Cirad-emvt
Campus de Baillarguet
TA 30
34398 MONTPELLIER Cedex 5

Université Montpellier II
UFR Sciences
Place Eugène Bataillon
34095 MONTPELLIER Cedex 5

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES

PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

Année universitaire 2001-2002

RAPPORT DE STAGE

Essai d'immunisation contre la trypanosomose de bovins Baoulés, métis et zébus à partir du candidat vaccin, la congopaïne

présenté par

Barbara DESCAMPS

RESUME

La prévalence de la trypanosomose bovine en Afrique tropicale et équatoriale constitue un frein majeur à la production animale dans ces régions. Les trypanosomes possèdent des systèmes complexes d'échappement aux défenses immunitaires de leurs hôtes. L'espoir de voir se développer un vaccin classique anti-trypanosome est aujourd'hui très limité par le phénomène de variation antigénique des glycoprotéines de surface de ces parasites. Le nouveau concept du vaccin anti-maladie, basé sur les mécanismes de la trypanotolérance, est aujourd'hui au premier plan de la lutte anti-trypanosomose menée par les équipes de chercheurs du CIRAD.

La principale différence observée entre des bovins trypanotolérants et trypanosensibles est une forte expression d'immunoglobulines G (IgG) spécifiques d'une cystéine protéase de *Trypanosoma congolense*, la congopaïne. Cette protéase est reconnue intervenir dans l'établissement de l'anémie et de l'immunosuppression, symptômes principaux de cette pathologie. L'inhibition de l'activité de la congopaïne par ces IgG spécifiques est supposée être à la base d'un des mécanismes de la trypanotolérance. On peut donc espérer obtenir un certain degré de tolérance à la trypanosomose en induisant chez les animaux sensibles une réponse immune adéquate contre la congopaïne.

Le projet INCO-CONGO réunit plusieurs équipes de chercheurs autour d'éventuelles implications des cystéines protéase de trypanosomes dans le domaine de la vaccination et du diagnostic de la trypanosomose. Des essais encourageants d'immunisation à la C2, protéine recombinante de la congopaïne, ont été mené à Nairobi, Kenya, en conditions contrôlées. Des essais d'immunisation de terrain sont programmés pour décembre 2002 dans la région de Bobo-Dioulasso sur un nombre conséquent de bovins et en conditions naturelles. Le choix de la race (Baoulés, zébus et métis sont les animaux présents dans la zone) à immuniser et du site à forte prévalence à *T. congolense* ont nécessité des études préliminaires exploratoires.

Plusieurs zones ont été prospectées afin d'en déterminer le niveau de pression parasitaire. Pour cela, des prélèvements et des analyses de sang de bovins ainsi que des dissections de mouches capturées ont été réalisés. La zone de Ouangolodougou semble actuellement présenter la plus forte pression parasitaire.

Un essai d'immunisation à la C2 a été mené sur dix animaux (deux Baoulés, deux zébus et six métis) afin de comparer les réponses IgG anti-congopaïne de chaque type d'animal. Les réponses immunes observées se sont révélées significativement différentes entre elles mais indépendamment du facteur race. L'hypothèse d'une hétérogénéité supérieure de la réponse immune des métis ne s'est pas vérifiée, les réponses immunes ont effectivement présenté des profils hétérogènes mais autant au niveau des trois types d'animaux. Le choix des métis comme race à immuniser semble être le plus judicieux puisque d'une part ils ne présentent pas, comme prévu, une hétérogénéité supérieure des réponses immunes à l'immunisation à la C2 compliquant les analyses de résultats et d'autre part, ils représentent la majorité du cheptel de la région.

Enfin, une épreuve d'infection a été réalisée sur un groupe de cinq métis immunisés à la C2 et cinq métis non immunisés. La parasitémie a rapidement présenté des fluctuations suivant les sérodèmes des bovins et l'hématocrite a chuté rapidement pour atteindre des valeurs inférieures à 20. L'immunisation n'a pas modifié l'évolution de la parasitémie et de l'hématocrite pendant la phase invasive observée. Cependant, la majorité des animaux a reçu un traitement trypanocide avant le quarante cinquième jour post-infection perturbant l'analyse de l'effet de l'immunisation à la C2 sur cette première période d'infection. L'étape suivante d'infection en conditions naturelles devra se baser sur les résultats de cette étude préliminaire en étable afin d'établir le suivi le plus efficace possible.

Mots clés : trypanosomose, trypanotolérance, Trypanosoma congolense,
cystéine protéase, congopaïne, immunisation, infection expérimentale, Baoulés, zébus, métis.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Marc DESQUESNES pour son accueil et ses conseils avisés tout au long de mon stage.

Je souhaite également remercier messieurs les Directeurs Général S.Gouro et scientifique D.Richard de m'avoir autorisée à profiter de la structure du CIRDES pour effectuer mon stage de DESS.

Un grand merci à l'ensemble des techniciens du laboratoire de sérologie sans qui tout ce travail n'aurait pu être possible.

Une pensée sincère pour tous ces amis « bobolais » sans qui mon séjour au Burkina aurait été moins intense.

Un profond remerciement à ma famille qui me soutient depuis toujours.

SOMMAIRE

Résumé et mots-clés
1

Remerciements
2

Introduction
5

1 . Généralités sur les trypanosomoses, la trypanotolérance et le concept vaccin anti-maladie **7**

1.1. Généralités sur les trypanosomoses
7

1.2 La trypanotolérance
9

1.3 Immunité et trypanosomes
10
1.3.1 Antigénicité des trypanosomes
10
1.3.2 Réponse immune de l'hôte
12
1.3.2.1 Immunité humorale comparée des bovins trypanosensibles et trypanotolérants
12
1.3.2.2 Identification des antigènes responsables de la réponse humorale spécifique des animaux trypanotolérants
12

1.4 Identification de la congopaïne et essais d'immunisation
13
1.4.1 Identification de la congopaïne
13
1.4.2 Essais d'immunisation avec deux protéines recombinantes de la congopaïne
15

2. Projet INCO-CONGO
17

2.1 Objectifs du projet
17

2.2 Partenaires du projet
17

2.3 Rôles respectifs de chaque partenaire
17

2.4 Les activités du CIRDES
18
2.4.1 Contribution à l'étude du génome, au polymorphisme et à la diversité
18
génétique des cystéines protéases
2.4.2 Contribution à la mise au point de tests sérologiques pour le
18
diagnostic des trypanosomoses
2.4.3 Impact de l'immunisation à la congopaïne sur du bétail placé sous
19
challenge trypanosomien naturel

3. Choix du site pour les essais d'immunisation sur le terrain
20

3.1 Matériel et méthode
20

3.2 Résultats
21

3.3 Discussion
23

4. Evaluation de la réponse immune chez des zébus, métis et Baoulés
24

4.1 Matériel et méthode
25
4.1.1 Choix des animaux
25
4.1.2 Choix de la protéine immunisante
26
4.1.3 Protocole d'immunisation
26
4.1.4 Suivi des animaux
27
4.1.5 Méthode d'analyse des résultats
28
4.2 Résultats
29
4.2.1 Résultats préliminaires des essais sur le test ELISA C2
29
4.2.2 Suivi des réponses immunes
31
4.2.2.1 Première visualisation des résultats
31

Koflandé
Terkoura
Ouangolodougou

4.2.2.2 Analyse des variances et covariances des données
32
4.2.2.3 Distinction de deux groupes répondant différemment à l'immunisation
33
4.2.3 Suivi de l'hématocrite et du poids
33
4.2.4 Réactions locales au point d'injection
34

4.3 Discussion
34

5. Epreuve d'infection et suivi post-infection des animaux parasités
36

5.1 Matériel et méthode
36

5.2 Résultat
36
5.2.1 Suivi de la parasitémie
36
5.2.2 Suivi de l'hématocrite
38

5.3 Discussion
39

Conclusion
40
Bibliographie
41
Annexes
43

INTRODUCTION

La trypanosomose bovine est un obstacle majeur à l'élevage du bétail dans la plupart des pays intertropicaux africains où sont réparties les glossines, vecteurs du parasite responsable, le trypanosome. La forme chronique de la maladie est la plus courante et se manifeste chez les bovins par une anémie, une perte de poids, une perturbation des fonctions de reproduction et une sensibilité accrue aux affections intercurrentes, en relation avec une immunosuppression quasi systématique.

Les difficultés de la lutte anti-vectorielle (11), l'apparition et la progression rapide des résistances aux traitements trypanocides et la mise en échec des essais de vaccination conventionnelle par les phénomènes de variation antigénique des glycoprotéines de surface du parasite sont autant de facteurs qui ont permis au concept du vaccin anti-maladie de se développer (1). Certains animaux, dits trypanotolérants, présentent effectivement une capacité relative à contrôler leur parasitémie ainsi que l'anémie associée. La principale différence observée entre les animaux trypanotolérants et trypanosensibles durant l'infection est une expression d'immunoglobulines G spécifiques, identifiées comme des IgG anti-congopaïne (12). Cette molécule est une cystéine protéase de *Trypanosoma congolense* intervenant probablement dans le turn-over des protéines parasitaires et chez l'hôte, dans l'établissement de l'anémie et de l'immunosuppression (2). Reproduire cette réponse immune particulière permettrait d'induire ou de renforcer une résistance à la trypanosomose chez les bovins et ainsi de permettre l'élevage bovin dans des zones jusqu'alors peu ou pas exploitées.

De nombreux travaux autour de la congopaïne et des autres cystéines protéases des trypanosomes sont menés par différentes équipes de recherche rassemblées par un vaste programme, le projet INCO-CONGO. Celui-ci a pour but d'améliorer la productivité des ruminants en Afrique sub-sahélienne en luttant contre la trypanosomose et plus particulièrement en développant les connaissances et utilisations possibles de facteurs parasitaires telles que les cystéine protéases. Un volet de ce projet est consacré à l'éventuelle efficacité du nouveau candidat vaccin, la C2, protéine recombinante de la congopaïne. Des essais d'immunisation encourageants ont déjà été menés en conditions contrôlées et sur un nombre restreint d'animaux par une des équipes à Nairobi, Kenya (7). L'étape suivante est une immunisation à la C2 sur le terrain afin d'évaluer la réelle efficacité du candidat vaccin en conditions naturelles. Cet essai est prévu pour décembre 2002 et sera mené par l'équipe du CIRDES (Centre International de Recherche pour le Développement de l'Elevage en zone Sub-humide), dans une zone choisie près de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

Trois types d'animaux sont présents dans la zone de travail finale : des Baoulés trypanotolérants, des animaux métis et des zébus trypanosensibles. L'hypothèse suivante a été avancée : les Baoulés seraient supposés mieux répondre à l'immunisation que les zébus et les métis présenter des réponses immunes hétérogènes. Une étude préliminaire s'est alors avérée nécessaire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse et aider dans le choix de la race à retenir pour l'expérimentation de terrain. Mon stage a donc eu pour principal objet d'immuniser des représentants de ces trois classes d'animaux dans le but de comparer leurs réponses immunes afin d'éclaircir les éléments hypothétiques précités. Puis, une épreuve

d'infection en étable à *Trypanosoma congolense* a été organisée afin d'évaluer l'efficacité de l'immunisation en cours.

