partir de trois types de cellules épithéliales sécrétrices situées dans la partie du bourrelet annulaire en continuité avec les cellules du stomodeum (Moloo, Steiger et Hecker., 1970).

Les cellules de type I et type II sécrètent la première couche de la membrane péritrophique, tandis que les cellules de type III sécrètent la seconde et troisième couche.. Ces trois couches d'épaisseur inégale sont composées de glucosaminoglycanes, glucoprotéines et chitine (Lehane et al, 1996). Sur la troisième couche, il y a présence de sites sulfatés avec des espaces de 53 nm. Ces derniers jouent le rôle de filtration (Lehane et al, 1996).

Une fois formée, la membrane péritrophique, bilaminaire, est comprimée entre l'invagination de l'intestin postérieur et le bourrelet annulaire.

Les mouches ténérales, immédiatement après éclosion, n'ont pas de membrane péritrophique (Itard, 1976). Cette membrane est sécrétée 24 heures après éclosion. Chez les mouches non ténérales, elle apparaît comme une fine membrane continue. La membrane

péritrophique joue un rôle important dans la digestion de sang et dans le développement des trypanosomes.

#### *1.2.2.2. La chambre de filtration*

Les insectes ont développé un arrangement spécialisé de l'intestin moyen : les tubes de malpighi et l'intestin postérieur connus comme une chambre de filtration.

L'épithélium de ces tissus est extrêmement léger et présente un minimum de barrière pour le mouvement de l'eau. Les cellules possèdent une lame basale large plissée typique des tissus transportant l'eau et les ions (Marshall, 1983).

#### *1.2.2.3. Le mycétome*

Le mycétome est localisé dans la partie médiane du segment antérieur du mésentéron. Il correspond à la zone des cellules géantes, qui sont des cellules hypertrophiées (mycétocytes).

Ces mycétocytes contiennent des microorganismes en batonnet de type bactérien mesurant de 4 à 6  $\mu\text{m}$  de long pour un diamètre de 1,5 $\mu\text{m}$  (Ladikpo, 1989), de dimensions voisines de celles observées par Reinhardt *et al* (1972). Ces derniers concluent que les symbiotes du mycétome appartiennent au groupe des bactéries Gram négatif. Ces bactéries seraient sensibles aux antibiotiques et peuvent effectuer la synthèse de vitamines du groupe B et de l'acide panthothénique constituant essentiel du coenzyme A.

### **1.2.3. Les formations rubanées du cytoplasme et le "revêtement nucléaire" des cellules épithéliales du mésentéron**

Ces structures avaient été signalées chez les Glossines, et font l'objet d'études très limitées.

#### *1.2.3.1. Les formations rubanées*

Ladikpo (1989) en a mis en évidence dans trois segments du mésentéron chez les mouches infectées et non infectées. Elles sont situées dans le cytoplasme autour des noyaux.

Elles ont été décrites comme des formations à symétrie bilatérale avec un axe médian plus sombre. Leur épaisseur est d' environ 130 à 160 nm. Les structures fines, difficiles à préciser, apparaissent comme finement striées et constituées de filament organisés perpendiculairement à l'axe médian.

Ces formations rubanées décrites par Ladikpo sont proches de celles décrites sous le terme de "Rode-like" structure par Jenni et Bohringer, 1976 ; Ellis *et al*, 1981.

#### 1.2.3.2. Le "revêtement nucléaire"

La membrane nucléaire externe est recouverte par la même structure rubanée qui constitue, autour du noyau, une véritable enveloppe externe supplémentaire qui est nommée "revêtement nucléaire" (Ladikpo 1989). Ce revêtement est constitué presque exclusivement de protéines.

Ce revêtement a été observé par plusieurs auteurs : Jenni et Bohringer (1976) sur des mouches ténérales de *Glossina morsitans* ; Brown (1980) sur *Glossina morsitans* ; Ellis *et al*, (1981) sur *Glossina palpalis*, *Glossina tachinoides*, *Glossina fuscipes* 24 heures à 40 jours après éclosion.

Selon Ellis *et al* (1981) le revêtement a une structure et des dimensions propres à chaque espèce. Son apparition est liée aux événements physiologiques qui suivent l'ingestion du repas sanguin.

Pour Jenni et Bohringer (1976), ce revêtement pourrait être une barrière pour les échanges nucléocytoplasmiques chez les mouches âgées. Ils montrent aussi que cette structure rubanée existe chez les pupes et des mouches ténérales.

Aucune hypothèse n'a pu être formulée sur la nature et la composition chimique de ces structures. Néanmoins les tests cytoplasmiques ultrastructuraux effectués par Ladikpo (1989) ont montré que ces structures sont constituées presque exclusivement de protéines. Tous ces organes du tube digestif sont enveloppés par le tissu adipeux, souvent très abondant et formé de cellules adipeuses alignées en chaînette. Ce tissu constitue une réserve de lipides et joue un rôle d'emballage des organes digestifs.

## 2. Les symbiotes des Glossines

Il a été montré par Stiles *et al* (1990) qu'il y a dans l'intestin moyen de *Glossina palpalis*, agglutination et lyse des Trypanosomes.

Des agglutinines sont secrétées par des cellules de l'intestin moyen, ce sont des glycoprotéines non immunes à récepteurs spécifiques appelés lectine. Ces lectines ont été mis en évidence par plusieurs auteurs : Molyneux *et al* (1986) ; Ibrahim *et al* (1984) ; Ingram *et al* (1988) ; Ingram *et al* (1990) ; Welburn *et al* (1989). Ces lectines empêcheraient l'installation des trypanosomes. Il existe des sucres inhibiteurs des lectines dans l'intestin moyen (Ibrahim *et al*, 1984 ), ce qui favoriserait un taux élevé de l'infection intestinale des glossines par les trypanosomes ( Welburn *et al*, 1994 ).

Or les symbiotes du mycétome produisent des endochitinases et des N-acetylglucominidases qui hydrolysent la chitine en D-glucosamine (sucre) ; cette dernière serait responsable de l'inhibition des lectines. Ceci expliquerait le fait que les glossines sans symbiotes ne s'infectent pas et celles avec symbiotes s'infectent d'où l'intérêt d'études approfondies sur ces symbiotes pour pouvoir maîtriser le rôle vecteur des glossines.

### 2.1. Conception et définition

Les symbiotes appelés aussi les endosymbiotes sont des bactéries présentes dans les mycétocytes du segment antérieur du mésentéron où ils vivent en symbiose avec leurs hôtes les mouches tsé-tsés.

Leur position taxonomique est incertaine. Néanmoins par des techniques de PCR, il a été montré qu'il existe trois microorganismes distincts dans les mycétocytes (O'Neill *et al*, 1993).

Deux de ces microorganismes sont présents dans des cellules épithéliales spécialisées (bactériocytes) : *Wigglesworthia glossinidia* dans le segment antérieur de l'intestin moyen, correspondant aux endosymbiotes primaires (P-endosymbionts), de 5 à 9  $\mu\text{m}$  de longueur (Reinhardt *et al*, 1972). *Sodalis glossinidius* est présent aussi dans les cellules de l'intestin moyen (Aksoy, 1995 ; Dale *et al*, 1999). Il correspond aux endosymbiotes secondaires (S-endosymbionts) et mesure 2 à 3  $\mu\text{m}$ . Ils sont arrangés dans la direction de l'axe longitudinal

des cellules de l'hôte et sont entourés par la membrane plasmique de l'hôte ( Nogge et al, 1982 ; Reinhardt et al, 1972 ).

Un troisième symbiote nommé *Wolbachia pipientis* (O'Neill et al, 1993) a été caractérisé dans les tissus reproducteurs de l'insecte.

## 2.2. Localisation des symbiotes

Les symbiotes ont été localisés dans l'intestin moyen et dans les ovaires ainsi que dans les glandes lactophores et même dans le tissu adipeux (Wigglesworth, 1929; Reinhardt et al, 1972 ; Pinnock et Hess, 1974 ; Southwood et al, 1975 ; Shaw et al, 1991).

Les endosymbiotes sont intracellulaires et associés avec le tissu intestinal aussi bien pour les P-endosymbiotes que les S-endosymbiotes.

Les P-endosymbiotes sont des bactéries gram négatif résidant dans les cellules épithéliales spécialisées (mycétocytes) du segment antérieur du mésentéron alors que les S-endosymbiotes sont hébergés dans les gaines des cellules épithéliales ( Aksoy et al, 1995 ).

Par des analyses du génome, Aksoy (1995) a montré que les endosymbiotes de l'intestin appartiennent à la famille des entérobactériaceae dans la gamma-3 subdivision des protobactéries.

Ces microorganismes ne sont pas confinés dans quelques régions du cytoplasme mais dispersés au hasard, par contre leur fréquence dans d'autres tissus est faible .

*Wigglesworthia* est exclusivement trouvé dans les mycétocytes, tandis que *Sodalis* est détecté dans l'intestin moyen, muscle, corps gras, hémolymph, glandes lactées et salivaires. Alors que *Wolbachia* est réduit aux ovaires dans certaines mouches (Aksoy, 2000 ) par contre Cheng et al (2000) ont trouvé *Wolbachia* dans les tissus somatiques de plusieurs insectes .

Tous ces symbiotes, localisés dans des sites stratégiques du tube digestif et organe reproducteur, jouent un rôle important dans la vie de l'insecte.

### 2.3. Rôles des symbiotes

Les Glossines n'ayant qu'une seule source d'alimentation le sang , vont utiliser les micro – organismes en symbiose dans leur tube digestif , pour leur apporter les compléments nutritionnels nécessaires à leurs survie, croissance larvaire et fécondité des adultes .

#### **2.3.1. Apport de complément nutritionnel**

Si la performance des insectes libres de symbiotes est dépréciée par rapport à ceux vivant en symbiose avec les microorganismes, c'est que probablement, ces symbiotes apportent des dérivés nutritionnels à leurs hôtes. Fraenkel *et al* (1943) ont montré que la croissance des larves de *Stegabium panicum*, est détériorée si elles sont alimentées avec un aliment dépourvu de levure, tout en sachant que ces levures proviennent des riboflavine, acide nicotinique, pyridoxine et acide panthothénique. Nogge (1976) en reprenant les mêmes expériences chez la Glossine, a montré que les microorganismes symbiotes de l'intestin moyen produisent des dérivés de la vitamine B (riboflavine, acide nicotinique etc...) confirmant ainsi l'expérience de Fraenkel. Par conséquent, les microorganismes des insectes hématophages ont probablement un rôle nutritionnel important pour les espèces qui dépendent du repas sanguin pour le cycle de leur vie et un rôle moins important pour les insectes qui utilisent le sang que pour les adultes.

#### **2.3.2. Interactions des symbiotes avec les éléments pathogènes transmis (Trypanosome)**

Les trypanosomes sont ingérés par les glossines avec le repas sanguin. Avant d'être transmis à l'animal, ils passent par deux stades de développement :

➤ L'ingestion et différenciation des formes procycliques prises sur les mammifères par l'insecte hématophage.

➤ L'invasion et la maturation des trypanosomes dans le tube digestif de l'insecte. La transmission des trypanosomes aux animaux impliquent le vecteur (Glossine) et leurs symbiotes. Ainsi Maudlin (1991) a montré que la sensibilité des femelles ténérales de tsé-tsé à être infectées par les trypanosomes est faible si les endosymbiotes sont éliminés.

Les glossines sont en général réfractaires aux parasites trypanosomiens parce qu'elles possèdent dans leur intestin des lectines qui sont capables de tuer les trypanosomes (Aksoy et al, 2001). Pour que les trypanosomes s'installent dans le tube digestif de la mouche et y poursuivent leur cycle, il faut que les lectines soient inhibées. Maudlin *et al* (1988) ; Welburn *et al* (1994) suggèrent que les symbiotes de l'intestin moyen dégradent la chitine de la membrane péritrophique, produisant ainsi la D-glucosamine et cette dernière serait à l'origine de l'inhibition des lectines, cette réaction favoriserait l'installation des trypanosomes dans l'intestin des Glossines.

#### 2.4. Acquisition des symbiotes

Le mode d'acquisition des endosymbiotes par les glossines est inhabituel chez les insectes parce qu'elles sont vivipares. La plus part du développement larvaire se produit dans l'utérus et elles se nourrissent de sécrétions des glandes lactées pour leur développement.

Buchner (1965) a remarqué que la subsistance des glossines sur des aliments déficients est supportée par un héritage maternel des bactéries mutualistes. Ces endosymbiotes, pour suivre l'évolution de leur hôte, sont obligatoirement transmis de génération en génération.

Dans l'acquisition des symbiotes, Eberle et al (1982) supposent que les symbiotes sont transmis par la voie transovarienne soit par une infection permanente des cellules germinales, soit par leur présence dans les ovaires aux derniers stades de développement. En 1983, les mêmes auteurs suggèrent d'autres voies, ainsi ils pensent à l'existence d'hormones qui attireraient les symbiotes dans les ovaires ou les cellules de l'hôte qui transportent ces symbiotes dans les ovaires. Huebner et al (1974), en se basant sur des observations microscopiques, suggèrent la présence des symbiotes de l'intestin dans les oocytes d'où la possibilité de leur transmission par la voie transovarienne. Ces suggestions ont été contredites par Pell et Southern (1975) qui notent une différence considérable entre le poids des symbiotes ovariens et ceux de l'intestin moyen. O'Neill et al (1993) démontrent que les S-

endosymbiotes et P-endosymbiotes ne sont pas hébergés dans le tissu ovarien par contre, les S-endosymbiotes sont localisés dans les glandes lactées. Ils suggèrent ainsi que les sécrétions des glandes lactées peuvent représenter une voie de transmission de *Sodalis*, Ma *et al* (1974) avaient émis les mêmes hypothèses. Seul *Wolbachia* est localisé dans le tissu ovarien.