Après quelques rappels sur la trypanosomose bovine et la trypanotolérance, la première partie de ce document introduit la notion du vaccin anti-maladie ainsi que le candidat vaccin, la protéine C2.

La seconde partie présente rapidement la structure, les objectifs et les activités du projet INCO-CONGO dans lequel s'est inscrit mon stage.

Les parties suivantes se rapportent aux différents aspects de l'étude préliminaire nécessaire à la mise en place des essais d'immunisation sur le terrain avec tout d'abord la démarche suivie pour le choix du site à forte prévalence à *Trypanosoma congolense*, puis les essais d'immunisation en étable et enfin l'évaluation de l'efficacité de l'immunisation.

Cette étude a été réalisée au cours d'un stage d'avril à août 2002, au sein du CIRDES, institut partenaire du CIRAD au Burkina Faso, Bobo-Dioulasso.

1. Généralités sur les trypanosomoses, la trypanotolérance et le concept vaccin anti-maladie

1.1 Généralités sur les trypanosomoses

Les trypanosomoses humaines et animales sont des parasitoses dues à des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma.* Elles sévissent en Amérique latine, avec *T. cruzi,* responsable de la maladie de Chagas qui touche 20 millions de personnes, et en Afrique où ils provoquent la maladie du sommeil chez l'homme et le Nagana chez les animaux de production. Les trypanosomes africains sont essentiellement des parasites intra-vasculaires et extra-cellulaires mais peuvent avoir un tropisme plus large que le sang (système nerveux, cavités articulaires,…).

Plus communément appelée maladie du sommeil, la trypanosomose humaine africaine est largement répandue sur la zone intertropicale du continent africain et est principalement due à *T. brucei gambiense* (Afrique de l'Ouest) et *T. brucei rhodesiense* (Afrique de l'Est). Les principaux agents pathogènes des trypanosomoses animales sont représentés par *T. congolense, T. vivax* et *T. brucei brucei. T. congolense* demeure le premier responsable des trypanosomoses bovines, *T. vivax* présente un pouvoir pathogène variable et *T. brucei brucei* ne devient préoccupant que lors d'infection mixte (17).

La figure 1 indique les aires de répartition des bovins et des glossines sur le continent africain. L'élevage bovin est rapidement limité par la présence des glossines, ainsi toute une partie de l'Afrique équatoriale ne présente aucune activité d'élevage malgré des conditions climatiques favorables. Cinquante millions de bovins demeurent exposés à l'infection au niveau des marges de l'aire de répartition des glossines. La présence de cette pathologie limite non seulement l'exploitation de zones pourtant favorables (Afrique équatoriale) mais en plus entrave largement la productivité des bovins dans les aires exploitées. La mortalité et la morbidité des animaux atteints (amaigrissement, retard de croissance, avortement,…) ainsi que le coût des opérations de dépistage et de traitement sont autant de pertes directement imputables à la trypanosomose. Enfin, les effets indirects sur l'alimentation humaine (déficit en production de lait et de viande) et sur l'agriculture (faiblesse du bétail de trait, fumier insuffisant,…) alourdissent encore l'impact économique de cette pathologie.

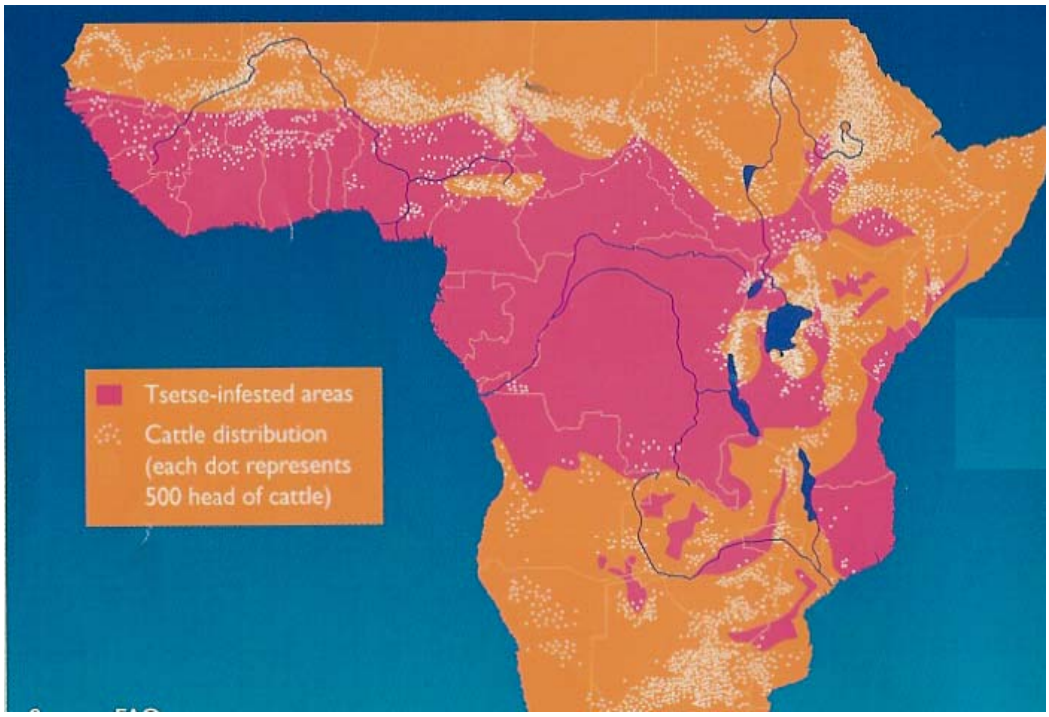


Figure 1 : Aire de répartition des glossines et des bovins sur le continent africain

La transmission des trypanosomes à l'hôte définitif est réalisée généralement par un insecte hématophage (figure 2). Celui-ci peut être un simple vecteur mécanique (tabanides, stomoxes,…) mais le plus souvent la transmission passe par un vecteur biologique (telle la glossine) chez lequel le parasite accomplit une évolution cyclique plus ou moins complexe de différentiation - multiplication avant d'être injecté à l'hôte définitif (11). Par exemple après ingestion par la glossine, *T. congolense* se dédifférencie en forme procyclique non infectieuse dans l'intestin de l'insecte puis migre au niveau des pièces buccales, où il se différencie en formes épimastigotes à multiplication active. Au terme de cette phase multiplicative, une dernière transformation le conduit à la forme métacyclique infectieuse. Ces formes sont ensuite inoculées à l'hôte définitif, avec la salive, au cours d'un repas sanguin de la glossine. La répartition de la trypanosomose suit ainsi celle de ses vecteurs.

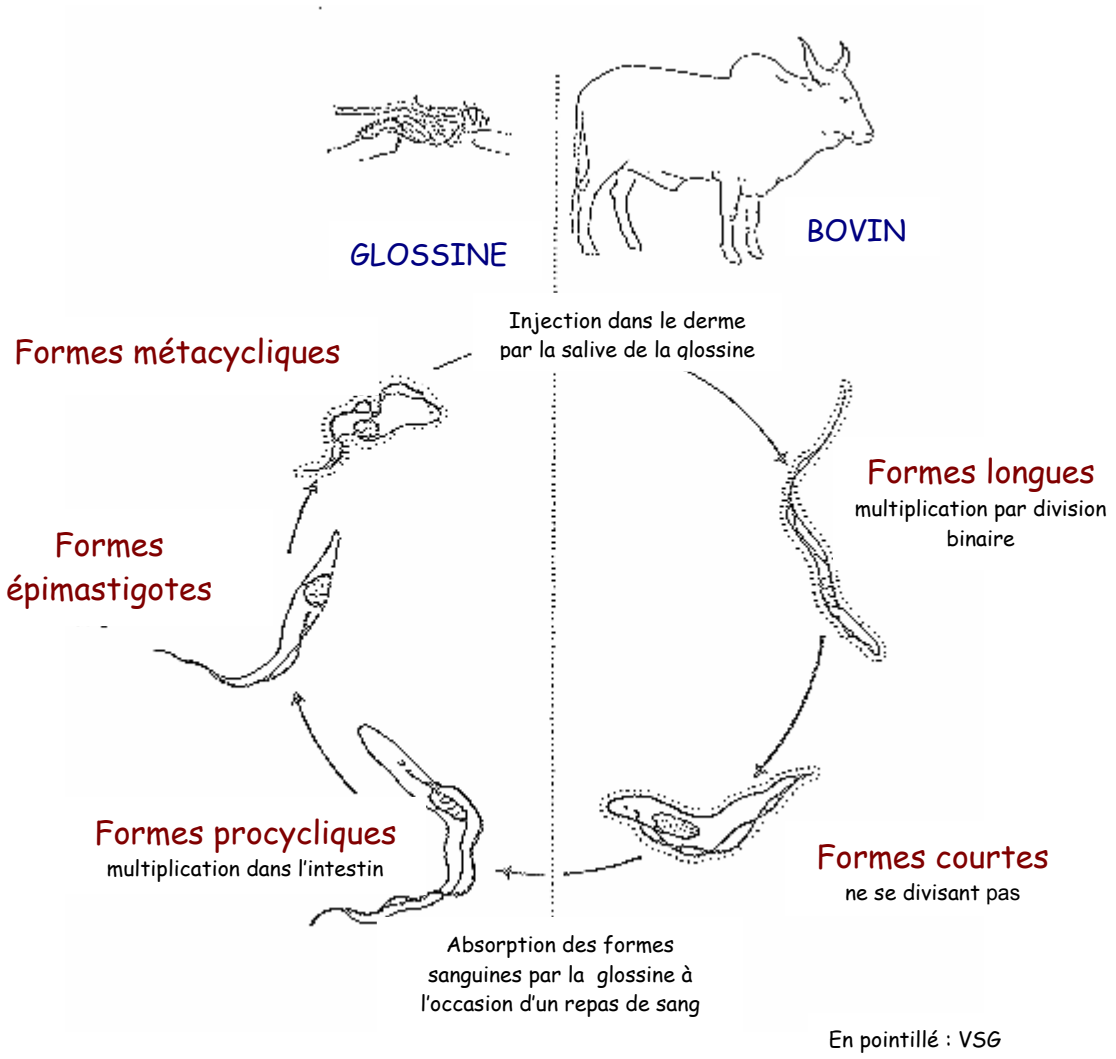


Figure 2 : Le cycle parasitaire de la trypanosomose bovine
D'après E.Authié, 1993

La gravité de l'infection est variable selon le nombre de trypanosomes infectants, l'hôte et la pathogénicité de la souche. L'évolution peut aller de quelques jours (forme aiguë) à plusieurs mois. La forme chronique avec parasitémie intermittente est la plus fréquente chez les bovins africains. Les symptômes débutent avec une phase d'hyperthermie correspondant au premier pic de parasitémie. Puis l'animal montre un amaigrissement rapide, un certain abattement et une anémie, d'abord régénérative puis arégénérative (22). A ce stade, l'animal répond très mal au traitement trypanocide (32). Le tableau clinique est souvent complété par une baisse générale des productions, une cachexie et enfin la mort à plus ou moins long terme.

En ce qui concerne l'hôte, la gravité de la pathologie varie selon des facteurs individuels tels que l'état général, le statut physiologique, l'alimentation, l'atteinte par d'autres pathologies… Outre ces facteurs, certains bovins semblent présenter une plus grande résistance à la trypanosomose : les animaux trypanotolérants.

1.2 La trypanotolérance

La trypanotolérance est définie comme l'aptitude présentée par certaines races bovines à vivre et à produire dans des zones infestées par des glossines (29). Cette propriété se trouve essentiellement chez les taurins sans bosse et de petite taille (*Bos taurus* – figure 3) alors que les zébus à bosse (*Bos indicus*) sont généralement très sensibles à la trypanosomose. L'ensemble de ces races trypanotolérantes ne représente que 5% du cheptel bovin total et même dans les zones infestées, les éleveurs préfèrent les zébus pour leur format et pour leur apparente plus grande productivité. Des populations de bovins métis (produit du croisement trypanosensible * trypanotolérant) présentent des degrés de trypanotolérance intermédiaires et comptent pour 30% du cheptel trypanotolérant. Un métissage excessif entre les animaux sensibles et tolérants pourrait mettre en péril ce phénomène de résistance.

Cliché D.Belemsaga

Figure 3: Bovins trypanotolérants de race N'Dama (à gauche) et Baoulé (à droite) Cliché M.Desquesnes

Une meilleure aptitude à limiter l'ampleur et la fréquence des parasitémies, associée à un meilleur contrôle de l'anémie et une sensibilité réduite aux effets pathogènes des

trypanosomes semble caractériser les individus trypanotolérants lors de réinfections (22,18). La trypanotolérance est beaucoup moins nette lors de primo-infection.

Comprendre les mécanismes de la trypanotolérance est devenu un véritable enjeu dans la recherche de nouvelles voies de lutte contre la trypanosomose (1). Ainsi, la trypanotolérance est probablement un phénomène à déterminisme multifactoriel complexe qui semble appeler des mécanismes à la fois immunologiques et non immunologiques.

Le degré de résistance des taurins est directement corrélé à leur état physiologique ; surmenage, malnutrition, maladies intercurrentes ou réactions vaccinales favorisent le développement de la maladie. Des adaptations physiologiques liées au milieu tropical jouent probablement un rôle non négligeable dans la résistance à la maladie des taurins. Par exemple, une meilleure tolérance à l'humidité, une meilleure utilisation des aliments, une thermorégulation plus efficace, une meilleure conservation de l'eau et une peau plus épaisse avec moins de piqûres d'insecte en challenge naturel sont autant de facteurs qui contribuent au phénomène de trypanotolérance (21,26). Des facteurs sériques trypanolytiques ont également été détectés chez certains individus : le sérum du buffle et de l'élan contiendrait un facteur trypanotoxique susceptible d'agir sur les formes infectieuses du parasite dès leur pénétration dans le derme. Ces mécanismes non immunologiques sont encore mal connus et demeurent à l'étude. Des observations au cours d'infections expérimentales ou en milieu naturel laissent à penser que la principale composante de la trypanotolérance serait d'ordre immunologique.

1.3 Immunité et trypanosomes

1.3.1 Antigénicité des trypanosomes

Au moins deux types d'antigènes provoquent chez l'hôte définitif une réponse immunitaire conséquente : les antigènes variables de surface ou VSG (Variant Surface Glycoprotein) et les antigènes invariants.

Les VSG sont des glycoprotéines de surface qui présentent une grande variabilité des structures primaires protéiques, notamment au niveau des parties externes. La structure tridimensionnelle montre que seule une petite partie de la protéine est exposée à la surface du parasite, la portion amine terminale (3). Les deux tiers de cette portion N-terminale sont très variants, contrairement au tiers de la zone C-terminale, qui, enchâssée dans la membrane cytoplasmique, représente la zone constante. Le rôle de ce manteau pourrait donc être en partie de masquer les antigènes membranaires invariants du trypanosome en présentant des antigènes variables immunodominants aux défenses immunitaires de l'hôte. (25). L'infection est ainsi caractérisée par une succession de populations croissantes puis décroissantes, avec des poussées tous les 7 à 10 jours (16). L'hôte produit effectivement des anticorps contre la première population rencontrée et la détruit mais de nouveaux variants apparaissent et se multiplient avant que la nouvelle réponse immunitaire de l'hôte soit effective (figure 4). Ainsi, par ce mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte, la parasitémie de l'animal infecté est constituée de successions de vagues séparées par des rémissions où la détection du parasite est difficile. Une population donnée de trypanosomes ayant le même répertoire antigénique forme un sérodème ou VAT (variant antigenic type). Ces composants de l'enveloppe externe du trypanosome ne sont présents que chez les formes infectieuses au niveau de l'hôte définitif (formes métacycliques après piqûre de la mouche puis formes sanguines).

Ces glycoprotéines de surface étant la cible principale de l'immunité humorale et les anticorps émis étant protecteurs, des immunisations ont été tentées mais la protection obtenue n'est que très partielle. Des essais de vaccination classique ont échoué face à une infection hétérologue et il est impossible de vacciner contre tous les sérodèmes existants d'une région donnée (3). Ainsi, il n'y a guère de chance pour qu'un vaccin conventionnel, anti-infectieux, puisse être mis au point sur cette base.

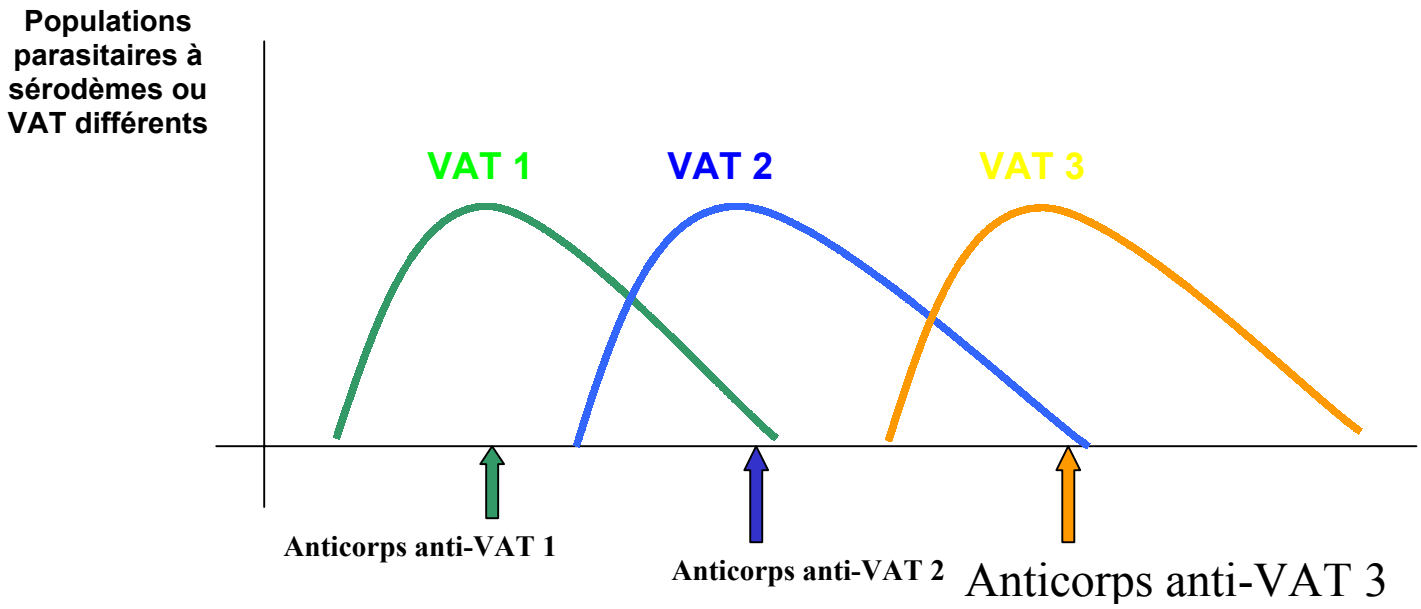


Figure 4 : Schématisation de la variation antigénique des VSG et de la réponse humorale décalée

Par ailleurs, d'autres composants du parasite induisent naturellement une réponse immune au cours d'une infection. Des protéines du cytosquelette ainsi que certaines molécules du métabolisme parasitaire (enzymes, récepteurs,…) ont été identifiées comme participant à la réponse immune. Certains constituants protéiques localisés au niveau de la poche flagellaire du protozoaire semblent ainsi être impliqués dans les phénomènes immunologiques et constituent une voie de recherche actuelle (27). Enfin, une autre catégorie d'antigènes invariants suscite un intérêt récent par leur implication dans les phénomènes pathologiques observés. Les trypanosomes africains relâchent effectivement dans le milieu vasculaire certains de leurs composants (protéines de structure, produits du métabolisme) de leur vivant ou lors des accès trypanolytiques. Certains d'entre eux ont des effets toxiques sur l'organisme de l'hôte et contribuent à la gravité du tableau clinique. Ces facteurs invariants des trypanosomes ayant un contact répété et fréquent avec le système immunitaire de l'hôte, il est apparu intéressant d'essayer de protéger les individus en favorisant le blocage de l'activité de ces toxines par une réponse immunitaire adaptée. Un nouveau concept est alors apparu : celui du vaccin « anti-maladie » par opposition aux vaccins traditionnels « anti-agents pathogènes ».

1.3.2 Réponse immune de l'hôte

L'hypergammaglobulinémie est un des phénomènes les plus anciennement observés lors de trypanosomose (20,24). Le taux d'immunoglobulines (Ig) M sériques augmente très rapidement et ce, d'une façon concomitante à l'apparition de la parasitémie. Celles-ci sont majoritairement dirigées contre les VSG des trypanosomes. L'augmentation des IgG est un peu plus tardive et plus modérée ; celles-ci sont principalement dirigées contre les antigènes internes des parasites. Il apparaît ainsi des anticorps dirigés contre les antigènes du parasite (VSG ou antigènes invariants) mais également contre des antigènes non-apparentés et des auto-anticorps.

1.3.2.1 Immunité humorale comparée des bovins trypanosensibles et trypanotolérants

L'aptitude des animaux trypanotolérants à mieux contrôler la parasitémie pourrait tenir à une efficacité plus grande de leur immunité anti-VSG protectrice. Lors de primo-infection, il apparaît finalement que les anticorps anti-VSG contribuent peu au phénomène de trypanotolérance (3). Inversement, lors de réinfections homologues, la réponse immune secondaire contre les VSG des taurins trypanotolérants est nettement supérieure à celle des animaux sensibles. La supériorité de la réponse immune secondaire anti-VSG des taurins contribue certainement pour une large part au phénomène de trypanotolérance.