Toutes les études indiquent que ni les S-endosymbiotes, ni *Wigglesworthia* ne sont hébergés dans le tissu ovarien, excluant ainsi toute transmission verticale des symbiotes de l'intestin.

Les hypothèses de la transmission des symbiotes de l'intestin des tsétsés par les glandes lactées sont formulées par analogie avec celle des ectoparasites hématophages (Diptères) (Buchner, 1965). Ces hypothèses sont appuyées par les observations de Ma et Denlinger (1974) de la présence de bactéries dans la lumière des glandes lactées de quelques glossines.. Des hémocytes ont été impliquées dans l'hébergement des endosymbiotes (Welburn et al, 1987).

En conclusion, les bactéries observées dans les glandes lactées par microscope électronique représentent les S-endosymbiotes. Ces sécrétions des glandes lactées peuvent représenter une voie de transmission de *Sodalis* pendant le développement larvaire (Aksoy et al, 1997).

Ces découvertes ne répondent pas à la voie de transmission de *Wigglesworthia*. Cette bactérie est absente dans les œufs et glandes lactées. *Wigglesworthia* a dû élaborer des mécanismes complexes pour faire en sorte qu'elle se transmette fidèlement à la progéniture des insectes.

## 2.5. Conséquences de la destruction des endosymbiotes de l'hôte

Les tsétsés hébergent des différentes espèces d'endosymbiotes et sont capable de les transmettre à leur

toujours fidèle au tissu ovarien où il est impliqué dans l'incompatibilité cytoplasmique chez certains insectes.

L'élimination des endosymbiotes peut entraîner des modifications bien connues telles que la stérilité, la diminution du taux d'infection par les trypanosomes et de la survie des mouches.

### **2.5.1. Sur la survie des mouches**

Quelques travaux ont été réalisés sur la survie des mouches après élimination des endosymbiotes en utilisant des antibiotiques.

Nogge et al (1982), a montré que la longévité des mouches est partiellement altérée en utilisant des antibiotiques (Penicilline, Kanamycine). Par contre l'Oxytrétracycline affectait durement la longévité des mouches, mais il a été remarqué que l'oxytrétracycline agit plus sur l'insecte que sur les symbiotes .

### **2.5.2. Sur la fécondité des mouches**

Nogge *et al* (1982), ont montré que l'effet sur la reproduction dépend de la concentration des antibiotiques et de la date d'administration. Ils remarquent que l'administration de penicilline à des mouches ténérales réduit voire annule la production de pupes par les femelles adultes tandis que sur les mouches non ténérales les effets sont moindres. Dans les deux cas, le poids des pupes et le taux d'éclosion sont légèrement affectés. La Kanamycine à des doses plus faibles donne des résultats comparables pour ce qui est du nombre de pupes (Nogge *et al*, 1982 ).

Les lysozymes ont été utilisées comme une alternative aux antibiotiques.. L'élimination des endosymbiotes par les lysozymes a été montrée pour la première fois par Malke (1964) sur les cafards. Il a remarqué que l'injection de lysozymes dans l'hémolymph entrainait une destruction des symbiotes.

L'avantage de ces lysozymes, est qu'elles ne sont pas toxiques, le taux dans l'insecte revient à la normale après quelques semaines, et il n'existe aucune résistance des

endosymbiotes aux lysozymes. Nogge et al (1982) utilisant des lysozymes sur des mouches tsétsés ont obtenu les mêmes effets que les antibiotiques.

Le fait que les mouches utilisent les endosymbiotes pour leur reproduction est confirmé par Nogge (1978 ; 1980), l'élimination des endosymbiotes par des anticorps spécifiques contre ces germes et non plus par des antibiotiques entraîne les mêmes répercussions sur la reproduction.

### 2.5.3. Sur la capacité vectorielle

Il a été montré au laboratoire que l'élimination de *Wigglesworthia* entraîne la stérilité, mais le mécanisme avec lequel ce symbiote intervient dans la fécondité est encore inconnu (Nogge, 1976). Alors que *Sodalis* joue un rôle important dans la sensibilité de la mouche à l'infection par les trypanosomes en jouant sur le système immunitaire de l'insecte (Welburn *et al*, 1991 ; Welburn et Maudlin, 1999).

Chez les mouches tsétsés, les trypanosomes ne peuvent s'installer que si, dans l'intestin, le N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) est sécrété pour inhiber la production des lectines qui ont un effet trypanocide (Maudlin *et al*, 1987). Il est vraisemblable que *Sodalis* soit responsable de l'inhibition de la lectine par production de GlcNAc qui s'accumule lors du développement des pupes (Welburn *et al*, 1993). Cette hypothèse est confirmée par Dale *et al* (2000), en utilisant un antibiotique (Streptozotocin) sur des tsétsés. Ils remarquent que le taux d'infection par les trypanosomes est réduit de 50%.

Des expériences de manipulation des endosymbiotes par utilisation des antibiotiques (Dale *et al*, 2000 ; Nogge *et al*, 1982) et des lysozymes (Nogge *et al*, 1982) pour lutter contre la transmission des trypanosomes ont été conduites. Les auteurs constatent que les antibiotiques (Kanamycine, Penicilline) et les Lysozymes agissent plus sur la fécondité parce qu'ils n'éliminent que les P-endosymbiotes. Alors que le Streptozocin a un effet sur la capacité vectorielle de la mouche. Cet antibiotique élimine *Sodalis* qui favoriserait l'installation des parasites par inhibition de lectines.

Des tentatives d'utilisation des symbiotes génétiquement modifiés ont été menées pour lutter contre la transmission des maladies.

Béard et al (2000), ont travaillé sur la transformation des symbiotes de rhéduve (vecteur de la maladie de chagas) et sur les mouches tsétsé.

L'idée de base est d'introduire dans les populations naturelles de vecteurs, une construction génétique particulière portant sur un ou plusieurs gènes codant pour des substances antiparasites dans le but d'interferer avec la différenciation, la réplication ou la transmission des agents infectieux.

La transformation des symbiotes est médiée par des constructions de type plasmidique, dont les premières études ont porté sur des peptides provoquant la formation des pores nommés cécropines (Béard et al, 2000). Ces cécropines sont par ailleurs résistantes à la protéolyse dans l'appareil digestif.

D'autres recherches portent actuellement sur les ADN et les ARN. Il est avant tout nécessaire de choisir un gène dont le produit d'expression est plus toxique pour le parasite que pour l'insecte.

Les études de Béard et al (1992) ont montré que les symbiotes génétiquement modifiés peuvent être introduits par voie alimentaire des insectes soit sur membrane en introduisant des bactéries cultivées sur du sang stérile défibriné, soit par le mécanisme de coprophagie utilisée par les Triatominés.

Des essais à petite échelle ont été réalisées avec succès pour ces techniques. Mais elles se heurtent au problème majeur de leur extension à grande échelle, car on ne sait pas comment ces nouvelles populations d'insectes vont se comporter une fois lâchées dans la nature. Puis il faudra prendre en compte le risque d'une mauvaise acceptabilité par l'opinion, de l'introduction d'organismes génétiquement modifiés.

### **3. Intestin moyen comme cible des stratégies de contrôle**

Les arthropodes hématophages qui utilisent le sang comme aliment sont potentiellement exposés au système immunitaire de leur hôte, d'où la possibilité de vacciner les hôtes de ces insectes en utilisant des extraits bruts des glandes salivaires, intestin et autres tissus ont été menées.

Cette idée d'utiliser les extraits bruts d'intestin pour immuniser les hôtes des arthropodes n'est pas nouvelle, Trager (1939) fut le premier à tenter cette expérience. Il injecte des extraits de larve, glandes salivaires, tractus digestif d'une femelle de *Dermacentor variabilis* à des porcs. Il remarque des effets anti-arthropodes quand il nourrit des tiques sur ces porcs.

D'autres tentatives ont suivi sur les moustiques, stomoxes, des parasites internes (*Haemonchus contortus*).

Actuellement, un vaccin contre la tique du bétail : *Boophilus microplus* est commercialisé.

### 3.1. Faisabilité d'un vaccin anti-intestin moyen

L'efficacité d'un candidat-vaccin anti-intestin moyen des arthropodes, est mesurée par l'évaluation du taux de mortalité, de la stérilité et de la capacité vectorielle (Billingsley, 1994a).

Les travaux d'Alger et al (1972); Sutherland et al (1974); Schlein et al (1976), sont parmi les premières démonstrations de la faisabilité de ces vaccinations en utilisant les organes internes de différents insectes. Webster et al (1992); Ben yakir et al (1994); East et al (1993), considèrent les préparations intestinales comme sources d'antigènes en travaillant respectivement sur le *Stomoxys calcitrans*, *Cténocéphalis felis felis*, *Lucilia cuprina*.

Des observations similaires sont faites sur des tiques comme *Rhipicephalis appendiculatus* et sur *Boophilus microplus* (Kemp et al, 1986 ; Kemp et al, 1989).

Dans la plupart des cas, les effets de l'immunité de l'hôte sur les arthropodes sont similaires et entraînent une augmentation de la mortalité, la réduction du gorgement des femelles la diminution de la production d'œufs.

Il y a eu peu de tentatives pour prédire l'impact économique sur les maladies transmises par les insectes de l'effet des immunisations.

La faisabilité pourrait être examinée au niveau de la population, en fournissant des analyses coûts-bénéfices. Ainsi le vaccin anti *Boophilus* pourrait avoir des effets très prononcés sur la population des tiques, alors qu'un vaccin anti-moustique n'ayant aucun effet direct pourrait théoriquement réduire la transmission de la malaria.

### 3.2. Intestin moyen comme site d'attaque immune

Le matériel intestinal est utilisé pour immuniser les hôtes des arthropodes hématophages. La question est comment la réaction immunologique dans l'intestin joue un rôle dans l'immunité acquise ?

Brown ( 1988 ) a remarqué que des anti-séra de lapins et de porcs réagissaient avec un nombre de polypeptides présent dans les glandes salivaires. Comme ces polypeptides ne sont pas présents naturellement dans les glandes salivaires, il suggère que les tiques ont du régurgiter du matériel intestinal durant les repas sanguins, ainsi il y a eu développement d'une réponse immune anti-intestin moyen. Ceci est une évidence d'une immunité acquise.

D'autres auteurs décrivent les dégâts causés sur les cellules intestinales, cytoplasme (pauvrement différencié), diminution de cellules digestives et sécrétrices et manque d'accommodation de l'intestin au repas sanguin de *Rhipicephalus appendiculatus* nourrie sur lapin et bovin immunisés.

Alger et al (1972), ont montré que le taux de mortalité, de moustiques (*Anophele stephensi*) nourris sur lapins immunisés avec des antigènes de l'intestin moyen, est plus élevé que celui des moustiques nourris sur lapins non immunisés ou lapins vaccinés avec tous les tissus de l'insecte. Akerman et al (1980), ont constaté que les effets sont faibles, sur des tiques s'alimentant sur des rats immunisés avec tous les extraits de l'arthropodes par rapport aux tiques nourries sur des rats immunisés avec les extraits d'intestin moyen seul.

Tous les auteurs s'accordent pour dire que l'intestin moyen peut être une cible d'attaque immune. Kemp et al (1986) montrent in vitro que les dégâts induits de l'intestin de tique nourrie sur source d'anti-*Boophilus* sont produits par une réaction immune dépendant du complément.

Cependant quelques observations montrent que la réaction d'un anticorps avec le matériel intestinal de l'insecte ou de la tique est une preuve insuffisante que l'intestin moyen est un site primaire d'une attaque immunologique.

### 3.3. Exemples de l'intestin moyen comme cible immunitaire

Des exemples spécifiques qui peuvent illustrer le rôle de l'intestin moyen comme cible immune sont actuellement très limités.

Certaines tentatives d'immunisation des animaux contre les arthropodes en utilisant des extraits d'intestin ont été réalisées sur des moustiques (Jacob et al, 1995), des glossines (Parker, 1979 ; Oteno et al, 1984 ; Godwin et al, 1984 ; Murray et al, 1985; Ellis et al, 1986 ; Desquesnes, 1990 ), *Stomoxys calcitrans* (Webster et al, 1992). Cependant il existe deux exemples pour lesquels des connaissances détaillées ont été fournies.

Ces deux exemples représentent des organisations différentes de l'intestin moyen et des fonction digestives.

La tique a un intestin moyen dominé par les cellules digestives. La plupart de la digestion se produit dans la cellule plutôt que dans la lumière. La tique pas de membrane péritrophique.

Tandis que chez *Lucilia cuprina*, la membrane péritrophique sépare les cellules de l'intestin moyen de la lumière intestinale.

Chez les arthropodes la digestion protéolytique active des repas sanguins et fluides se produit à travers une région définie de l'intestin moyen. Les produits digérés passent à travers la membrane péritrophique à l'intérieur de l'espace ectopéritrophique.

Ainsi comme réponse immunitaire, ces organismes représentent des situations différentes. Chez la tique, on pourrait suspecter que les anticorps ingérés et cellules de l'hôte restent dans l'intestin, un environnement propice, et il y aura libre accès aux cellules digestives.

### 3.3.1. Vaccination contre *Boophilus microplus*

Les recherches les plus importantes pour le développement d'un vaccin commercial contre *Boophilus* ont été réalisées depuis une dizaine d'années (Cobon et al, 1990; Tellam et al, 1992).

L'hypothèse est que des extraits bruts d'intestin d'une femelle de tique semi-gorgée pourraient être utilisés pour immuniser des bovins.

Les infestations ultérieures par les tiques sur des bovins immunisés sont très variables, mais l'immunité produite est souvent efficace. Willadsen et al (1996) observent que beaucoup de tiques, qui ont survécu après un repas sur bovin immunisé, montrent une coloration rouge due à la fuite des érythrocytes de l'hôte à travers un intestin ayant subi des dégâts immunologiques par la lyse des cellules digestives et la perméabilisation des lamina.