La réponse en anticorps dirigés contre les antigènes invariants est à l'étude depuis moins longtemps car cette immunité était considérée comme non protectrice de l'infection. Des études ont alors porté sur ces antigènes peu connus et la réaction immune qu'ils pouvaient développer. Il a été montré que suite à une réinfection à *T. congolense* le taux d'IgG1 était élevé et persistant chez les N'Dama (trypanotolérants) alors qu'il était faible et transitoire chez les zébus (12). Il semblerait donc que la principale caractéristique immunologique des bovins trypanotolérants connue pour l'instant soit leur capacité à produire des réponses en IgG élevées et durables contre les antigènes des trypanosomes. Certains de ces anticorps sont dirigés contre les épitopes exposés (VSG) mais les autres pourraient neutraliser des facteurs parasitaires impliqués dans la pathogénie, contribuant ainsi à augmenter la résistance à la maladie. Il est alors devenu intéressant d'essayer d'identifier les antigènes invariants qui provoquaient la production d'IgG spécifiques et propres aux animaux trypanotolérants.

1.3.2.2 Identification des antigènes responsables de la réponse humorale spécifique des animaux trypanotolérants

Certains antigènes invariants des trypanosomes peuvent induire une réponse immune mais peu d'entre eux ont été identifiés. Les plus aptes à induire une réponse immune détectable sont des protéines à structure répétitive à fort pouvoir immunogène. Certains antigènes ne provoquent effectivement pas la synthèse d'anticorps en quantité suffisante pour être détectable, soit parce que présents à trop faible concentration, soit à cause de la compétition antigénique. Les meilleurs candidats sont ainsi soit les molécules accessibles par les anticorps soit les molécules intervenant dans le métabolisme parasitaire à turn-over important (enzymes, récepteurs, transporteurs,…).

Trois antigènes majeurs, à la base de ces réponses humorales, ont été identifiés par les méthodes de Western Blotting et ELISA : l'antigène 23 kD (kiloDalton), l'antigène 69 kD et l'antigène 33 kD (5).

L'antigène 23 kD est reconnu de façon identique par des animaux trypanosensibles et trypanotolérants et induit la synthèse d'IgG1. Sa reconnaissance n'est pas associée à des niveaux de parasitémie ou d'anémie différents.

L'antigène 69 kD est reconnu par tous les animaux infectés et provoque des réponses IgM et IgG. Les animaux trypanosensibles synthétisent plutôt des IgM anti-69 kD alors que les animaux trypanotolérants présentent une réponse forte en IgG1 anti-69 kD (5).
Cet antigène présente une grande homologie avec les molécules HSP70 des mammifères qui jouent un rôle important dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées et dans l'élimination des protéines anormales. Le rôle de la 69 kD demeure inconnu chez les trypanosomes. Cet antigène, détecté dans le plasma des animaux infectés, est impliqué dans la régulation de la réponse immune et dans les mécanismes physiopathologiques. Il représente donc un des antigènes invariants majeurs reconnus par le système immunitaire des bovins mais sa proximité antigénique avec des molécules de l'hôte entrave largement les recherches et travaux d'essais d'immunisations.

Les antigènes 23 kD et 69 kD suscitent la formation d'anticorps chez tous les individus infectés et pourraient éventuellement participer à des méthodes de sérodiagnostic.

L'antigène 33 kD suscite une production variable d'IgM, tous impliqués dans la formation des immuns complexes, et d'IgG1 libres. Lors de réinfections à *T. congolense* d'animaux trypanosensibles (Borans) et trypanotolérants (N'Damas), la reconnaissance de cet antigène a été variable selon les différents niveaux de pathologie. Les N'Damas ont tous exprimé des anticorps anti-33 kD alors que seuls les Borans retrouvant des valeurs d'hématocrite correctes ont présenté ces anticorps anti-33 kD. Les Borans qui n'ont pas reconnu cet antigène, ont atteint un degré d'anémie sévère et ont nécessité un traitement trypanocide pour éviter la mort (4).

1.4 Identification de la congopaïne et essais d'immunisation

1.4.1 Identification de la congopaïne

Dans le même temps, une cystéine protéase de *T. congolense* a été caractérisée. D'un poids moléculaire voisin de 30 kD, cette enzyme n'est exprimée que chez les formes parasitaires infectieuses des mammifères et présente une activité de type cathepsine. De localisation lysosomiale, ces protéases ont été mises en évidence au niveau de la poche flagellaire, seul lieu d'endocytose et d'exocytose du parasite. Ces cystéines protéases interviennent très probablement dans le turn-over de molécules, comme les VSG, des trypanosomes. Elles peuvent par ailleurs dégrader les protéines de leur hôte, comme celles des membranes cellulaires, le fibrinogène, l'albumine mais aussi les immunoglobulines ou les facteurs du complément. Elles peuvent aussi moduler l'activité des cytokines, directement ou pas en interagissant avec des enzymes plasmatiques. Ces cystéines protéases semblent donc

responsables de certains effets pathogènes reconnus chez l'hôte et ont par la suite été identifiées comme des facteurs parasitaires toxiques.

Il a été démontré que l'antigène 33 kD reconnu par les N'Damas trypanotolérants et cette cystéine protéase identifiée chez les formes infectieuses étaient bien la même molécule (2).

Le clonage et le séquençage du gène de *T. congolense* codant pour cette protéine ont mis en évidence une structure génétiquement proche de celle du groupe des papaïnes. Ayant été identifié chez *T. congolense*, cette protéase a été baptisée congopaïne (6). Quatre domaines ont pu être identifiés (figure 5): (1) une séquence signal hydrophobe (2) suivie d'une pro-région hydrophile, (3) un domaine central contenant des séquences, dont celles du site actif, hautement conservées et (4) enfin une extension C-terminale reliée au domaine central par une liaison riche en proline. L'extension C-terminale est caractéristique des cystéines protéases de trypanosomes, elle n'est effectivement pas présente chez les cathepsines de mammifères. Cette extrémité à pouvoir immunogène très important pourrait être associée en partie au domaine central actif afin de provoquer chez l'animal une immunisation suffisante et inhibitrice de l'activité enzymatique de ces cystéine protéases (8).

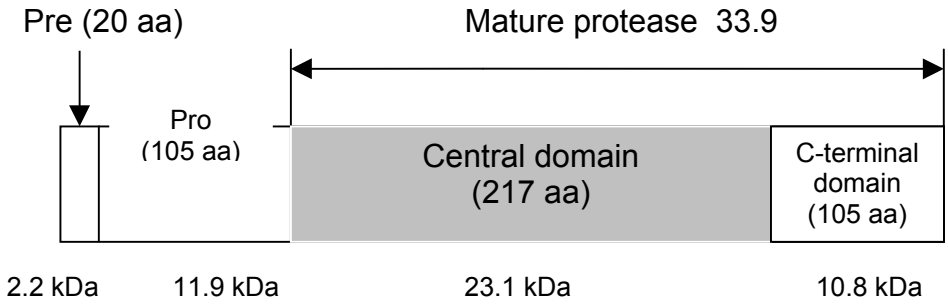


Figure 5 : Représentation schématique de la structure primaire de la cystéine protéase (congopaïne) de *Trypanosoma congolense* (d'après Fish et al., 1993) aa : acide aminé

Après identification de cette protéase, l'association entre la trypanotolérance et les niveaux d'IgG1 anti-congopaïne a été évaluée sur des effectifs plus conséquents d'animaux infectés à *T. congolense* (4). Une association entre le degré de résistance à la trypanosomose et les niveaux d'IgG1 anti-congopaïne atteints a été mise en évidence. Les races trypanotolérantes N'Dama et Baoulé ont montré des concentrations d'IgG1 anti-congopaïne significativement plus élevées que les zébus trypanosensibles. Les animaux métis ont montré des taux intermédiaires entre ceux des animaux trypanotolérants et des zébus.

La principale différence reconnue entre les animaux trypanotolérants et les animaux trypanosensibles est cette production d'IgG1 anti-congopaïne post infection, concomitante à l'amélioration de l'état général. Essayer de produire cette réponse immune chez des animaux

sensibles ou la renforcer sur des populations tolérantes afin d'aider l'animal à lutter contre la pathologie a été l'hypothèse de travail suivante.

1.4.2 Essais d'immunisation avec deux protéines recombinantes de la congopaïne

Des essais d'immunisations à partir de cystéines protéases suivis d'infections répétées à *T. congolense,* ont été menés afin d'étudier la réponse immune d'animaux trypanotolérants (bovins N'Dama) et trypanosensibles (zébus Boran) ainsi que l'évolution de leur état clinique (7).

Deux formes de la cystéine protéase identifiée, la congopaïne, ont été décrites (CP1 et CP2). Elles ont à 90% les mêmes séquences génétiques ; cependant leurs caractéristiques fonctionnelles différeraient au niveau de la relation hôte-parasite (8). Ne connaissant toujours pas les différences fonctionnelles entre ces deux protéines, il a été décidé de procéder à des essais d'immunisation avec ces deux candidats vaccin. Des protéines recombinantes de CP1 et CP2, respectivement nommées C1 et C2, ont alors été exprimées par les systèmes à baculovirus (9) et ont été utilisées pour immuniser le bétail (un groupe C1, un groupe C2, un groupe C1+C2 et un groupe témoin à l'albumine). Un mois après la dernière immunisation, les animaux ont été infectés par *T. congolense* (7).

La période prépatente et la parasitémie ont été identiques chez les animaux immunisés et chez les témoins. L'anémie et la chute de l'hématocrite ont été semblables durant les deux premiers mois de l'infection chez tous les animaux. Les animaux immunisés ont présenté, deux mois post-infection, un retour progressif à des valeurs presque normales de façon plus rapide et plus efficace que les animaux non immunisés (figure 6). Par ailleurs, les animaux immunisés avec C1 et C1+C2 ont présenté un gain de poids significativement plus important que les autres animaux (figure 7). Enfin, les animaux immunisés avec C2 ont développé une réponse immune précoce et massive contre les antigènes immunisants (la congopaïne et les antigènes VSG) alors que cette réponse est beaucoup plus lente et modérée chez les animaux immunisés au C1 (figures 8 et 9).