Les effets observés sont la réduction du nombre de tiques gorgées, la réduction du poids de femelles gorgées, la diminution de leur habilité leur ponte et de la viabilité des œufs pondus.

Les antigènes qui sont les cibles de la réponse immunologique ont été identifiés. Le premier antigène protecteur a été trouvé en 1986 et il est nommé Bm86. Après identification, la protéine a été séquencée et exprimée comme recombinant protéique chez *E. coli*.

Le vaccin est commercialisé sous le nom de "TickGARD" Il a été simultanément le premier vaccin contre les ectoparasites et le premier vaccin recombinant antiparasitaire à être fabriqué.

Bm86, bien que particulièrement efficace, n'est pas le seul antigène présent dans la tique. Un autre antigène a été identifié, de poids moléculaire plus élevé puis a été purifié et partiellement caractérisé par Lee et Opdebeeck (1991) et publié par Riding et al (1994); Il est nommé Bm91.

D'autres antigènes ont été identifiés et certains exprimés comme recombinant, cloné dans *E.col*, tel que le Bm95. C'est un antigène qui a des effets protecteurs contre les

infestations par les tiques sensibles au Bm86 mais aussi résistantes au Bm86 (Garcia-Garcia et al, 2000).

Ces auteurs suggèrent que le Bm95 peut être un antigène universel pour protéger les bovins contre les infestations par *Boophilus microplus*.

### **3.3.2. Vaccination contre *Lucilia cuprina***

C'est une mouche qui attaque les moutons en Australie, dont les larves, nourries sur moutons immunisés par les extraits de l'intestin et de membrane péritrophique, ont une croissance retardée, accompagnée d'une augmentation de la mortalité, les mêmes effets ont été observés sur larves nourries in vitro avec des sera issus de moutons immunisés (East et Eismann, 1993; East et al, 1993 ).

Deux protéines issues de la membrane péritrophique ont été isolées et purifiées. Elles sont nommées Péritriphin 44 et 95.

Cependant, d'après Willadsen et al (1996), le retard de croissance résultant de la vaccination est beaucoup plus important que celui observé après infestation naturelle. Il est clair aussi que le mécanisme effecteur est une réaction immunologique contre la membrane péritrophique de l'intestin moyen.

### **3.3.3. Vaccination contre les autres arthropodes**

Contrairement aux deux exemples ci-dessus, les connaissances de la vaccination contre les insectes hématophages restent très pauvres.

Après immunisation avec les différents tissus des insectes hématophages, les effets rencontrés sont souvent une augmentation de la mortalité, la diminution de la fécondité avec des résultats différents suivant les auteurs.

Webster *et al* (1992) en utilisant des différents tissus de *Stomoxys calcitrans* ont trouvé une mortalité plus élevée et une viabilité moindre des œufs dans le groupe d'insectes nourris sur lapins immunisés par les antigènes de l'intestin.

De même pour les glossines les résultats des différents auteurs sont contradictoires. Ainsi Desquesnes (1990) travaillant sur lapins immunisés par intestin moyen et jabot de glossines, n'a remarqué qu'une augmentation de la mortalité et aucun effet sur la fécondité des mouches nourries sur ces lapins. Alors que Godwin et al (1984) ont constaté une augmentation de la mortalité accompagnée d'une diminution de la fécondité de *Glossina morsitans morsitans* nourrie sur lapins immunisés par différents extraits d'organes de la mouche.

Ramasamy *et al* (1988) travaillant sur moustiques nourris sur lapins immunisés avec l'intestin moyen du même insecte ne remarquent que des effets sur la fécondité et aucune incidence sur la mortalité.

Peu de tentatives ont été faites pour caractériser les antigènes. Cependant Almeida (1994) a essayé d'identifier des protéines en utilisant des anticorps monoclonaux contre l'intestin moyen. Il isole deux protéines mAbG8 et mAb35.20 qui sont efficaces.

La protéine mAb35.2 est liée aux microvillosités de l'intestin moyen d'*Anophele stephensi*, alors que mAbG8 est localisée à la partie apicale des cellules épithéliales de l'intestin moyen.

Il n'y a pas eu d'études plus approfondies sur ces antigènes, mais ce résultat montre que des anticorps spécifiques contre des constituants l'intestin moyen peuvent affecter la longévité des moustiques.

Les succès de vaccination contre *Boophilus microplus*, *Haemonchus contortus* etc.. ont été obtenus par des méthodes de purification et identification des protéines. La nature de ces protéines a été décrite par plusieurs auteurs. Par exemple la protéine Bm91 de l'intestin de *Boophilus microplus* est une carboxydipeptidase, H11 de l'intestin d'*Haemonchus contortus* est une aminopeptidase membranaire et les péritrophin 44 et 95 de *Lucilia cuprina* sont des protéines de la membrane péritrophique.

# **DEUXIEME PARTIE :**

## **Matériels et méthodes**

## **1. Matériels**

### **1.1. Matériels techniques**

#### **1.1.1. Loupes :**

Elles sont binoculaires et nous ont permis de faire la dissection des mouches aussi bien pour la récolte d'organes que pour le contrôle de l'infection. Toute la partie dissection s'est déroulée dans la salle de parasitologie du CIRDES.

#### **1.1.2. Pincés DUMONT :**

elles sont très fines, elles sont utilisées pour l'extraction des organes digestifs des insectes hématophages. Ces pincés nous ont permis de récupérer le jabot et l'intestin moyen.

#### **1.1.3. Cryotubes :**

Ils ont été utilisés pour la récolte des organes isolés des mouches à savoir le jabot et l'intestin moyen. Ensuite les organes récoltés sont congelés avec les cryotubes.

#### **1.1.4. Microscopes**

Pour vérifier si les mouches sont infectées ou non, en cherchant les trypanosomes dans le proboscis et l'intestin moyen. Le grossissement 40 a été utilisé.

#### **1.1.5. Boîtes de pétri :**

La dissection s'est faite sur les boîtes de pétrie et sous la loupe.

#### **1.1.6. Plateau d'alimentation et membranes :**

Le plateau est recouvert d'une membrane en silicone et l'ensemble est utilisé pour alimenter les mouches de l'insectarium. Le sang est mis entre le plateau et le silicone, les mouches prennent leur repas sanguin à travers la membrane en silicone.

### **1.1.7. Bain marie et azote liquide**

Ils nous permis à la préparation de l'antigène, en passant d'une décongélation au bain-marie à recongélation à l'azote liquide. Cette procédure permet de casser les structures cellulaires et favorise une homogénéisation de la solution.

### **1.1.8. Sonificateur**

Le sonificateur permet de faire un broyage très fin des protéines contenues dans la solution sans détruire la structures des cellules. Et chaque fraction subit 6 passages au sonificateur à raison d'une minute par passage.

### **1.1.9. Potter**

Permet un broyage mécanique des protéines. Ce broyage facilite l'homogénéisation de la solution à préparer.

### **1.1.10. Cages**

Deux types de cages ont été utilisées, des cages de petite taille qui permettent de retenir les mouches pendant le repas sanguin et lors de leur entreposage dans l'insectarium. Une grande cage qui nous a permis de transporter les mouches de l'insectarium à l'étable et de l'étable à leur lieu d'entreposage. Ces cages ont une armature en fer et sont entourées de tulle (moutiquaire).

### **1.1.11. Pondoirs**

Ils nous ont servi à récolter les pupes produits par les mouches. Ils sont en armature métallique et ont une longueur de 50 cm environ sur 20 cm de largeur et 15 cm de profondeur.

## 1.2. Matériels biologiques

### **1.2.1. Mouches :**

Les mouches utilisées lors de l'expérience sont issues de l'insectarium du CIRDES. L'élevage de ces mouches est effectué dans des conditions optimales d'élevages de Glossines avec une température de 26°C et une humidité de 80%. Le détail de l'élevage de mouches tsétsés est décrit par Itard et Bauer ( 1985 ).

## Légende des photos

Photo 1: cages à mouches posées sur des pondoirs

Photo 2: séance de manipulation des mouches pour séparer les mâles des femelles

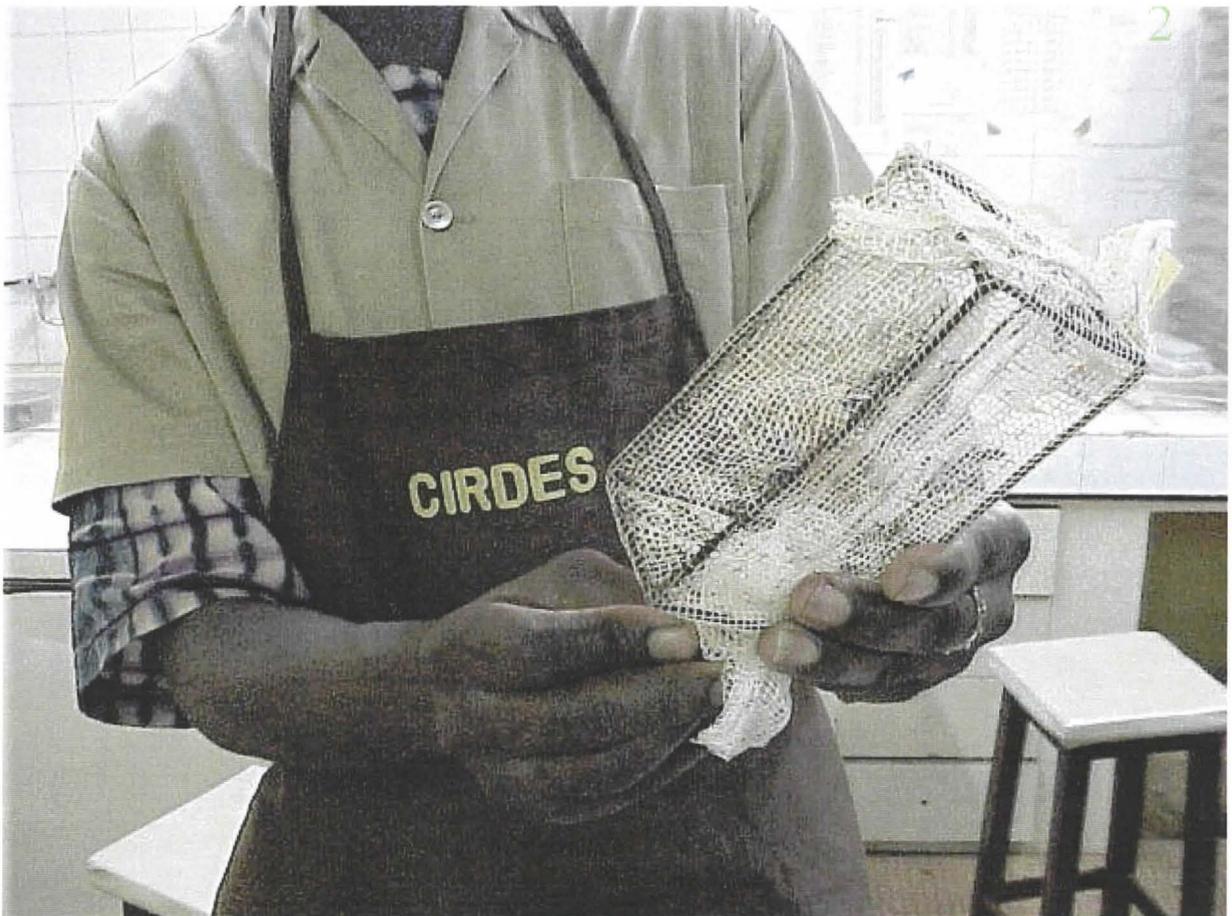
Photo 3: bovin d'expérience dans la cour de l'étable

Photo 4: pose de cages à mouches

Photo 5: contention de l'animal pour la pose de cages à mouches

Photo 6 et 8: pose des cages à mouches sur l'animal infecté par *Trypanosoma congolense*

Photo 7: retrait des cages pour vérifier le nombre de mouches gorgées







6



8



Dans cet insectarium sont élevées 150.000 mouches et ce nombre est maintenu constant en agissant sur l'éclosion de nouvelles mouches et l'élimination des plus vieilles mouches.

Ces mouches sont utilisées pour les différentes expériences faites sur la lutte contre la trypanosomose.

Dans l'insectarium, sont élevées trois espèces de mouches : *Glossina palpalis gambiense* (80%), *Glossina morsitans submorsitans* ( 6,67% ), et *Glossina tachinoides* (13,33% ).

Toutes les mouches dans cet insectarium sont nourries sur membrane, avec du sang de bovins récolté aux abattoirs de la ville de Bobodioulasso. Ce sang avant d'être donné aux glossines, est irradié pour éliminer tous les germes. Du glucose est rajouté aux sang lors des repas sanguins des mouches. Six à huit techniciens travaillent dans l'insectarium.

Pour réaliser l'expérience, ont été utilisés :

- Un lot de 1000 mouches (*Glossina palpalis gambiense*) prélevé pour la dissection en vue de récupérer le jabot et l'intestin moyen, dont 500 mouches ayant eu leur repas de sang depuis trois jours et 500 autres sont à jeun.
- Un lot de 500 mouches pour le challenge zéro, c'est à dire que les mouches sont nourries sur des bovins non immunisés, à raison de 125 mouches par animal.
- Un lot de 400 mouches réparti en 4 lots de 100 sont nourries sur bovins immunisés (3) et bovin témoin (1), c'est le challenge 1.
- Un lot de 200 mouches réparti en 4 cages de 50 nourri sur bovins immunisés ( 3 ) et bovin témoin ( 1 ). Le deuxième repas de ce lot a été effectué sur bovin infecté par trypanosome congolense, c'est le challenge 2.

### **1.2.2. Bovins**

Sur un lot de 20 bovins (achetés à la veille de mon arrivée), 4 ont été choisis après avoir testé leur sensibilité et effectué un contrôle sanitaire.