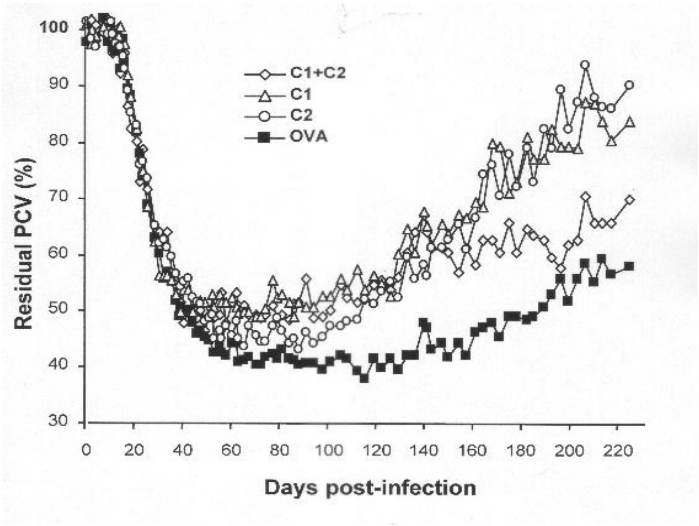


Figure 6 : Evolution du taux d'hématocrite des animaux immunisés (C1, C2, C1+C2) et des témoins après infection à *T.congolense*
D'après Authié et al, 2001

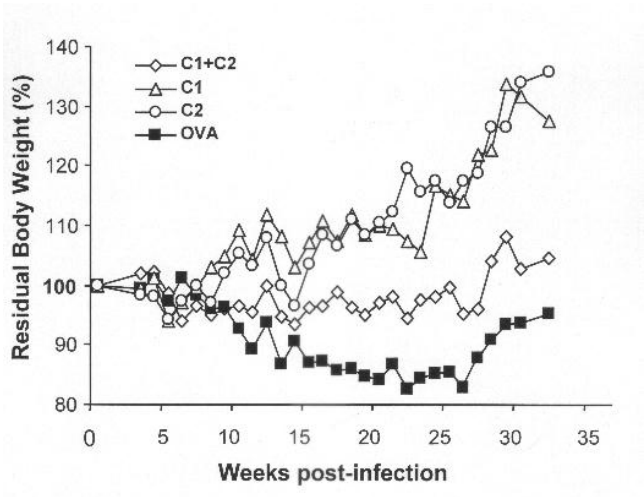


Figure 7 : Evolution du poids corporel des animaux immunisés (C1,C2,C1+C2) et des témoins après infection à *T.congolense*
D'après Authié et al, 2001

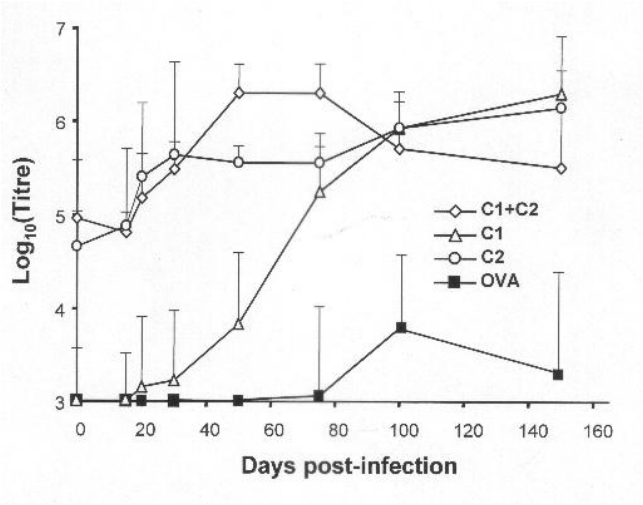


Figure 8 : Evolution des titres d'IgG spécifiques à la congopaïne native chez les animaux immunisés (C1,C2,C1+C2) et chez les témoins après infection à *T.congolense*
D'après Authié et al, 2001

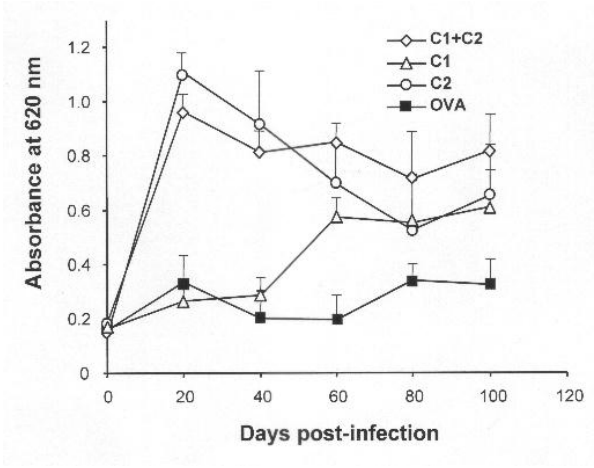


Figure 9 : Evolution des titres d'IgG spécifiques aux VSG chez les animaux immunisés (C1,C2,C1+C2) et les témoins après infection à *T.congolense*
D'après Authié et al, 2001

D'après cette étude, les deux formes CP1 et CP2 contribuent aux mécanismes de l'anémie post-infection alors que seule la protéase CP2 semble intervenir de façon déterminante dans l'établissement de l'immunosuppression. L'inhibition de l'activité de la congopaïne par des anticorps spécifiques naturellement produits par les animaux trypanotolérants durant l'infection ou artificiellement induits pour les autres conduit à une meilleure résistance à la maladie. Selon les résultats de cette étude, il semblerait donc envisageable d'augmenter la résistance à la trypanosomose chez des individus pourtant sensibles grâce à une immunisation contre certains facteurs pathogènes des trypanosomes.

Le projet INCO CONGO, mené par diverses équipes de chercheurs, se base sur une approche immunologique de la lutte contre la trypanosomose qui vise à réduire les conséquences pathologiques de l'infection trypanosomienne en immunisant les animaux avec des protéines recombinantes de cystéines protéases des trypanosomes. Les premiers essais d'immunisation (figure 6 à 9) ont non seulement confirmé l'action pathologique de la congopaïne dans la trypanosomose mais aussi un premier effet modulateur des protéines recombinantes utilisées dans les essais d'immunisation dans le développement de la trypanosomose.

La deuxième partie de ce document présente les objectifs généraux du projet INCO-CONGO dans lequel s'est inscrit mon stage au CIRDES.

2. Projet INCO-CONGO

2.1 Objectifs du projet

Les actions de ce projet s'inscrivent dans l'objectif général de l'amélioration de la productivité des ruminants en Afrique sub-sahélienne en luttant contre la trypanosomose.

Ce projet comprend trois grands axes de recherche dont le premier porte sur la caractérisation moléculaire et génétique des cystéines protéases des parasites ainsi que sur leurs mécanismes de pathogénicité. Puis, une composante importante évalue les effets de l'immunisation avec des protéines recombinantes de cystéines protéases sur la santé et la productivité du bétail. Enfin, ces cystéines protéases étant des antigènes majeurs dans la trypanosomose, leur potentiel diagnostique représente le troisième volet de recherche du projet INCO-CONGO.

2.2 Partenaires du projet

Six partenaires se répartissant les différents domaines de recherche participent à ce vaste projet. Tout d'abord, le CIRAD-EMVT (France) outre son rôle de coordinateur, apporte ses compétences dans les domaines de la biologie moléculaire, de l'immunologie et de l'approche diagnostique. Puis, deux universités françaises (Tours et Bordeaux) travaillent sur les problématiques de biochimie et de biologie moléculaire. L'Université du Natal (Afrique du Sud) développe certains des aspects biochimiques et immunologiques du projet. L'Institut de Médecine Tropicale (Belgique) s'intéresse à la partie diagnostique des objectifs du programme. Enfin, le CIRDES (Burkina Faso) développe les aspects d'épidémiologie moléculaire, de diagnostic et dirige les essais d'immunisation de terrain.

2.3 Rôles respectifs de chaque partenaire

Le Cirad-emvt a la charge de préparer et de synthétiser la congopaïne native et recombinante pour les essais d'immunisation, la caractérisation des réponses immunes et pour, *in vitro*, des études portant sur l'immunologie et le potentiel diagnostique. Les chercheurs étudient les interactions, *in vitro*, entre la congopaïne et le système immun (en association avec l'équipe de Nairobi). Les mêmes travaux seront réalisés avec la vivapaïne, cystéine protéase de *T. vivax* et des essais d'immunisation sont à l'étude sur les petits ruminants. Enfin, une partie de la recherche est axée sur l'identification et l'organisation des gènes codant pour la congopaïne.

Une équipe Cirad-emvt, détachée à l'ILRI (International Livestock Research Institute) à Nairobi, Kenya, caractérise les réponses immunes de bovins immunisés à la congopaïne pendant une phase d'infection expérimentale à *T. congolense*. Enfin, elle travaille sur l'identification d'épitopes naturels de la congopaïne à partir d'une banque de sérums bovins du Cirad-emvt.

Le deuxième participant, l'Université de Tours, s'applique à optimiser le processing de la pro-congopaïne, à identifier et caractériser les activités des cystéine protéases natives des formes sanguines de *T. vivax*. Enfin, il approfondit l'analyse de l'activité enzymatique de la forme recombinante de la vivapaïne et des interactions entre la congopaïne et les quinines des bovins.

Le troisième participant, l'Université de Bordeaux, travaille sur l'expression de la vivapaïne, l'homologue de la congopaïne de *T. vivax* et sur l'expression de ces deux protéines dans un système à *Crithidia*.

Le quatrième participant, l'Université du Natal, synthétise des peptides basés sur la séquence de la congopaïne afin d'identifier les principaux épitopes immunogènes (sur sérums fournis par l'équipe 1). Il s'emploie également à immuniser des lapins avec des peptides choisis en vue de conserver des anticorps inhibiteurs. Enfin, il produit des peptides sélectionnés pour le développement et l'évaluation en test ELISA par les cinquièmes et sixième participant.

Le cinquième participant, l'Institut de Médecine Tropicale, cherche à développer des tests ELISA indirects utilisant des fragments recombinés de la congopaïne (fournis par l'équipe 1) et de la vivapaïne mais aussi des peptides synthétiques (identifiés et fournis par l'équipe 4).

Enfin, le sixième partenaire, le CIRDES, organise les essais d'immunisation de terrain à la congopaïne, de 30 à 40 bovins suivis un an sur les plans cliniques, parasitologiques et sérologiques (antigènes d'immunisation fournis par l'équipe 1). Il contribue, en collaboration avec la cinquième équipe, au développement et à la validation de nouveaux tests ELISA indirects, en utilisant des sérums de bovins infectés naturellement et expérimentalement. Les antigènes sont fournis par l'équipe 1. Enfin, il participera à l'étude du polymorphisme génétique de la congopaïne en produisant l'ADN des stocks disponibles de *T. congolense* d'Afrique de l'Ouest.

Cette brève présentation du rôle de chacun des participants permet de mieux comprendre les différentes interactions entre partenaires et de saisir l'ampleur du projet. Les activités du CIRDES sont présentées plus précisément ci-dessous.

2.4 Les activités du CIRDES

2.4.1 Contribution à l'étude du génome, du polymorphisme et de la diversité génétique des cystéines protéases

Une quarantaine d'isolats de *T. congolense* de localisations, de pathogénicité et de résistance chimique différentes a été collectés sur le terrain. Une amplification des gènes de la congopaïne par la méthode PCR sera réalisée grâce aux amorces envoyés par les autres équipes. Enfin, les gènes amplifiés seront envoyés aux équipes concernées pour le séquençage et l'analyse.

2.4.2 Contribution à la mise au point de tests sérologiques pour le diagnostic des trypanosomoses

L'équipe du CIRDES a la charge de produire des sérums de bovins et d'ovins infectés à *T. congolense* et/ou *T. vivax* puis de les envoyer à l'Institut de Médecine Tropicale belge qui s'attache aux aspects diagnostiques du projet. Les tests établis seront ultérieurement contrôlés sur le terrain au Burkina.

2.4.3 Impact de l'immunisation à la congopaïne sur du bétail placé sous challenge trypanosomien naturel

Des essais d'immunisation avec les protéines recombinantes C1 et C2 ont déjà été menés sous
conditions contrôlées en étable par l'équipe conjointe du CIRAD et de l'ILRI, à Nairobi. Ces essais d'immunisation doivent dès 2003 être reproduits sur le terrain, sous challenge trypanosomien naturel par l'équipe du CIRDES.

L'étude de terrain se déroule en deux étapes :
- immunisation des animaux dans une zone de faible prévalence de trypanosomose à *T. congolense*
Quarante huit animaux femelles âgés de un an à un an et demi seront sélectionnés par leur réponse négative aux tests sérologiques ELISA indirects à *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei.* L'immunisation concernera la moitié des animaux, les autres seront pris comme témoins avec comme injection un mélange d'adjuvant et de solution tampon.
- épreuve d'infection naturelle dans une zone à forte pression à *T. congolense* et évaluation de l'efficacité de l'immunisation
Après la période d'immunisation de trois mois, l'ensemble du bétail sera déplacé pour une durée d'un an, dans une zone choisie fortement endémique à *T. congolense*. Il sera réalisé un suivi hebdomadaire de l'état clinique, du poids, de la parasitémie, de l'hématocrite et de la présence des anticorps anti-trypanosomes (ELISA indirectes) afin d'évaluer les effets de l'immunisation à la C2.

Ce protocole présente encore deux points à préciser : la localisation de la zone fortement endémique et le choix de la race des animaux à immuniser.

Des études prospectives sont actuellement menées par les équipes du CIRDES sur diverses localités des environs de Bobo-Dioulasso. La situation parasitaire doit être identifiée autant au niveau du cheptel qu'au niveau des vecteurs et la pression parasitaire être déduite de l'analyse conjointe des résultats de prévalence bovine et de taux d'infection entomologique. Une forte prévalence de la trypanosomose bovine à *T. congolense* ainsi qu'une population de glossines infectées conséquente déterminent les critères de choix de cette zone. Enfin, la situation géographique doit être prise en compte non seulement pour assurer une distance minimale à parcourir pour le suivi hebdomadaire mais aussi pour des raisons de commodités d'accès, notamment pendant la saison des pluies.

Les essais précédents d'immunisation à la C2, à Nairobi, ont porté sur des zébus Borans trypanosensibles et des N'Damas trypanotolérants en conditions contrôlées en étable. Les essais de terrain à venir se réaliseront en conditions naturelles sur les races locales d'animaux. Les Baoulés sont les animaux typiquement trypanotolérants de notre région d'étude mais leur petit format a depuis longtemps favorisé l'extension du produit de croisement Baoulé – zébu. Les métis sont ainsi les animaux les plus répandus autour de Bobo-Dioulasso, les zébus étant primés pour leur taille mais résistant mal à la pression parasitaire. Les travaux d'immunisation

précédents ont montré une meilleure réponse immunologique des animaux trypanotolérants (N'Dama) par rapport aux zébus Boran immunisés (7, document interne). On pourrait donc supposer que les Baoulés répondent mieux que les zébus d'Afrique de l'Ouest et que les métis présentent des profils immuns intermédiaires et variés. La question du type d'animal à choisir pour les essais d'immunisation de terrain s'est posée et une étude préliminaire sur un nombre restreint de bovins s'est avérée nécessaire pour comparer les réponses immunes de ces trois types d'animaux présents afin de pouvoir préciser par la suite la race à retenir pour l'expérience.

La troisième partie décrit les travaux en cours relatifs à la recherche d'une zone à forte prévalence à *T. congolense* et la quatrième partie présente l'essai d'immunisation préliminaire, objet principal de mon stage.

3. Choix du site pour les essais d'immunisation sur le terrain

3.1 Matériel et méthode

Différents sites ont été initialement choisis grâce aux avis concertés des chercheurs et des techniciens, qui par leur connaissance de la région situent globalement les aires de pression parasitaire importante (figure 10). Une analyse parasitologique, tant au niveau des bovins que des mouches, de chacun des sites proposés devrait permettre par la suite de retenir l'endroit le plus propice aux infections naturelles à *T. congolense*.

Pour chaque zone, une cinquantaine de bovins est sélectionnée et un prélèvement de sang est réalisé au niveau de la veine jugulaire. Au laboratoire, un examen parasitologique sur sang frais (23) par la méthode du Buffy Coat (10) et des tests ELISA (31) permettent de situer le niveau de l'infection à *T. congolense* du site étudié. Un diagnostic par PCR complète l'analyse prospective en identifiant le type de *T. congolense* présent (19).

Parallèlement, des pièges biconiques (11) sont posés en différents endroits tôt le matin. Les mouches capturées sont identifiées et disséquées sur place. Un premier diagnostic parasitologique, peu spécifique, peut être posé par observation microscopique du proboscis, des glandes salivaires et de l'intestin. Un diagnostic par PCR permet de préciser avec certitude l'espèce de trypanosomes présente.

La figure 10 localise les différents endroits prospectés (en bleu) ou à prospecter (en noir).

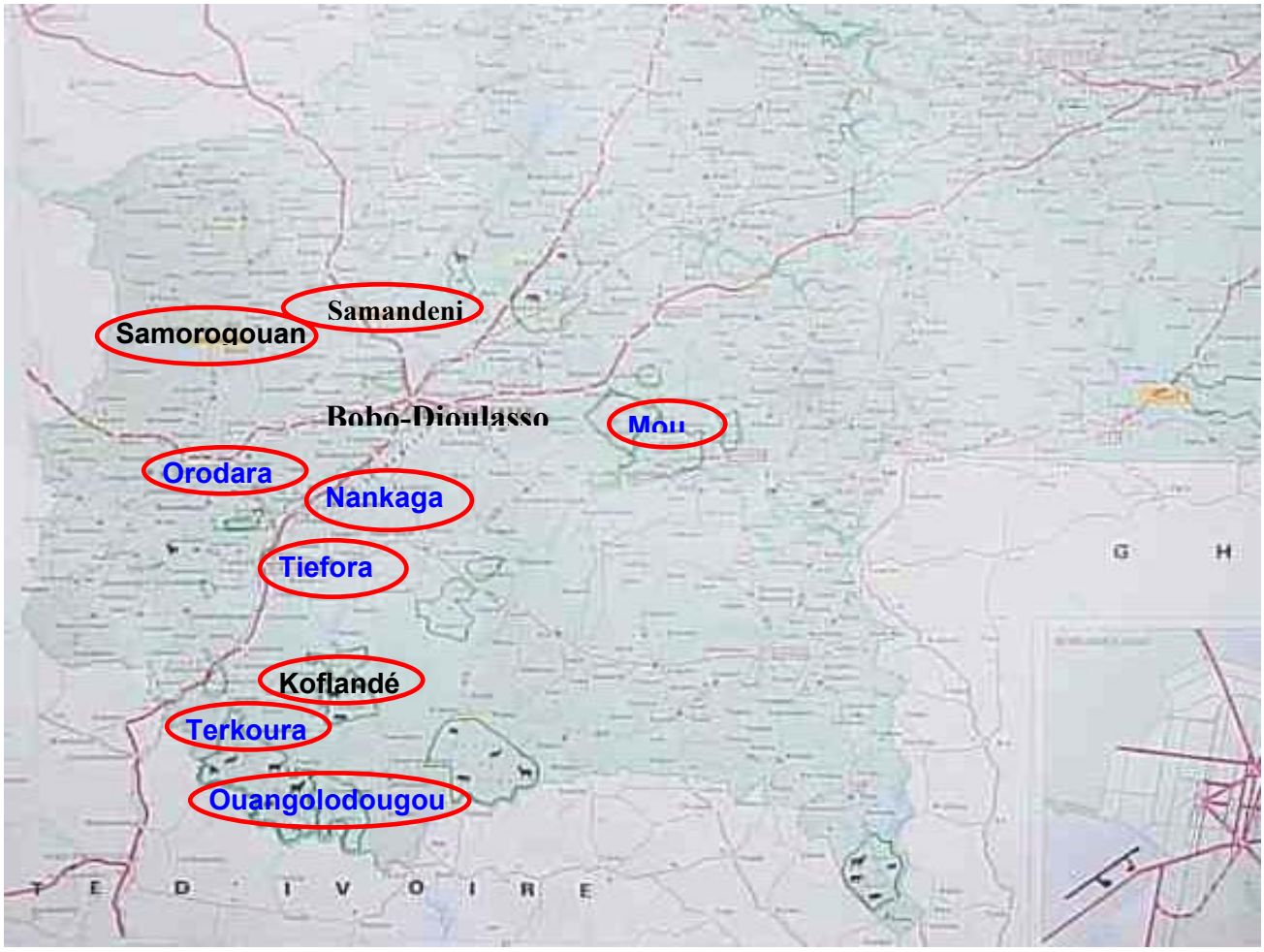


Figure 10 : Localisation des différentes zones prospectées ou à prospecter pour la recherche d'un site fortement endémique à *T. congolense*

3.2 Résultats

Les premières analyses parasitologiques chez les bovins et les mouches sont présentées ci-dessous. Les réponses sérologiques des différents animaux prélevés sont partiellement représentées dans le paragraphe suivant, les résultats de PCR confirment la présence de *T. congolense* type savane.