Les 4 bovins ont été utilisés aussi bien pour le lot zéro (c'est à dire des mouches nourries sur animaux non immunisés) qu'aux lots 1 et 2 correspondant aux animaux immunisés. Ces bovins sont élevés dans l'étable du CIRDES situé à une cinquantaine de mètre du centre. Deux personnes s'occupent de ces animaux. La nourriture des bovins est à base de paille, complétée par du tourteau d'arachide. Dans l'étable cohabitent bovins et petits ruminants.

## 2. Méthodes

### 2.1. Récolte des antigènes ( jabots et intestins moyens )

- ⇒ 1000 *palpalis gambiense* ont été dissequées pendant 10 jours pour isoler les jabots et les intestins moyens. L'ensemble a été réparti comme suit :
- ⇒ 500 intestin issus de mouches ayant digérées leur repas sanguin.
- ⇒ 500 intestins issus de mouches ténérales c'est à dire à jeun.
- ⇒ 1000 jabots issus de mouches ayant digérées leur repas et mouches ténérales.

La dissection s'est faite sous glace, et les organes récoltés sont trempés dans du PBS (phosphate-buffered saline) auquel on a ajouté des antienzymes pour éviter la digestion des organes.

Après chaque dissection, les produits récoltés sont congelés à  $-40^{\circ}\text{C}$  et les fractions ont été libellées comme suit : **IMP** (intestin moyen postprandial) ; **IMJ** (intestin moyen à jeun) ; **JJP** (jabot à jeun et postprandial).

### 2.2. Préparation des antigènes

Chaque fraction de 10ml est décongelée au bain marie à  $25^{\circ}\text{C}$ , puis étendue à 18ml, et placée dans une seringue de 20ml pour broyage par 20 passages successifs entre deux seringues. Ensuite, la solution est placée dans un cryotube pour subir cinq cycles de congélation-décongélation en azote liquide et bain-marie à  $25^{\circ}\text{C}$ . Puis, elle est exposée à la sonification six fois une minute sur glace. La solution récupérée est placée dans un potter pour broyage minutieux des organes.

0,5ml de la solution de chaque fraction sont prélevées pour le dosage protéique (JJP=2,5mg/ml ; IMJ=7,5mg/ml ; IMP=10,7mg/ml ).Les fractions sont ensuite aliquotées en trois aliquotes de 5ml et un de 2,5ml, le tout est congelé à  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Protocole expérimental

#### **2.3.1. Protocole de challenge zéro des mouches**

12 repas de sang de 500 mouches divisées en quatre lots ont été effectués sur quatre bovins à raison d'un repas tous les deux jours. Les mouches ont été suivies pendant un mois. Nous avons dénombré et pesé les pupes, puis contrôlé de la mortalité, enfin nous calculons la fécondité, l'éclosabilité et le taux de ponte.

Chaque lot de mouches est partagé en quatre cages de 25 mouches femelles. Chaque sous-lot de 4 cages est posé sur bovin pendant 5 à 10 mn.

Les mouches sont accouplées après leur premier repas en introduisant dans chaque cage 20 mouches mâles. Les lots de mouches sont dénommés comme suit : **JJP0 ; IMJ0 ; IMP0 ; T0**.

Ce protocole vise à vérifier que tous les bovins donnent des résultats comparables avant immunisation.

#### **2.3.2. Immunisation des animaux**

Trois injections ont été faites pour immuniser les bovins à J0, J20 et J30 dont la première a consisté à mélanger chaque fraction de 5ml de la préparation avec 5ml d'**ACF** et les deux autres injections, chaque fraction de 5ml a été mélangée à 5ml d'**AIF**.le bovin témoin reçoit 5ml **PBS** + 5ml **ACF** pour la première injection et 5ml **AIF** + 5 ml de **PBS** pour les deux autres injections.

**Tableau 1** : protocole expérimental

Injections	Fractions	Adjuvants
(Jour 1) 1	5ml IMP 5ml IMJ 5ml JJP 5ml PBS	5ml ACF 5ml ACF 5ml ACF 5ml ACF
(Jour 20) 2	5ml IMP 5ml IMJ 5ml JJP 5ml PBS	5ml AIF 5ml AIF 5ml AIF 5ml AIF
(Jour 30) 3	5ml IMP 5ml IMJ 5ml JJP 5ml PBS	5ml AIF 5ml AIF 5ml AIF 5ml AIF

**IMJ** : intestin moyen à jeun, **JJP** : jabot à jeun et postprandial, **IMP** : intestin moyen postprandial  
**ACF** : adjuvant complet de Freund, **AIF** : adjuvant incomplet de Freund

### 2.3.2.1. Protocole challenge 1 des mouches

12 repas de sang de 400 mouches réparties en 4 lots ont été effectués sur bovin à raison d'un repas tous les deux jours. Les lots sont dénommés comme suit : **IMP1 ; IMJ1 ; JJP1 ; T1**.

Chaque lot est composé de 4 cages de 25 mouches chacune. Après le premier repas, on a contrôlé le nombre de femelles gorgées et non gorgées.

L'accouplement a été effectué après le premier repas à raison de 20 mâles par cage. Le lot 1 a été suivi pendant un mois.

Chaque semaine, nous contrôlons la mortalité. Quinze jours après accouplement nous dénombrons les pupes et déterminons leur poids moyen, puis nous calculons le taux de ponte.

### 2.3.2.2. Protocole challenge 2 des mouches

12 repas de sang de 200 mouches divisées en 4 lots ont été effectués sur bovins immunisés (3) et témoin (1). Les lots sont dénommés comme suit : **IMP2 ; IMJ2 ; JJP2 ; T2**. Et chaque lot est divisé en sous-lot de 1 cage.

La durée du repas est de 5 à 10 mn. Après le premier repas, on a contrôlé le nombre de mouches gorgées et non gorgées. L'accouplement s'est fait après le premier repas sanguin.

Pour le lot 2, le deuxième repas a eu lieu sur bovin infecté par *Trypanosoma congolense serengeti* / 71/ STIB/ 212 (isolé sur Lion en 1971 en Tanzanie. La souche a subi 23 passages sur rat, puis clonée et subi 5 passages sur rat irradié. Le lot a été suivi pendant un mois. Chaque semaine, nous contrôlons la mortalité. Quinze jours après accouplement nous dénombrons les pupes et déterminons leur poids moyen, puis nous calculons l'éclosabilité, la fécondité et le taux de ponte.

### 2.4. Contrôle de l'infection des mouches

Les mouches infectées par les trypanosomes sont disséquées 20 jours après la prise de repas de sang sur un bovin infecté par *Trypanosoma congolense*.

Sous loupe binoculaire, les mouches sont disséquées dans quelques gouttes de PBS. Puis on récupère l'intestin moyen et le proboscis qui est séparé en labium, ladre et hypopharynx. Les organes récupérés sont posés entre lame et lamelle, et les trypanosomes sont recherchés au microscope.

### 2.5. Méthodes d'exploitation statistique des résultats

Pour analyser nos observations, les méthodes statistiques utilisées sont la comparaison de moyenne et le test de l'écart réduit (Schwartz, 1987).

#### **2.5.1. Comparaison de moyennes**

La comparaison entre deux moyennes  $m_A$  et  $m_B$  observées sur deux échantillons de  $n_A$  et  $n_B$  cas est donnée par :

$$\varepsilon = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\frac{S_A^2}{n_A} + \frac{S_B^2}{n_B}}}$$

où  $S^2$  désigne la variance,  $m$  la moyenne et  $n$  l'échantillon

Si  $\varepsilon < 1,96$  la différence n'est pas significative à 5%

Si  $\varepsilon > 1,96$  la différence est significative, et le risque correspondant à  $\varepsilon$ , lu dans la table de l'écart réduit, fixe le degré de signification.

### 2.5.2. Test de l'écart réduit

La comparaison entre deux pourcentages a été faite à l'aide de l'écart réduit dont la formule est :

$$\varepsilon = \frac{P_A - P_B}{\sqrt{\frac{P_A * Q_A}{n_A} + \frac{P_B * Q_B}{n_B}}}$$

$P_A$  et  $P_B$  pourcentages observés sur échantillons  $n_A$  et  $n_B$

Si  $\varepsilon < 1,96$  la différence n'est pas significative à 5%

Si  $\varepsilon > 1,96$  la différence est significative, et le risque correspondant à  $\varepsilon$ , lu dans la table de l'écart-réduit, fixe le degré de signification.

# **TROISIEME PARTIE :**

## **Résultats et discussion**

## 1. Résultats

La mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP** ( $p < 0,01$ ) est augmentée par rapport à celle des mouches nourries sur bovin témoin du lot 1.

Alors qu'il n'y a aucune différence significative de mortalité des mouches nourries sur bovins immunisés par **IMJ** et **JJP** par rapport à celle des mouches nourries sur bovin témoin du lot 1.

La mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP** présente une différence significative ( $p > 0,001$ ) par rapport à celle des mouches nourries sur même bovin (5248) du lot zéro non immunisé. Nous remarquons aussi une mortalité augmentée (35%) des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** (5255) par rapport à celle des mouches nourries sur bovin (5255) du lot zéro non immunisé, avec une différence significative ( $p < 0,02$ ).

Aucune différence significative de mortalité entre les mouches nourries sur bovin (402) du lot 1 et bovin immunisé par **JJP** (5257) par rapport à celle des mouches nourries respectivement sur bovins (402) et (5257) du lot zéro non immunisés.

La production de pupes par rapport au nombre de femelles vivantes, est significativement différente ( $p < 0,01$ ) entre les mouches nourries sur les bovins (5248, 5255, 5257) du lot zéro non immunisés et les mouches nourries sur bovins du lot 1 immunisés par **IMP** (5248), **IMJ** (5255) et **JJP** (5257). Alors que la production de pupes des mouches nourries sur bovin (402) du lot zéro non immunisé ne présente aucune différence significative par rapport à celle des mouches nourries sur bovin (402) témoin du lot 1 non immunisé.

Nous observons une diminution du nombre de pupes produits par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP** par rapport au nombre de pupes issus de mouches nourries sur bovin témoin du lot 1, avec une différence significative ( $p < 0,0001$ ). De même pour le bovin immunisé par **JJP** ( $p > 0,001$ ). Par contre aucune différence significative du nombre de pupes produits par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** par rapport à celui des mouches nourries sur bovin témoin du lot 1.

Le poids moyen des pupes produits par les mouches nourries sur bovins immunisés les différents extraits d'organes est inférieur à celui des pupes issus des mouches nourries sur bovins non immunisés du lot zéro et bovin témoin du lot 1, avec des différences significatives.

### 1.1. Mortalité

Tableau 2 : Mortalité observée de *Glossina palpalis* maintenue sur bovins non immunisés et bovins immunisés par intestin moyen et jabot.

N° bcle	Lot Zéro				Lot 1			
	402 (Témoin)	5257 (JJP0)	5255 (IMJ0)	5248 (IMP0)	402 (Témoin)	5257 (JJP1)	5255 (IMJ1)	5248 (IMP1)
Mortalité (%)	24	28	20,8	24,8	27	34	<b>35</b>	<b>45</b>

4 cages sont maintenues sur chaque bovin pendant 5 à 8 mn

en gras : des chiffres pour lesquels la différence est significative avec le lot témoin et bovin non immunisé.

Nous observons une augmentation de la mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP**, par rapport à celle des mouches nourries sur bovin témoin du lot 1, avec une différence significative ( $p < 0,01$ ). Nous remarquons aussi une mortalité augmentée des mouches nourries sur bovins immunisés par **JJP** et **IMJ**, par rapport à celle des mouches nourries sur bovin témoin du lot 1, mais sans différence significative.

Il y a une augmentation de la mortalité des mouches nourries sur bovin (5248) immunisé par **IMP**, avec une différence significative ( $p > 0,001$ ) par rapport à celle des mouches nourries sur même bovin (5248) non immunisé.

De même, il y a une mortalité augmentée des mouches nourries sur bovin (5255) immunisé par **IMJ**, avec une différence significative ( $p < 0,02$ ) par rapport à celle des mouches nourries sur même bovin (5255) non immunisé.

Bien qu'il y ait une légère différence de mortalité entre les mouches nourries sur bovins témoin (402) du lot 1 et sur bovin (5257) immunisé par **JJP**, par rapport celles des mouches nourries sur même bovins (402 et 5257) du lot zéro non immunisés. Par contre, nous ne remarquons pas une différence significative

**Tableau 3** : Mortalité des mouches nourries sur bovins immunisés (lot 2) et bovins non immunisés (lot zéro)

N° bcle	Lot Zéro				Lot 2			
	402 (Témoin)	5257 (JJP0)	5255 (IMJ0)	5248 (IMPO)	402 (Témoin)	5257 (JJP1)	5255 (IMJ1)	5248 (IMP1)
Mortalité en %tage	24	28,8	20,8	24,8	8	34	<b>50</b>	34

En gras : chiffres pour lequel il y a une différence significative

Il existe une différence significative entre la mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** (5255) du lot 2 et celle des mouches nourries sur même bovin (5255) du lot zéro non immunisé.

De même il existe une différence significative entre la mortalité des mouches nourries sur bovin (402) témoin du lot 2 et celle des mouches nourries sur bovin (402) du lot zéro. Alors qu'il n'y a aucune différence significative entre les mortalités des mouches nourries sur bovins (5257 et 5248) immunisés respectivement par **JJP**, **IMP** et celles des mouches nourries sur même mêmes bovins (5257 et 5248) du lot zéro non immunisés.

### 1.2. Taux de ponte

Défini comme le nombre de pupes pondue sur le nombre de mouches en ponte.

**Tableau 4** : Taux de ponte de *Glossina palpalis* maintenue sur bovin (lot zéro) non immunisés et bovins (lot 1) immunisés par intestin moyen et jabot

N° bcle	Lot Zéro				Lot 1			
	402 (Témoin)	5257 (JJP0)	5255 (IMJ0)	5248 (IMPO)	402 (Témoin)	5257 (JJP1)	5255 (IMJ1)	5248 (IMP1)
Taux ponte en %tage	39,3	39,4	54,3	34	32	<b>15</b>	<b>23</b>	<b>13</b>

En gras : chiffres pour lesquels il y a une différence significative du taux de ponte

Le nombre de pupes produites par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP**, est diminué de 62% par rapport au nombre de pupes produites par les mouches nourries sur ce même bovin (5248) non immunisé. Le taux de ponte avoisine 13% et présente une différence

significative ( $p > 0,0001$ ) par rapport à celui (34%) des mouches nourries sur bovin (5248) du lot zéro.

De même, le nombre de pupes issues des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ**, est diminué de 57% par rapport au nombre de pupes produites par les mouches nourries sur même bovin (5255) non immunisé, avec un taux de ponte (23%) qui présente une différence significative ( $p > 10^{-7}$ ) par rapport au taux de ponte (54,3%) des mouches nourries sur bovin (5255) du lot zéro.

Le nombre de pupes produites par les mouches nourries sur bovin immunisé par **JJP**, décroît de 62% par rapport à celui des pupes issues des mouches nourries sur même bovin (5257) non immunisé, avec un taux de ponte (15%) qui donne une différence significative ( $p > 10^{-5}$ ) par rapport au taux de ponte (39,4%) des mouches nourries sur bovin (5257) du lot zéro.

Les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP**, produisent un nombre de pupes sensiblement inférieur au nombre de pupes produites par les nourries sur bovin témoin du lot 1. Le taux de ponte (13%) présente une différence significative ( $p < 0,0001$ ) avec celui (32%) des mouches nourries sur bovin témoin.

Celles nourries sur bovin immunisé par **JJP**, présentent une situation similaire aux mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP**. Le nombre de pupes décroît de 51% par rapport au nombre de pupes produites par les mouches nourries sur bovin témoin. Le taux de ponte (15%) présente une différence significative ( $p > 0,001$ ) avec le taux de ponte (32%) des mouches nourries sur bovin témoin.

Par contre, le taux de ponte (23%) des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ**, bien qu'il soit légèrement diminué, ne présente aucune différence significative avec celui (32%) des mouches nourries sur bovin témoin.

**Tableau 5** : Taux de ponte mouches nourries sur bovins immunisés (lot 2) et non immunisés

N° bcle	Lot Zéro				Lot 2			
	402 (Témoin)	5257 (JJP0)	5255 (IMJ0)	5248 (IMPO)	402 (Témoin)	5257 (JJP1)	5255 (IMJ1)	5248 (IMP1)
Taux ponte en %tage	39,3	39,4	54,3	34	14,87	<b>7,12</b>	<b>3,75</b>	<b>4,87</b>

En gras : chiffres pour lesquels il y a une différence est significative

Il existe une différence significative entre le nombre de pupes produites par les mouches nourries sur bovins immunisés du lot 2 et celui des mouches nourries sur bovins du lot zéro non immunisés.

Ainsi le taux de ponte des mouches nourries sur bovin (5257) immunisé par **JJP** est significativement différent de celui des mouches nourries sur même bovin (5257) non immunisé. Cette différence est aussi significative entre le taux de ponte des mouches nourries sur bovin (5255) immunisé par **IMJ** et celui des mouches nourries sur même bovin (5255) non immunisé.

Nous observons aussi, une différence significative entre le taux de ponte des mouches nourries sur bovin (5248) immunisé par **IMP** et celui des mouches nourries sur même bovin (5248) non immunisé.

### 1.3. Poids moyen des pupes

**Tableau 6:** Poids moyen des pupes issues de mouches nourries sur bovins (lot zéro) non immunisés et bovins (lot 1) immunisés par intestin moyen et jabot.

N° bcle	Lot zéro				Lot 1			
	402 (Témoin 0)	5257 (JJP0)	5255 (IMJ0)	5248 (IMP0)	402 (Témoin 1)	5257 (JJP1)	5255 (IMJ1)	5248 (IMP1)
Poids moyen en mg	22,9	22,7	21,66	21,6	22,3	<b>20,64</b>	22,4	<b>18,83</b>

en gras : chiffres pour lesquels il y a une différence significative des poids moyens de pupes

Le poids moyen (18,83 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin (5248) immunisé par **IMP** est diminué sensiblement par rapport au poids moyen (21,60 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur même bovin (5248) non immunisé avec une différence significative  $p < 10^{-9}$

Les mouches nourries sur bovin (5257) immunisé par **JJP** produisent des pupes dont le poids moyen (20,64 mg) est inférieur à celui (22,40 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur même bovin (5257) non immunisé. La différence est significative ( $p < 10^{-9}$ ).

Par contre, le poids moyen (22,40 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin (5255) immunisé par **IMJ** ne présente aucune différence significative avec le poids moyen (21,66 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur même bovin (5255) du lot zéro non immunisé.

Paradoxalement, nous avons observé une différence significative ( $p > 0,01$ ) du poids moyen (22,3 mg) des pupes pondus par les mouches nourries sur bovin **T1**(402) témoin du lot 1 non immunisé avec celui (22,9 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin **T0** (402) du lot zéro non immunisé.

Nous avons observé une diminution du poids moyen (18,83 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP**, par rapport au poids moyen (22,3 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin témoin (**T1**). La différence est significative ( $p < 10^{-9}$ ).

De même, il y a une différence significative ( $p < 10^{-9}$ ) entre le poids moyen (20,64 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin immunisé par **JJP** avec le poids moyen (22,3 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin témoin (**T1**).

Par contre, nous n'avons observé aucune différence significative entre le poids moyen (22,4 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** et le poids moyen (22,3 mg) des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin témoin (**T1**).

**Tableau 7** : Poids moyen des pupes pondues par les mouches nourries sur bovins immunisés (lot 2) et non immunisés.

N° bcle	Lot zéro				Lot 2			
	402 (Témoin 0)	5257 (JJP0)	5255 (IMJ0)	5248 (IMPO)	402 (Témoin 1)	5257 (JJP1)	5255 (IMJ1)	5248 (IMP1)
Poids moyen en mg	22,9	22,7	21,66	21,6	21,56	<b>19,55</b>	<b>19,58</b>	<b>20,21</b>

En gras : chiffres pour lesquels il y a une différence significative

Il existe des différences significatives entre les poids moyens des pupes pondues par les mouches nourries sur bovins immunisés par **JJP** (5257), **IMJ** (5255), **IMP** (5248) et ceux des pupes pondues par les mouches nourries sur bovins (5257, 5255 et 5248) du lot zéro non immunisés.

#### 1.4. Taux d'infection

Nous avons effectué la dissection des mouches du lot 2. Ces mouches étaient infectées sur bovin. Ce bovin était infecté par *Trypanosoma congolense*, et lors de la prise du repas des mouches, il présentait un taux de parasitémie de 2/1 (540.000parasites/ml).

Aucune mouche n'était infectée aussi bien celles nourries sur bovin témoin que celles nourries sur bovins immunisés par **JJP**, **IMJ** et **IMP**.

## 2. Discussion

Dans notre présente expérience, nous avons observé une augmentation de la mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP** par rapport à la mortalité des mouches nourries sur même bovin (5248) avant immunisation. Elle est significativement différente ( $p > 0,001$ ). Cette mortalité présente aussi une différence significative ( $p < 0,01$ ) avec celle des mouches nourries sur bovin témoin du lot1. Nous observons une différence significative ( $p < 0,02$ ) de la mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ**, par rapport à celle des mouches nourries sur même bovin (5255) non immunisé. Tandis que la mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **JJP** est similaire à celle des mouches nourries aussi bien sur bovin témoin que sur même bovin (5257) du lot zéro non immunisé. Desquesnes (1990) a rapporté une augmentation de la mortalité de glossines (*Glossina palpalis*) nourries sur lapins immunisés par intestin moyen. Alger et al (1972) remarquent aussi une mortalité augmentée d'*Anophéle stephensi* nourries sur lapins immunisés avec des extraits d'intestin moyen. Schlein et al (1976) constatent une forte mortalité de *Stomoxys calcitrans* et *Glossina morsitans morsitans* nourries sur lapins immunisés avec des différents tissus de l'insecte.

Nous remarquons que la mortalité sensiblement augmentée ne concerne que les mouches nourries sur bovins immunisés par intestin moyen. Nous supposons que des anticorps anti-intestin moyen ont été produits par les bovins au cours de l'immunisation. Ces immunoglobulines ayant traversée la membrane péritrophique et échappées aux enzymes digestives, ont pu se fixer sur leur cible. Elles ont interféré avec le processus digestif de la mouche, parce que la plupart des glossines mortes présente une indigestion avec parfois rupture de l'intestin. En revanche aucune perturbation ou atteinte des organes digestifs n'a été observée sur les mouches nourries sur bovins du lot zéro et témoin.

La membrane péritrophique est considérée comme une barrière contre les molécules alimentaires. Miller *et al* (1990) ont constaté que cette membrane ne laissait passer que des particules dont le diamètre est inférieur à 9nm. Mais d'après nos résultats, on peut supposer que des anticorps anti-intestin moyen ont pu traversé cette barrière pour pouvoir interférer avec la digestion de la glossine, cette hypothèse rejoint l'observation de Allingham *et al* (1992), qui ont montré que des immunoglobulines G peuvent traverser la membrane péritrophique. De même, Lehane *et al* (1996), Good et al (1991) ont montré que les pores de la membrane péritrophique pouvaient mesurer de 53nm à 79,3nm, largement supérieur au diamètre des immunoglobulines. Aussi, nous pouvons supposer qu'il y a eu des anticorps qui ont eu pour cible la membrane péritrophique.

Il n'y a pas une différence significative entre la mortalité des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** et celle des mouches nourries sur bovin témoin. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les deux bovins n'ont pas présenté des résultats semblables lors du protocole challenge zéro. Néanmoins, nous avons observé que les bovins immunisés par **IMP** et **IMJ** ont eu les mêmes effets sur les mouches, c'est à dire dans les deux cas, il y a eu indigestion et rupture des organes digestifs.

Beaucoup d'auteurs ont rapporté une diminution du poids moyen de pupes produites par les mouches nourries sur lapins immunisés par des extraits bruts d'insectes. Nogge (1978) considère que le poids des pupes est un important paramètre pour la qualité de la reproduction. Les petites pupes vont donner des mouches de petites tailles et sont non viables.

Kaya *et al* (1982) ont observé une augmentation d'avortons collectés sur des mouches nourries sur lapins immunisés par des extraits de glandes salivaires, intestin et autres tissus de l'insecte. Dans notre investigation, nous avons observé une diminution sensible du poids moyen de pupes produites par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP** par rapport au poids moyen de pupes pondues par les mouches nourries sur bovin témoin et sur bovin (5248) du lot zéro non immunisé. De même pour les mouches nourries sur bovin immunisé par **JJP**.

Nogge (1982) a montré que l'élimination des symbiotes, par l'administration des antibiotiques réduisait la production des pupes et leur qualité. Et aussi l'élimination de *Wigglesworthia* entraînait une stérilité. Dans notre expérience, nous pouvons supposer que

des anticorps contre les protéines du symbiote ont été produits par les animaux immunisés, et ce phénomène pourrait être responsable de la diminution du poids des pupes. Dans tous les cas, il y a eu une diminution sensible du poids moyen des pupes produites par les mouches nourries sur bovin immunisés par rapport au poids moyen des pupes produites par les mouches nourries sur bovin témoin, et le mécanisme ne pourrait être expliqué qu'après d'autres investigations pour déterminer le mécanisme responsable. Par ailleurs, nous constatons que les mouches nourries sur bovins immunisés par **IMP** et **JJP** ont produit des pupes qui ont un faible poids. En rappelant que **IMP** et **JJP** sont composés d'organes issus de mouches ayant digéré leur repas sanguin.

Par contre aucune différence significative n'a été observée entre le poids moyen des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** et ceux des pupes pondues par les mouches nourries sur même bovin (5255) non immunisé du lot zéro et sur bovin témoin du lot 1. Et pourtant il est supposé que **IMJ** contient les mêmes composants que **IMP**.

Il existe une différence significative ( $p < 0,01$ ) du poids moyen des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin témoin du lot 1 et celui des pupes pondues par les mouches nourries sur bovin (402) témoin du lot zéro. Alors qu'il ne devrait pas y existé une différence significative, mais ce phénomène peut être du au fait que le bovin témoin du lot 1 n'est pas le même que le bovin témoin du lot zéro parce que ce dernier est mort au cours de l'expérience. et il a été remplacé par un autre bovin dont l'état n'a pas été comparé au premier bovin.

Après avoir nourris des moustiques (*Aedes aegypti*) sur des lapins immunisés par des extraits bruts de l'insecte, Sutherland *et al* (1974) ont remarqué une diminution du taux de ponte de 50%, mais le mécanisme n'a pas été déterminé. De même, Ramasamy *et al* (1988) ont observé une diminution de 50% le taux de ponte de moustiques nourris sur lapins immunisés par des extraits d'intestin moyen. Dans notre expérience, nous avons observé une diminution sensible du taux de ponte jusqu'à 62%, avec une différence significative ( $p < 0,0001$ ) du nombre de pupes pondues par les mouches nourries sur bovins immunisés par **IMP** et **JJP** par rapport au nombre de pupes issues de mouches nourries sur bovins (5248 et 5257) du lot zéro non immunisés.

Nous observons aussi une réduction du nombre de pupes produites par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP** par rapport au nombre de pupes pondues par les mouches nourries sur bovin témoin du lot 1 avec une différence significative ( $p < 0,0001$ ). De même, le nombre de pupes produites par les mouches nourries sur bovin immunisé par **JJP** est réduit par rapport au nombre de pupes issues de mouches nourries sur bovin témoin du lot 1 avec une différence significative ( $p > 0,001$ ).