SITES	**EFFECTIFS PRELEVES**	**RESULTATS** **Prévalences parasitaires chez les bovins (par espèce)** **Nombre de mouches capturées, taux d'infection des mouches**
TERKOURA	120 bovins 26 pièges	9 % (7,5% Tv, 1,5% Tc) 126 Glossina palpalis gambiensis : 7,8% infectées 7 Glossina tachinoïdes : 20% infectées
NANKAGA	40 bovins 5 pièges	**17,5 % (12,5% Tv, 5% Tc)** 203 G.p.gambiensis : 23% infectées 5 G.tachinoides : 0% infectées

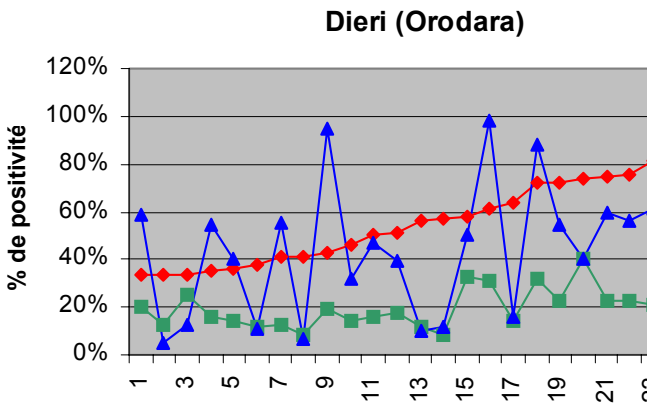
ORODARA	50 bovins 10 pièges	**24 % (8% Tv, 16% Tc)** 400 G.p.gambiensis : 16% infectées 68 G.tachinoides : 33% infectées
MOU	50 bovins 5 pièges	0 % Pas de mouches
TIEFORA	50 bovins 5 pièges	4 % (2 % Tv, 2 % Tc) 7 G.p.gambiensis : 0% infectée 50 G.tachinoides : 14,81% infectées
OUANGOLODOUGOU	50 bovins 5 pièges	**16 % (2 % Tv, 14 % Tc)** Pas de mouches, à reprospecter
SAMANDENI	50 bovins 5 pièges	2 % (2% Tv) Pas de mouches

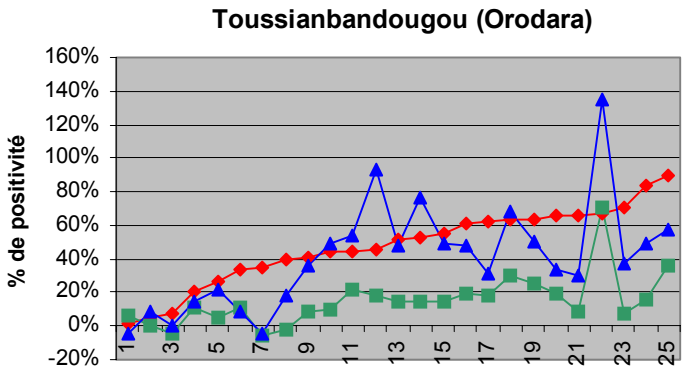
Figure 11 : Résultats des analyses sur bovins (diagnostic direct sur sang frais, méthode du Buffy Coat) et insectes (dissection)

Ces premiers résultats désignent trois zones potentiellement intéressantes par le pourcentage d'animaux positifs au diagnostic direct sur sang frais : Nankaga, Orodara et Ouangolodougou (figure 11). Le site de Nankaga présente cependant une prédominance de *T. vivax*. Dans le cadre du projet INCO-CONGO, Orodara et Ouangolodougou semblent à ce stade à retenir.

Le nombre de mouches capturées est très variable d'une localité à l'autre. Certaines présentent des prises nulles (Samandéni, forêt de la Mou, Ouangolodougou) alors que d'autres montrent des captures de plus de 200 mouches (Orodara, Nankaga,…). Trois sites semblent ici à retenir pour la quantité de mouches capturée et le taux d'infection associé : Terkoura, Nankaga, Orodara.

Il faut cependant noter le résultat étonnant de Ouangolodougou, qui malgré une présence incontestable de parasites, affiche une prise nulle de mouches. Il a été décidé, par conséquent de reconduire les poses de pièges biconiques ultérieurement à Ouangolodougou.





Tiefora

Figure 12 : Pourcentage de positivité relative de *T. congolense, T. vivax* et *T. brucei* dans les différents sites prospectés (test ELISA indirect)

La figure 12 montre les résultats des profils sérologiques des animaux prélevés dans quelques sites. Les réponses ont été ordonnées selon le score en ELISA *T. vivax* de chacun puis classées par ordre croissant de score *T. vivax*. Les sites de Tiefora et d'Orodara présentent un profil classique pour la région, avec des prévalences relatives mixtes à dominante *T. vivax*. Le site de Samandéni est particulier car présente une nette dominance de *T. vivax* sur les autres trypanosomes. Enfin, le site de Ouangolodougou montre un profil très original, à nette dominance à *T. congolense*.

Les autres sites prospectés, et non illustrés ici, ont montré des prévalences moyennes à dominance *T. vivax*, profils relativement semblables à ceux de Tiefora et Orodara.

3.3 Discussion

La prospection de ces différents sites a permis de comparer les niveaux parasitaires rencontrés, aussi bien à l'échelle des bovins que des glossines. Orodara a été dans un premier temps, le site le plus favorable pour le volet terrain du projet INCO-CONGO car présentait une parasitémie dominante à *T. congolense* et un nombre de mouches élevé. Le profil sérologique demeurait cependant classique avec sérodominance de *T. vivax*.

Ouangolodougou a été visité plus tardivement et les résultats ont montré non seulement une parasitémie dominante à *T. congolense* au moment du passage mais également une sérodominance de ce même trypanosome. Ouangolodougou répond de ce fait mieux aux critères de recherche de la zone de forte prévalence à *T. congolense* pour la population bovine mais une nouvelle pose de pièges s'avère nécessaire pour clarifier la situation entomologique avant toute décision finale.

La lutte est actuellement envisagée dans ce secteur de Ouangolodougou par les propriétaires d'animaux car aux dires d'éleveurs, la trypanosomose bovine semble réellement sévir et entraver l'élevage bovin. Ces témoignages confirment bien l'intérêt de Ouangolodougou comme terrain d'infection naturelle pour le projet INCO-CONGO mais une intervention de lutte modifierait les paramètres parasitaires de cette zone de façon préjudiciable pour les essais d'immunisation à venir.

Deux sites n'ont pas été encore visités (Samorogouan et Koflandé) mais la zone de Ouangolodougou remplit tout à fait les critères de choix du site d'infection, à condition non seulement d'obtenir une nouvelle capture de mouches fructueuse mais aussi une intervention de lutte différée d'au moins un an.

Après cette présentation de la démarche de recherche de la zone appropriée pour l'infection de terrain, la partie suivante décrit l'essai préliminaire d'immunisation à la congopaïne aidant au choix du type d'animal à impliquer dans les essais ultérieurs.

4. Evaluation de la réponse immune chez des zébus, métis et Baoulés

Cette étude préliminaire propose d'immuniser les différents types d'animaux présents de la région (trypanosensibles, trypanotolérants et métis) et d'observer et comparer l'expression d'anticorps anti-C2 de chaque animal afin de préciser l'option la plus judicieuse dans le choix des essais d'immunisation de terrain.

Trois possibilités ont été envisagées (document interne) :

- des zébus naïfs (trypanosensibles) provenant d'une zone non endémique de trypanosomose.

Cette alternative, en reproduisant sous les conditions naturelles les essais d'immunisations antérieurs qui ont été menés sous conditions contrôlées sur des zébus naïfs, présenterait l'avantage d'une analyse et d'une interprétation des données facilitées. Cependant, ces animaux devant provenir d'une zone non endémique de trypanosomose, seraient recrutés et infectés dans des zones du nord du Burkina Faso puis ensuite déplacés jusqu'à la zone

endémique choisie. Outre les inconvénients techniques d'une longue distance entre zone d'immunisation et zone d'exposition aux trypanosomes, les animaux présenteraient une plus grande sensibilité aux pathologies propres aux zones humides (comme certaines maladies transmises par les tiques) et nécessiteraient des traitements prophylactiques durant la totalité de l'expérience, avec une interférence possible dans le protocole expérimental et un risque élevé de perdre des animaux du fait de ces infections.

- des Baoulés (trypanotolérants) provenant du pays Lobi (Burkina Faso)

Les travaux d'immunisation précédents ont montré une meilleure réponse immunologique des animaux trypanotolérants (N'Dama) par rapport aux zébus Boran immunisés. Le choix des Baoulés laisserait espérer une meilleure réponse à l'immunisation au C2 que celle des zébus naïfs. Cependant, ces animaux provenant d'une zone infestée de trypanosomes, présenteraient des historiques pathologiques individuels variés, affectant la survenue des infections durant le temps de l'expérience. De plus, il serait souhaitable d'augmenter la résistance des animaux les plus répandus, à savoir les zébus et les métis qui sont plus sensibles à la trypanosomose que les Baoulés.

- des animaux métis provenant de zones endémiques

Ils représentent la population de bovins la plus largement répandue dans la région. Cependant, leur haute variabilité génétique laisse craindre des réponses sérologiques hétérogènes et de sérieuses difficultés à l'analyse des effets de l'immunisation au C2.

La comparaison des réponses immunes de ces différents animaux à l'immunisation préliminaire à la congopaïne doit apporter des éléments de précision quant à la supposée variabilité des réponses sérologiques des métis. Elle devrait ainsi permettre de répondre aux interrogations posées sur l'hétérogénéité des réponses sérologiques des métis et sur la supériorité des profils immuns des Baoulés.

Le choix des animaux de l'épreuve d'immunisation de terrain, prévue pour décembre 2002, se basera ultérieurement sur ces résultats.

4.1 Matériel et méthode

4.1.1 Choix des animaux

Les différents membres du projet INCO-CONGO ont décidé de réaliser cet essai préliminaire sur les animaux présents dans la région d'étude finale : des zébus, des métis et des baoulés (figure 13). Cette étude permet d'apporter des renseignements supplémentaires pour la décision finale de la race d'animaux à choisir. Dix animaux ont été achetés : deux zébus, deux baoulés et six animaux métis (la variabilité génétique de ces derniers explique le plus grand nombre d'animaux mis à l'étude).

Figure 13 : Exemple d'un zébu trypanosensible (à gauche), d'un métis (au milieu) et d'un baoulé trypanotolérant (à droite)

Ces animaux ont tous été choisis après la réalisation de trois tests ELISA indirects avec les antigènes de *T. congolense, T. vivax* et *T. brucei* (annexe 2) devant être négatifs et provenant d'une zone endémique proche. Ces animaux sont tous âgés de deux ans et de sexe femelle. Enfin, ils ont tous reçu un traitement trypanocide, l'acéturate de diminazène, à une dose stérilisante de 10,5 mg/kg avant le début de l'essai d'immunisation.

La figure 14 montre les résultats du dernier test ELISA indirect effectué avant la première immunisation. Les dix animaux ont tous présenté des valeurs de pourcentage de positivité relative (PPR) inférieures au seuil de positivité de 20 % pour *T. brucei* et *T. congolense* et seul un animal a présenté une PPR de 21 % en *T. vivax*. Le statut immunitaire de ces dix animaux a donc été jugé satisfaisant pour débuter les immunisations.

Le recrutement des Baoulés a présenté quelques difficultés puisque sur cinquante animaux testés, seuls quatre se sont révélés séronégatifs et deux seulement avaient deux ans. Les élevages contenant des Baoulés se situent effectivement dans des zones à forte pression parasitaire, ces animaux trypanotolérants sont ainsi majoritairement séropositifs.