Nos observations montrent aussi qu'il y a une réduction du taux de ponte des mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** par rapport au taux de ponte des mouches nourries sur bovin (5255) du lot zéro, avec une différence significative ( $p > 10^{-7}$ ). Alors qu'il n'existe aucune différence significative entre le nombre de pupes pondues par les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** et celui des pupes issues de mouches nourries sur bovin témoin du lot 1. Ce résultat montre une différence entre les mouches nourries sur bovins immunisés par **IMP** et **JJP** et mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ**. Nous pouvons supposer que les mouches ayant digéré leur repas ont soit un intestin fragilisé par les enzymes digestives, ou soit après digestion, il y a production de protéines qui ont favorisé l'atteinte des tissus cibles.

Considérant que les mouches nourries sur bovin immunisés ont produit un nombre de pupes sensiblement inférieur au nombre de pupes issues de mouches nourries sur bovins du challenge zéro non immunisés et sur bovin témoin du lot 1, avec des différences significatives. Nous pouvons supposer qu'il y a eu production d'anticorps ou autres cellules immunitaires qui ont interférer avec les différents tissus responsables de la production de pupes. Et d'après Brian *et al* (1994), le repas sanguin n'est pas seulement une source pour l'entrée des pathogènes, mais il peut déclencher une libération d'hormones neurosécrétrices qui sont nécessaires pour le développement des pupes. Par conséquent, il semble probable que le sang des bovins immunisés contient des anticorps ou autres cellules dirigés contre le développement des pupes, et ces derniers ont pu agir par l'intermédiaire des hormones neurosécrétrices.

Bien que le repas de sang des mouches tsé-tsé arrive directement dans la lumière intestinale, ainsi les enzymes digestives pourront détruire les anticorps et autres protéines contenus dans le sang. Par ailleurs, il a été observé par Lackie *et al* (1989), que les anticorps spécifiques détectés dans l'hémolymphe d'*Anophéle stéphensi* sont  $10^5$  fois moins nombreux

que ceux ingérés pendant le repas sanguin. D'après des observations faites sur des tiques (Brossard *et al*, 1984 .Ackerman *et al*, 1981), sur des mouches tsé-tsé (Nogge, 1982 et 1978). Il semble être évident que les immunoglobulines intactes peuvent atteindre des tissus internes cibles de l'arthropode.

Hatfield (1988) a trouvé des anticorps qui sont spécifiquement liés à l'épithélium intestinal d'*Aedes aegypti*, donc des cellules qui ont traversé la barrière digestive et membrane péritrophique. Des anticorps anti-abdomen de moustiques ont été décelés dans les oocytes 22 heures après gorgement et ces anticorps ont eu pour conséquence la diminution de la fécondité et faible viabilité des œufs. Des anticorps sont responsables de dommages causés aux organes internes de *Stomoxys calcitrans*. Nos observations sur la mortalité, le taux de ponte et poids moyen des pupes, nous pouvons concevoir que des composants immuns ont traversé la membrane péritrophique et échappé aux enzymes digestives pour pouvoir atteindre leur cible ou se sont attaqués à la membrane péritrophique, causant ainsi des dégâts aux organes internes de la mouche.

Nous n'avons pas trouvé une mouche infectée par le parasite. Selon Lambrecht (1980), les glossines sont réfractaires à l'infection si le premier repas était infectieux. Alors ce n'est pas le cas dans notre études où le premier repas a eu lieu sur bovins non infecté par le parasite. Cependant Kazadi *et al* (1999) ont trouvé que un ou deux repas même non infectieux diminue le taux d'infection méso-procyclique et métacyclique ainsi que la capacité vectorielle.

Les résultats que nous avons trouvé peuvent être expliqués soit par le fait qu'il existe une grande variabilité de la sensibilité entre les espèces de glossines nourries sur un bovin infecté et les différents nosodèmes de trypanosomes (Maudlin, 1991). Soit la faible parasitémie du bovin infecté et ayant servi à infecter les mouches pourrait expliquer également ce résultat.

# **CONCLUSION**

Pour l'instant, il n'existe pas de schéma décrivant le mécanisme d'action d'antigènes à base d'intestin moyen et jabot de glossines injectés à l'animal.

Les résultats d'immunisation de lapins et rats observés sont très variés. Même s'il a été établi que ces immunisations avaient quelques fois des impacts sur les mouches à savoir une augmentation de mortalité, une diminution du taux de ponte et fécondité mais les connaissances sur l'antigène responsables sont inconnus.

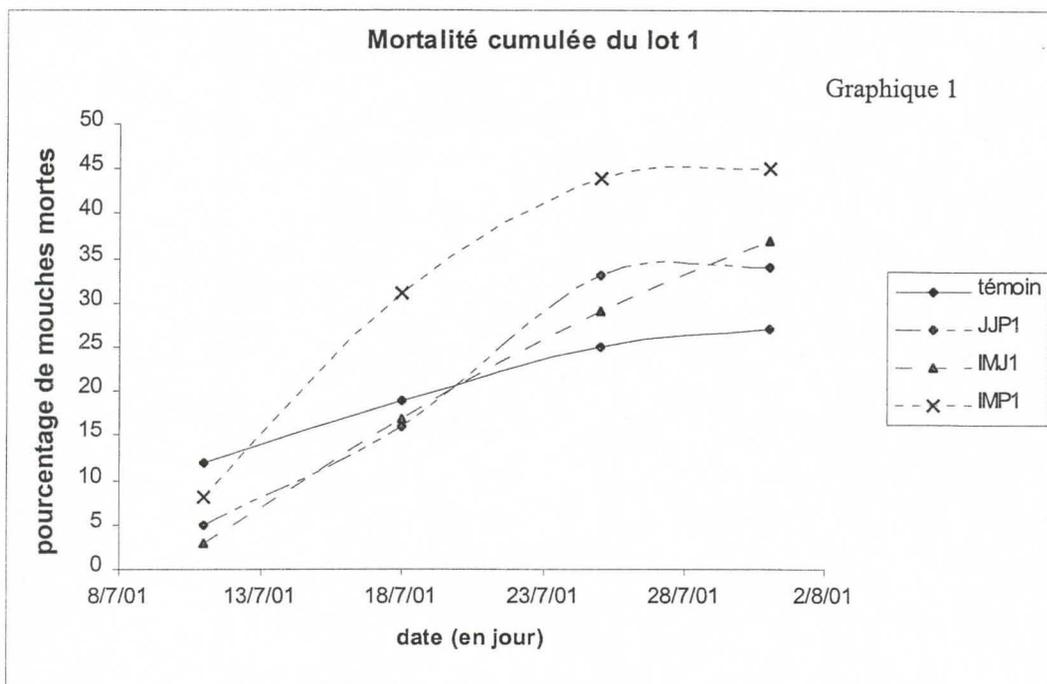
Comme le répertoire immunitaire des mammifères varie selon les espèces, dans notre étude, nous avons immunisé des bovins avec des **IMP**, **IMJ** et **JJP** avec des résultats encourageants.

Les mouches nourries sur bovins immunisés par **IMP** et **JJP** ont des taux de ponte très diminués et des poids de pupes faibles. Alors que les mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ** n'ont donné que des résultats peu différents de celles nourries sur bovin témoin

Tous les succès avec la tique de bétail (*Boophilus microplus*), *Haemonchus contortus* et *Lucilia cuprina* ont été obtenus après purification de protéines pour l'identification de l'antigène.

Il semble possible d'appliquer cette méthode d'immunisation aux mouches tsé-tsé comme celle utilisée contre la tique.

En attendant, d'autres investigations seront nécessaires pour pouvoir déterminer les antigènes cibles responsables de ces dommages chez la glossine.

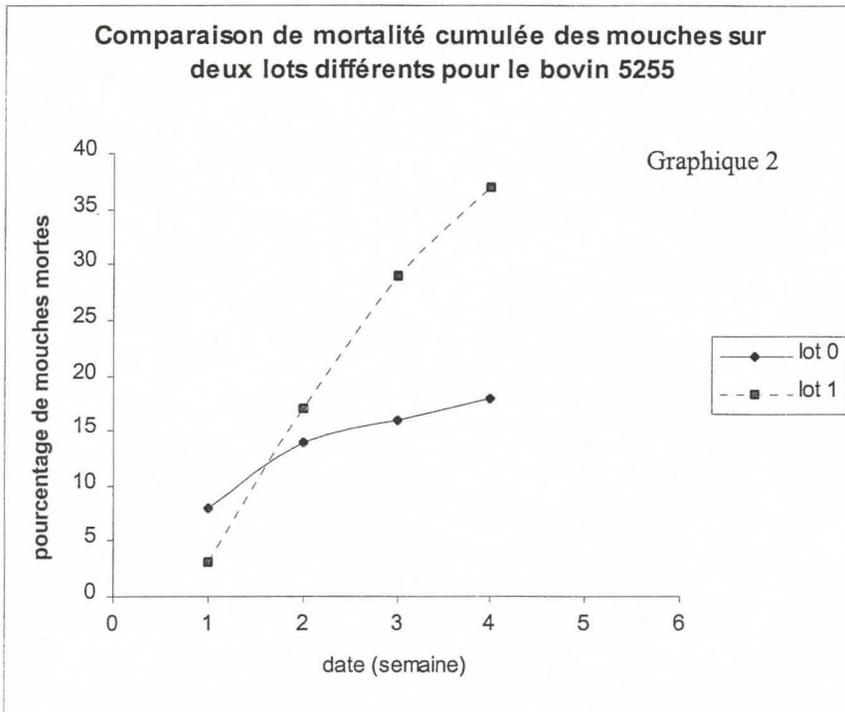


**Témoin** : bovin non immunisé

**JJP 1** : bovin immunisé par jabot à jeun et postprandiaux

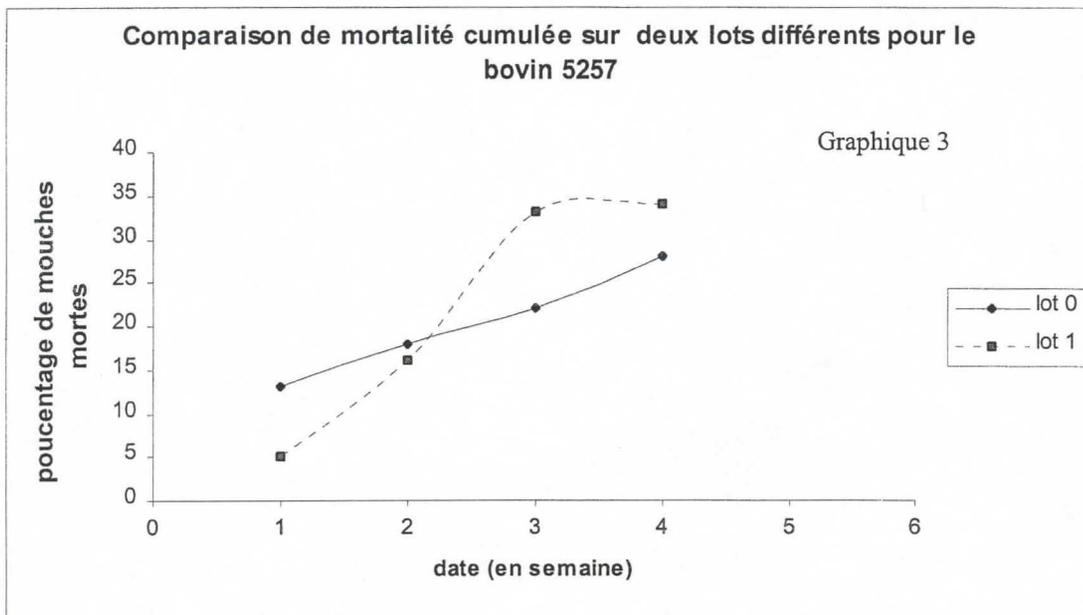
**IMJ 1** : bovin immunisé par intestin moyen à jeun

**IMP 1** : bovin immunisé par intestin moyen pstprandial



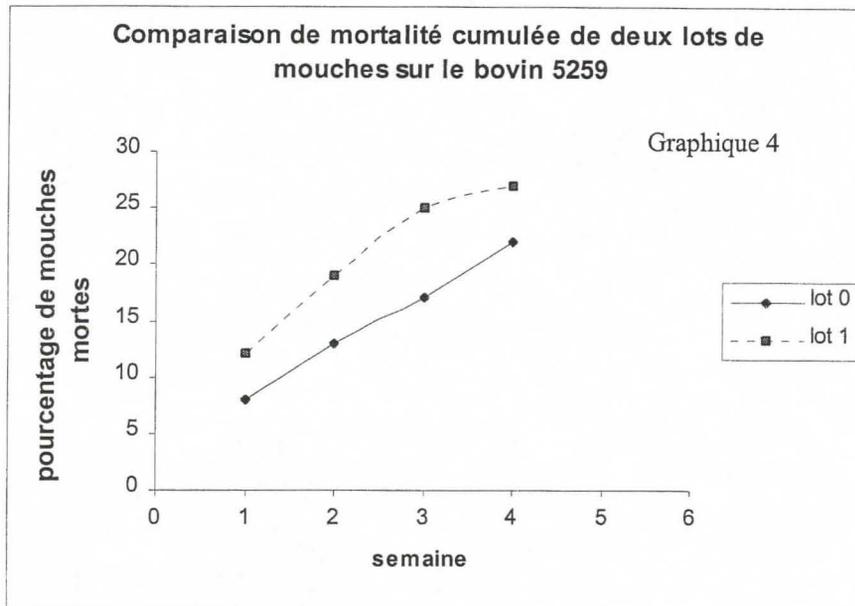
Lot zéro : mouches nourries sur bovin non immunisé

Lot 1 : mouches nourries sur bovin immunisé par **IMJ**

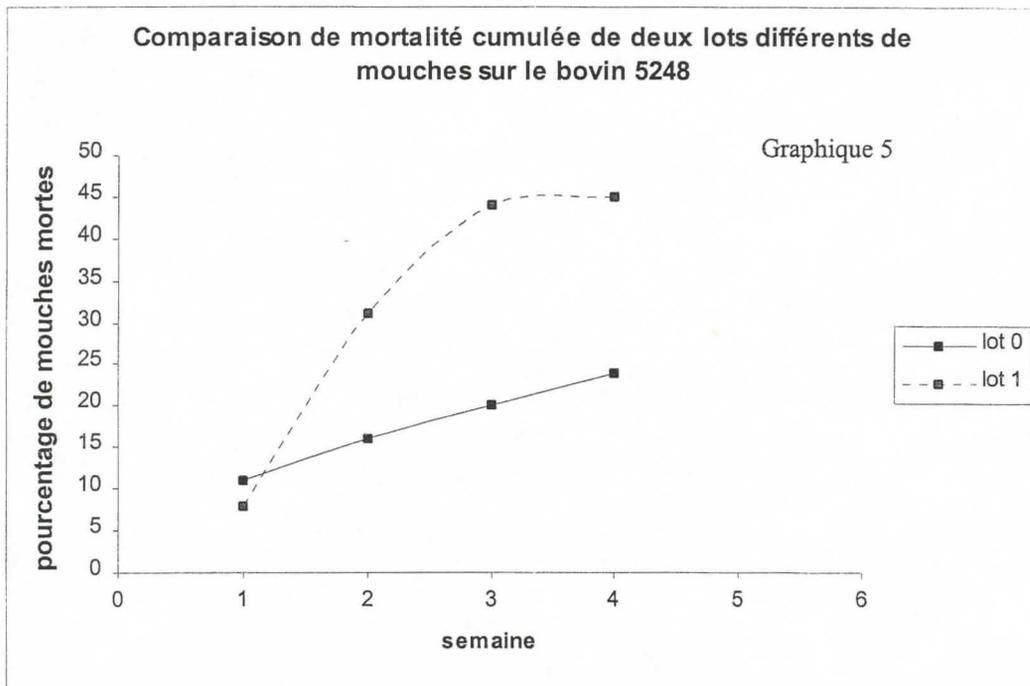


Lot zéro : mouches nourries sur bovin non immunisé

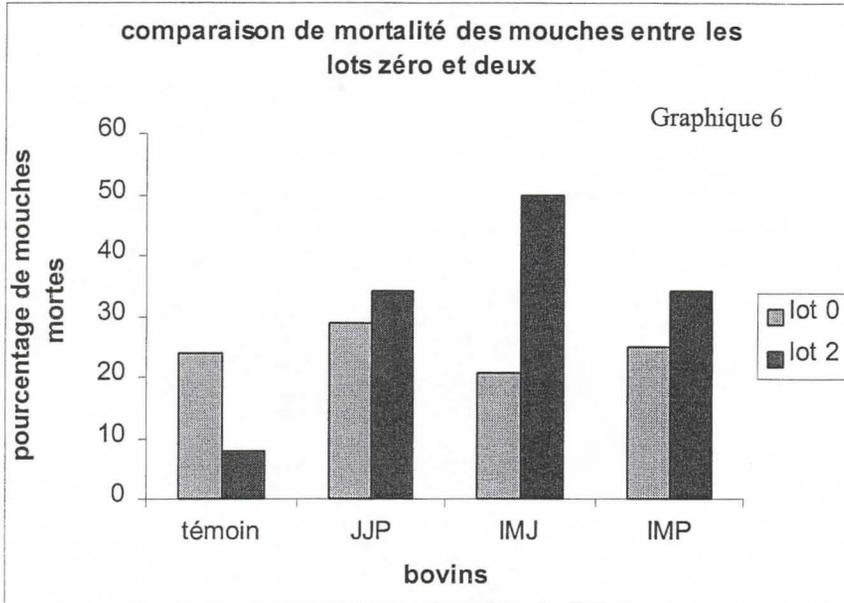
Lot 1 : mouches nourries sur bovin immunisé par **JJP**



Lot zéro : mouches nourries sur bovins non immunisé  
 Lot 1 : mouches nourries sur bovins témoin non immunisé

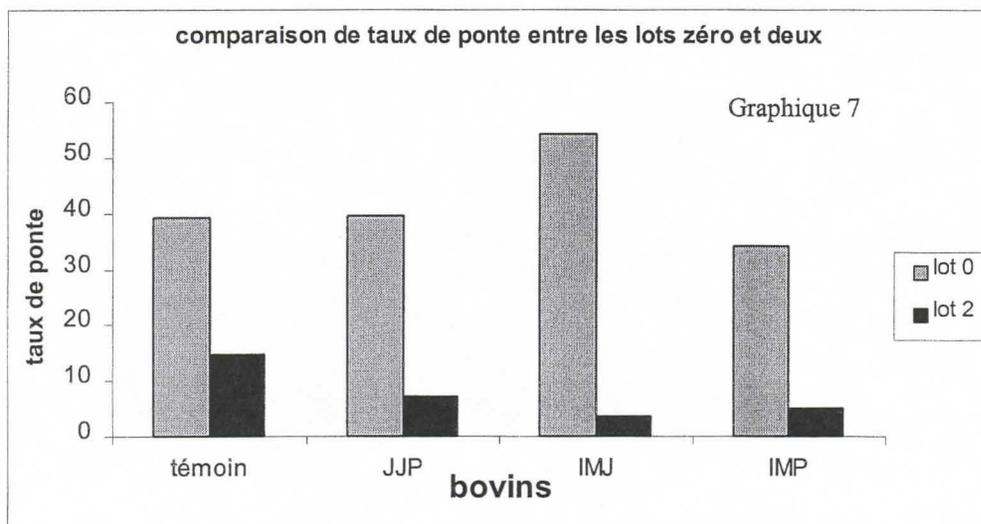


Lot zéro: mouches nourries sur bovin non immunisé  
 Lot 1: mouches nourries sur bovin immunisé par **IMP**



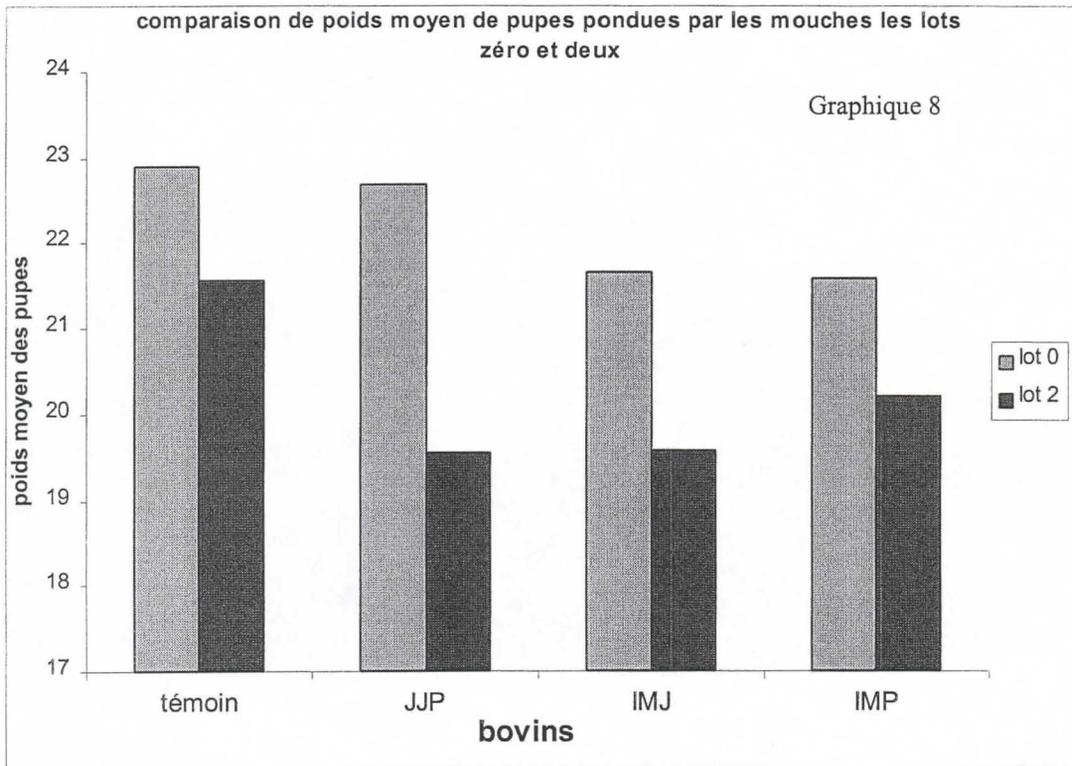
Lot zéro : bovins non immunisés

Lot 2 : bovins immunisés par **JJP**, **IMJ** et **IMP**



Lot zéro : bovins non immunisés

Lot 2 : bovins immunisés par **JJP**, **IMJ** et **IMP**



Lot zéro : bovins non immunisés

Lot 2 : bovins immunisés par **JJP**, **IMJ** et **IMP**

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Ackerman S, Brian CF, McGill TW and Sonenshine DE** (1981). Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*. *J. Parasitol* ; 67 : 737-740

**Ackerman S ; Floyd M and Sonenshine DE** ( 1980 ). Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* ( Acari : Ixodidae ) : vaccination using tick antigen. *Med. Entomol* ; 17 : 391-397.

**Aksoy S** ( 1995 ). Molecular analysis of the endosymbionts of tsetse flies : 16SrDNA locus and over expression of a chaperonin. *Insect. Mol. Biol* ; 4 : 23-29.

**Aksoy S** (2000). Tsetse : a Haven for microorganisms. *Parasitology. Today* ;16 :114-119.

**Aksoy S ; Chen X and Hypsa V** ( 1997 ). Phylogeny and potential transmission routes of midgut associated endosymbionts of tsetse ( Diptera : Glossinidae ). *Insect. Mol. Biol* ; 6 : 183-190.

**Aksoy S ; Maudlin I ; Dale C ; Robinson AS and O'Neill SL** ( 2001 ). Prospects for control of African trypanosomiasis by tsetse vector manipulation. *Trends in Parasitology* ; 17(1) : 29-35.

**Aksoy S ; Pourhosseini AA and Chow A** ( 1995 ). Mycetome endosymbionts of tsetse constitute a distinct lineage related to Enterobacteriaceae. *Insect. Mol. Biol* ; 4(1) : 15-22.

**Alger NE and Cabrera EJ** (1972). An increase in death rates *Anophele stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. *J. Econ. Entomol* ; 65 : 165-168.

**Allingham PG ; Kerlin RL ; Tellam RL et al** ( 1992 ). Passage of host immunoglobulin across the midgut epithelium into the haemolymph of blood fed buffalo flies *Haematobia irritans exigua*. *J. Insect. Physiol* ; 38 : 9-17.

**Almeida APG** ( 1994 ). Production and activity of antisera and monoclonal antibodies against the malaria vector *Anophele stephensi* . PhD thesis , University of london .

**Beard CB . Mason PW ; Tesh RB ; Aksoy S and Richards FF** ( 1992 ). Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in a chagas disease vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg* ; 46 : 195-200.

**Beard CB ; Dotson EM ; Pennington PM ; Eichler S ; Cordon Rosales C and Durvasula RV** ( 2000 ). Bacterial symbiosis and paratransmission control of vector-borne Chagas Disease. Third. Internet. Conference on salivarian trypanosomes other trypanosomatids pp 12. Center for Disease control and Prevention, Atlanta. Universidad del Valle de Guatemala. Yale University School of Medicine, New Haven

**Ben – yakir D ; Mumcuoglu KY ; Manor O et al** ( 1994 ). Immunization of rabbits with a midgut extract of the human body louse *Pediculus humanus humanus* : The effect of induced resistance on the louse population. *Med. Vet. Entomol* ; 8 : 114-118.

**Billingsley PF** ( 1994a ) . Approaches to vector control : new and trusted . 2 Molecular targets in the insect midgut. *Trans. R. Soc. Med. Hyg* ; 88 : 136-140.

**Brian H.K and David H.K** ( 1994 ) Vaccine against arthropods. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 50(6) ; 87-96.

**Brossard M and Rais O** (1984). Passage of hemolysins through the midgut épithélium of female of *Ixodes ricinus* L. fed on rabbits infested or reinfested with ticks. *Experientia* ; 40 : 561-563.

**Brown RP** ( 1980 ). Ultrastructure and fonction of midgut epithelium in the tsetse *Glossina morsitans* Westwood. (Dipteria = Glossinidae). *J. Ent. Soc. Sth. Afr* ; 43 : 195-214.

**Brown SJ** ( 1988 ). Evidence for regurgitation by *Amblyomma americanum*. *Vet. Parasitol* ; 28 : 335-342.

**Buchner P** ( 1965 ). Endosymbiosis of animals with Plant microorganisms. John Wiley and Sons, New york.

**Cheng Q and al** ( 2000 ). Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infection in tsetse flies, *Glossina* ssp. *Med. Vet. Entomol* ; 14 : 51-55.

**Cobon GS and Willadsen P** ( 1990 ). Vaccines to prevent cattle tick infestations , in New Generation vaccines ( eds Woodrow and Levin ) , Marcel Dekker, New york and Basil, pp 901-917.

**Dale C and Maudlin I** ( 1999 ). *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Int. J. Syst. Bacteriol* ; 49 : 267-275.

**Dale C and Welburn SC** ( 2000 ). The endosymbionts of tsetse flies : Manipulation Host-Parasites interaction. Third Internet Conference on Salivarian trypanosomes and other trypanosomatids. Pp 6. The Alexander Robertson Center for Tropical Veterinary Medecin , The University Edinburgh, Easter Bush Rostin, Midlothian ; U.K.EH259RG.

**Desquesnes M** ( 1990 ). Essai d'immunisation de lapins contre des tsétsés , *Glossina fuscipes fuscipes* ( Diptera : Glossinidae ). *Revue d'élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux* ; 4 : 511-513

**Duke HL** ( 1912 ). The transmission of *Trypanosoma nacrum* ( Laveran ). *Proc. Ray. Soc. B* ; 85 : 4-9.

**East IJ and Eismann CH** ( 1993 ). Vaccination against *Lucilia cuprina* : The causative agent of sheep blowfly strike . *Immunol. Cell. Biol* ; 71 : 453-462.

**East IJ ; Fitzgerald CJ ; Pearson RD et al** ( 1993 ). *Lucilia cuprina* inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic matrix . *Int. J. Parasitol* ; 23 : 221-229.

**Eberle MW and Mclean DL** ( 1982 ). Initiation and orientation of the symbionts migration in the human body louse *Pediculus humanus*. *J. Insect. Physiol* ; 28 :417-422.

**Eberle MW and Mclean DL** ( 1983 ). Observation of symbionts migration in human body lice with scanning and transmission electronic microscopy. *Can. J. Microbiol* ; 29 : 755-762.

**Eismann CH ; Johnson LAY ; Brodmeadow M et al** ( 1990 ). Acquired resistance of sheep to larvae of *Lucilia cuprina* , assessed in vivo and in vitro .*Int. J. Parasitol* ; 20 : 299-305.

**Ellis DS ;Young C ; Stamford S and Lehane MJ** ( 1981 ). Notes on midgut all nuclea coats in various tsetse species. *J. Trop. Med. Hyg* ;84 :209-214.

**Ellis JA ; Shapiro SZ ; Ole Moi-Yoi and Moloo SK** ( 1986 ) . Lesions and saliva specific antibody responses in rabbits with immediate and delayed hypersensitivity reactions to the bites of *Glossina morsitans centralis*. *Vet. Pathol* ; 23 : 661-667.

**Fraenkel G and Blewitt M** ( 1943 ). Intracellular symbionts of insect as a source of vitamine. *Nature* ; 152 : 506-507.

**Godwin PK and Alemut P** ( 1984 ). Futher observations on survival and fertility of *Glossina morsitans morsitans* maintained on immunized rabbits . 5 (5) : 443-446.

**Good NP, Shires M, Crellin DM and Davison AM** (1991). Detection of glomerular ionic sites in post-embedded ultra-thin sections using cationic colloidal gold. *J. Histochem. Cytochem* ; 39 : 965-972.

**Hatfield PR** ( 1988 ). Detection and localization of antibody ingested with a mosquito blood meal. *Med.Vet. Entomol* ;2 :339-345.

**Hatfield PR** ( 1988 ). Anti-mosquito antibodies and their effect on feeding, fecundity and mortality of *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol* ; 2 : 331-338

**Huebner E and Darey KG** ( 1974 ). Bacteroids in the ovaries of the tsetse fly. *Nature* ; 249 : 260-261.

**Ibrahima EAR , Ingram GA and Molyneux DH** ( 1984 ). Haemagglutinins and parasites agglutinins in haemolymph and gut of *Glossina*. *Trop. Med. Parasitol* ; 35 : 151-156.

**Ingram GA and Molyneux DH** ( 1988 ). Sugar specificity of of human ABO ( H ) blood groups erthrocyte agglutinin ( lectin ) and haemolytic activity in haemolymph and gut extracts of three *Glossina* species. *Insect. Biochemistry* ; 18 : 269-276.

**Ingram GA and Molyneux DH** ( 1990 ). Lectins ( haemagglutinin ) in the hemolymph of *Glossina fuscipes fuscipes* : isolation , partial characterisation , selected physiochemical properties and carbohydrate binding specificities . *Insect. Biochemistry* ; 20 : 13-27.

**Itard J** ( 1976 ). Les glossines. ,Maisons Alfort ; collection études et synthèses de l'IEMVT pp. 58.

**Itard J et Bauer B** (1985). Elevage des Glossines. Synthèse. Revue. Elev. Med. Vet. Pays trop ; 37 : 143-175.

**Jacobs H.J , Ashman K and Meeusen E** ( 1995 ) Humoral and cellular responses following local immunization with a surface antigen of the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus* . *Vet. Immunol. Immunopath* , 48 ; 323-332.

**Jenni L ; Bohringer S** ( 1976 ). Nuclea coat and virus like particle in the midgut epithelium of *Glossina morsitans* *sspp*. *Acta. Tropica* ; 33 : 380-389.

**Jose C. Garcia-Garcia ; Carlos M ; Miguel R ; Malagros V and al** ( 2000 ). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick , *Boophilus microplus* . *Vaccine* ; 18 : 2275-2287.

**Kaaya GP and Alemu P** (1982). Fécundity and survival of tsetse maintained on immunized rabbits. *Insect. Sci. Applic* ; 3 : 237-241.

**Kemp D.H , Pearson R.D , Gough J.M and Willadsen P** ( 1989 ) Vaccination against *Boophilus microplus* : Localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp. Appl. Acarol*, 7 ;43-58.

**Kemp D.H , Agbede R.I.S , Johnson L.A.Y and Gough J.M** ( 1986 ) Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks : feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *Int. J. Parasit*, 16(2) ; 115-120.

**Lackie AM and Gavin S** (1989). Uptake and persistence of ingested antibody in the mosquito *Anophèle stephensi*. *Med. Vet. Entomol* ; 3 : 225-230.

**Ladikpo L** (1989). Relation vecteur-parasite au cours du cycle de *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense* chez *Glossina morsitans morsitans*. Th. Doc. Université des Sciences et Technique du Languedoc. pp :144.

**Lee RP and Opdebeeck JP** (1991). Isolation of protective antigen from the gut of *Boophilus microplus* using monoclonal antibodies. *Immunolgy* ; 72 : 121-126.

**Lehane M.J , Allingham P.G and Weglicki P** (1996) Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly , *Glossina morsitans morsitans* . *Cell. Tissue. Res* , 238 ; 375-384.

**Ma WC and Denlinger DL** (1974). Secretory discharge and microflora of milk gland in tsetse flies. *Nature* ; 247 : 301-333.

**Malke H** (1964). Production of Aposymbiotic Cockroaches by means of lysozyme. *Nature* (London ), 204 : 1223-1224.

**Marshall AT** (1983). Microanalysis of the filter chambre of the cicada, *cyclochila australisia*. Don. A water shuting epithelial complex. *Cell. Tissue. Res* ; 231 :217-217.

**Maudlin I** (1991). Transmission of african trypanosomiasis : Interaction among tsetse immune system, symbionts and parasite. In *Advances in Desease Vector Research* (ed. KF. Harris ), Bringer, New York, pp 117-148.

- Maudlin I and Welburn SC** (1987). Lectin mediated establishment of midgut infections of *trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* in *Glossina morsitans*. *Trop. Med. Parasit* ; 8 : 16-21.
- Maudlin I and Welburn SC** (1988). Tsetse immunity and the transmission of trypanosomiasis. *Parasitology. Today* ; 4 : 109-111.
- Miller N and Lehan M.J** (1990). In vitro perfusion studies on the peritrophic membrane of tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* (Diptera, Glossinidae). *J. Insect. Physiol* ;38 :313-318
- Moloo SK ; Steiger RF ; Hecker H** (1970). Ultrastructure of the peritrophic membrane formation in *Glossina* Wiedmann. *Acta. Tropica* ; 27 : 379-383.
- Molyneux DH and Jefferies D** (1986) . Feeding behaviour of pathogen infected vector. *Insect. Sci. Applic*, 1 : 39-46.
- Murray M, Hirumi H and Moloo S.K** (1985) Suppression of *Trypanosoma congolense*, *T.vivax* and *T. brucei* infection rates in tsetse flies maintained on goats immunized with uncoated forms of trypanosomes grown in vitro.*Parasitology*, 91 ; 53-66.
- Nogge G** (1976). Sterility in tsetse fly (*Glossina morsitans* Westwood) caused loss of symbionts. *Experientia* ; 32 : 995-997.
- Nogge G** (1978). Aposymbiotic tsetse flies, *Glossina morsitans morsitans* obtained by feeding on rabbits immunized specifically with symbionts. *J. Insect. Physiol* ; 24 : 299-304.
- Nogge G** (1980). Elimination of symbionts of tsetse flies (*Glossina m. morsitans* Westwood) by help of specific antibody. In « Endocytobiology » (W. Schwemmler and H. Schenk, Eds) pp 445-452. Gruyter, Berlin.
- Nogge G** (1982). Experimentally induced antibodies to ectoparasites. *Forstchrites der Zoologie, Band 27. Immune reactions parasites. Zentrabl. Bakteriol (Suppl)* : 181-184
- Nogge G and Gerresheim A** (1982). Experiments on the elimination of symbionts from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans* ( Diptera : Glossinidae ), by antibiotics and lysozyme. *J. Invert. Pathol* ; 40 : 166-179.
- O'Neill SL and al** (1993). Phylogenetically distant symbiotic microorganisms reside in *Glossina* midgut and ovary tissu. *Med. Vet. Entomol* ; 7 : 377-383.
- Opdebeeck J.P** (1994) Vaccines against blood-sucking arthropods . *Vet.Parasit* , 54 ; 205-222.
- Otieno L.H, Vundla R.M.W and Mongi A** (1984) Observations on *Glossina morsitans morsitans* maintained on rabbits immunized with crude tsetse midgut proteases. *Insect. Sci. Applic*, 5(4) ; 297-302.

**Parker K.R** (1979) Serological responses in rabbits used to maintain uninfected , laboratory-reared tsetse (*Glossina morsitans morsitans* Westwood ) ( Diptera : Glossinidae). *Canadian J. Zoology*, 57 ( 4 ) ; 705-710..

**Pell ED and Southern DI** (1975). Symbionts in the female tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Experientia* ; 31 : 650-651.

**Pinnock DE and Hess RT** (1974). The occurrence of intracellulaire rickettsia-like-organisms in the tsetse flies , *Glossina morsitans*, *G. fuscipes*, *G. brevipalpalis*, *G. pallidipes*. *Acta. Tropica* ;31 :70-79.

**Ramasamy MS, Ramasamy S, kay BH and Kidson C** (1988). Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol* ; 2 : 87-93

**Reinhardt C ; Steiger R and Hecker H** (1972). Ultrastructural study of the midgut mycetome-bacteroids of the tsetse flies *Glossina morsitans*, *G.fuscipes* and *G. brevipalpalis* ( Diptera, Brachycera ). *Acta. Tropica* ; 29 : 280-288.

**Rudzinska MA, Spielman A, Lewengrub S, Piesman J and Karakshia S** (1982). The penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*. *Cell. Tissue. Res* ; 221 : 471-481.

**Schlein Y and Lewis C.T** (1976) Lesions in haematophagous flies feeding on rabbits immunized with fly tissues . *Physiol. Entomol* , 1 ; 55-59.

**Schwartz O** (1987). Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes. Flammarion, Paris : 318pp.

**Shaw MK and Moloo SK** (1991). Comparative study on Rickettsial-Like-Organisms in the midgut epithelial cells of different *Glossina* species. *Parasitology* ;102 : 193-199.

**Southwood TR** (1975). The micro-organisms of tsetse flies. *Acta. Tropica* ;32 : 259-266.

**Stiles JK ; Ingram GA ; Wallbank KR ; Molyneux DH ; Maudlin I and Welburn SC** (1990). Identification of midgut trypanolysin and trypanoagglutinin of *Glossina palpalis* spp. (Diptera : Glossinidae). *Parasitology* ; 101 : 369-376.

**Sutherland GB and Ewen AB** (1974). Fecundity decrease in mosquito ingesting blood from specifically sensitized mammals. *J. Insect. Physiol* ; 20 : 655-660.

**Terzakis JA** (1967). Structure in a epithelial basal lamina (basement membrane). *J. Cell. Biol* ; 35 :273-278

**Trager W** (1939). Further observation on acquired immunity to the tick *Dermacentor variabilis* Say. *J. Parasitol* ; 25 : 137-139.

**Vaughan JA ; Wirtz RA ; do Rosario VE and Azad AF** (1990). Quantitation of antiporozoite immunoglobulins in teh hemolymph of *Anophele stephensi* after blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg* ; 42 : 10-16.

**Webster K.A, Rankin M, Goddard D.W.T and Coles G.C** (1992) Immunological and feeding studies on antigens derived from the biting fly , *Stomoxys calcitrans* . *Vet. Parasit*, 44 ; 143-150.

**Welburn S.C , Maudlin I and Molyneux D.H** (1994) Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse . *Med.Vet.Entomol* , 8 ; 81-87.

**Welburn S.C and Maudlin I** (1999) Tsetse-Trypanosome Interactions : Rites of Passage . *Parasitology Today* , 15 ; 399-403.

**Welburn SC and Maudlin I** (1989). Lectin signalling of maturation *Trypanosoma congolense* infection in tsetse. *Med. Vet. Entomol* ; 3 :141-145.

**Welburn SC and Maudlin I** (1991). Rickettsia-Like-Organisms, puparial temperature and susceptibility trypanosoms infection in *Glossina morsitans morsitans*. *Parasitology* ; 102 : 201-206.

**Welburn SC ; Arnold K ; Maudlin I and Gooday GW** (1993). Rickettsia-Like-Organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. *Parasitology* ; 107

**Welburn SC ; Maudlin I and Ellis DS** (1987). In vitro cultivation of Rickettsia-Like-Organisms from *Glossina* spp. *Ann. Trop. Med. Parasitol* ; 81 : 331-335.

**Wigglesworth VB** (1929). Digestion in the tsetse fly : a study of structural and fonction. *Parasitology* ; 21 : 288-321.