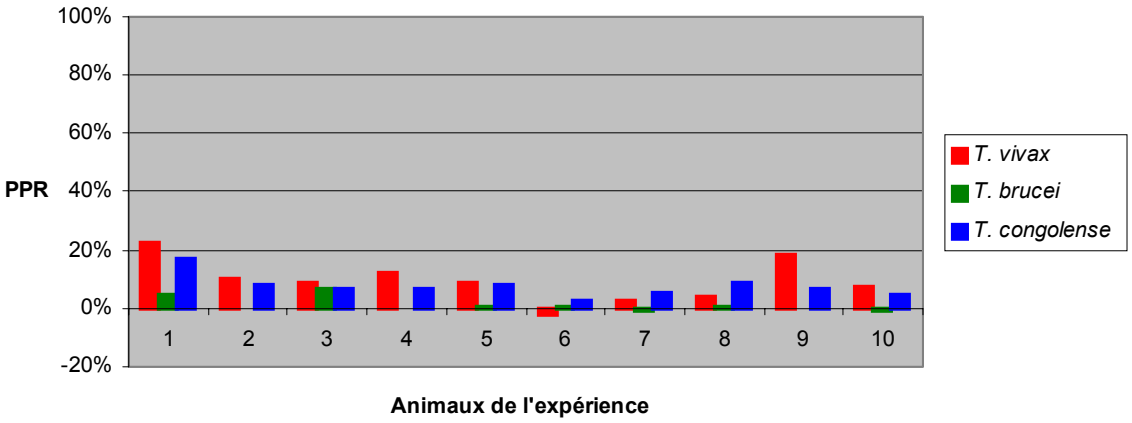


Figure 14 : Réponse sérologique au test ELISA indirect à *T. vivax, T. brucei* et *T. congolense* des dix animaux avant la première immunisation (10 mai 2002)

4.1.2 Choix de la protéine immunisante

La congopaïne relarguée par les trypanosomes a été identifiée comme facteur parasitaire intervenant dans l'établissement de l'anémie post-infection et altérant le développement d'une réponse humorale spécifique chez les animaux infectés, peut-être en interférant avec les mécanismes du switch isotypique IgG/IgM. Les animaux trypanotolérants posséderaient cette capacité à mieux exprimer des IgG anti-congopaïne et ainsi à neutraliser les effets néfastes de cette cystéine protéase.

Des essais d'immunisation ont déjà été menés par les équipes de l'ILRI à Nairobi sur du bétail trypanotolérant (N'Dama) et trypanosensible (zébus Boran). Plusieurs protéines recombinantes du domaine central de la congopaïne naturelle ont été testées, les protéines C1, C2 et C3. Des essais sont en cours avec ces trois protéines mais il semblerait que la protéine C2 apporte les résultats les plus intéressants (8, 7), ainsi pour les essais d'immunisation anti-congopaïne menés au CIRDES, seule la protéine C2 a été utilisée.

Ces protéines recombinantes ont tout d'abord été synthétisées par les systèmes à baculovirus mais les quantités produites ainsi que les difficultés de purification ont orienté les équipes vers un nouveau système de production plus efficace, à savoir l'expression de ces protéines dans les levures *Pichia pastoris*. Les protéines produites, après transfert d'ADN plasmidique dans les cellules de ces levures, sont présentes non seulement en quantité plus importante mais aussi obtenues plus facilement à un niveau de purification élevé.

4.1.3 Protocole d'immunisation

L'antigène utilisé est la protéine C2 synthétisée par *Pichia pastoris*, produite, purifiée et préparée par l'équipe de l'ILRI.

L'adjuvant utilisé pour la fabrication du mélange à injecter est un produit de la gamme Montanide, défini comme étant une composition d'eau dispersible contenant des composants organiques actifs immunologiquement et des excipients spécifiques. Contrairement aux excipients huileux, on relève de rares effets secondaires consécutifs à leur injection (granulomes ou abcès stériles avec poussées fébriles). La réponse immunitaire induite, cellulaire et humorale, est forte, rapide et persiste longtemps. Enfin, ces adjuvants sont faciles à utiliser car basés sur des composants solubles, aucun matériel spécialisé n'est de ce fait nécessaire pour la fabrication d'un vaccin.

Le Montanide ISA 206 est l'adjuvant de la gamme Montanide qui correspond le mieux à la conception du vaccin avec la C2. Il est formulé selon une méthode dite « water in oil in water », l'huile étant une huile minérale. Cette formulation diminue encore la viscosité de la préparation comparée aux formules « water in oil », ce qui facilite d'autant plus son injection. La réponse immunitaire induite par ce produit est très précoce (document interne).

L'antigène dilué (annexe 1) est versé lentement dans l'adjuvant préalablement prélevé sous hotte. Le mélange est aspiré par une seringue sans joint caoutchouc (pour éviter les problèmes de pression et de perte du mélange) puis vidé lentement dans un bécher. Ce cycle aspiration-vidange est répété dix fois jusqu'à l'obtention d'un liquide blanc homogène et épais.
100 µg de C2 (solution de C2 disponible à la concentration de 1,75 mg/ml) doivent être inoculés par animal. Un volume de 630 µl de C2 dilué dans 1,46 ml de PBS est mélangé à 1,78 ml d'adjuvant ISA 206 pour aboutir au volume total de 3 ml de mélange à injecter par animal (il faut compter une perte de 10 % lors de la préparation).

La préparation du mélange à injecter se fait pour des raisons de commodités techniques dans les heures précédent le moment de l'injection. Le produit terminal est injecté en voie sous-cutanée en deux sites différents (chaque côté de l'encolure par exemple).

Le protocole d'immunisation choisi comporte trois injections espacées de 30 puis de 15 jours (J0, J30, J45). Les immunisations se sont déroulées le 17 mai, le 17 juin et le 1er juillet 2002. Les animaux sont restés en étable sous moustiquaire pendant toute la durée des expériences.

4.1.4 Suivi des animaux

Trois prélèvements sanguins par semaine ont permis le suivi des hématocrites (ainsi que l'absence de parasitémie jusqu'à un mois après la dernière injection). L'hématocrite représente le volume occupé par les éléments figurés du sang, les globules dans un volume donné de sang. Ils sont obtenus ici selon une méthode standard : des tubes à hématocrite sont remplis de sang frais et bouchés à leur extrémité inférieure par une pâte. Ces tubes sont alors centrifugés cinq minutes à 13 000 tours/minute. La lecture de la valeur de l'hématocrite se fait alors avec une abaque de lecture qui détermine à partir des quantités respectives de globules rouges et de plasma le pourcentage d'hématocrite.

L'absence de trypanosomes est surveillée par la méthode du « Buffy Coat » (10), c'est-à-dire un examen direct entre lame et lamelle au microscope à fond noir du matériel biologique situé entre les globules rouges et le plasma après centrifugation du tube à hématocrite.

Un suivi sérologique a été mis en place afin d'évaluer les réponses anticorps anti-C2 des différents animaux. La réponse immunologique des animaux est suivie par des tests ELISA (13,14,15). C'est une méthode immuno-enzymatique de dosage des anticorps qui est très sensible et fiable. Cette méthode repose sur la propriété que possèdent certains matériaux, notamment les polystyrènes, de fixer les grosses molécules protéiques, telles que les anticorps et les antigènes.

L'antigène est adsorbé sur des plaques de microtitration en polystyrène rigide creusées de 96 cupules. Les dilutions des sérums à tester sont ensuite mises à incuber sur ces plaques. Les anticorps spécifiques, s'ils sont présents dans les sérums, se fixent sur les antigènes correspondant. Le matériel qui n'a pas réagi est éliminé par plusieurs lavages. On ajoute alors un conjugué anti-immunoglobuline marqué à la péroxydase, d'où la formation d'un complexe antigène-anticorps-conjugué fixé sur les parois des cupules. Après élimination par lavage de l'excès de conjugué, l'addition de substrat et de chromogène (eau oxygénée et ABTS) produit un changement de couleur du milieu réactif. Ce changement est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans le sérum. La lecture peut s'estimer à l'œil nu mais pour plus de précision, un spectrophotomètre adapté au système permet d'exprimer les changements de couleur en différence d'absorbance (mesuré par rapport à la densité optique (DO)).

Des tests ELISA reposant sur la sensibilisation des plaques par la protéine recombinante C2 ont pu être utilisés pour le suivi des réponses immunitaires des dix animaux à l'injection de C2. Deux protocoles de sensibilisation ont été proposés par l'équipe de Nairobi, l'un prévoyant 0,05 µg de C2 *Pichia pastoris* par cupule ou high coating et l'autre 0,015 µg ou low coating (annexe 3). Les dilutions préconisées étaient de 1/4000 pour le protocole en low coating et de 1/1000 à 1/4000 pour le high coating. Différentes dilutions ont été testées avant le début de l'immunisation avec des sérums de référence d'animaux infectés puis pendant avec les sérums des animaux immunisés.

4.1.5 Méthode d'analyse des résultats

Soit X, la variable quantitative continue, représentant la valeur en DO de la réponse sérologique au test ELISA C2, à une date donnée. Pour chaque date, la distribution de X est identifiée, d'après les tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk, comme normale (annexe 5).

Les réponses sérologiques des dix animaux ont été comparées aux différentes dates, puis selon la race par une méthode d'analyse adaptée aux mesures répétées par le logiciel SPSS. Le « General Linear Model » ou GLM traite des données de mesures répétées par une analyse des variances et des covariances des variables décrivant toute la population (ici, les valeurs des DO à chaque date) puis en séparant selon des facteurs externes - between-subjects factor- (ici, la race des animaux).

Une deuxième méthode pour ce type de données dépendantes est de remplacer l'ensemble des valeurs répétées par individu par une approximation : somme des DO aux différentes dates / √ 4. Il convient ensuite de réaliser une analyse de variance entre les deux variables concernant chaque individu : la race et la valeur approchée des DO.

Le résultat de ces analyses devrait nous indiquer si les réponses sont significativement différentes ou non entre les différentes dates et si elles le sont selon la race. Les résultats statistiques sont présentés dans l'annexe 5.

4.2 **Résultats**

4.2.1 Résultats préliminaires des essais sur le test ELISA C2

Plusieurs essais avec des témoins positifs d'infection, des témoins négatifs et un témoin positif d'immunisation nous ont montré les différentes gammes de valeurs possibles selon les cas de figures, aux deux dilutions préconisées (1/1000 et 1/4000).

A la dilution 1/1000, les échantillons d'animaux non immunisés, infectés ou indemnes, ont présenté des DO inférieures ou avoisinantes de 0,1 (plaques en low coating et high coating), alors que le sérum du bovin immunisé de référence (BW85) atteignait des valeurs comprises supérieures à 0,7. Des sérums infectés ont été choisis très fortement positifs au test ELISA classique mais ils n'ont que très peu réagi face à ce nouveau test C2 (DO = 0,146 à la

dilution 1/1000), notamment en comparant avec la réactivité de sérums d'animaux immunisés (DO = 0,873 pour le même test).

Les sérums d'animaux non immunisés, qu'ils soient infectés ou indemnes n'ont pas montré de DO significativement différentes entre eux : valeurs très proches inférieures à 0,1 pour le low coating et plus étalées entre 0,05 et 0,15 pour le high coating (différence non significative).
Enfin, les sérums des animaux de l'étable avant immunisation ont révélé des DO semblables à l'ensemble des animaux non immunisés testés. L'annexe 4 présente une grille de résultat ELISA ainsi qu'une partie des comparaisons des DO.

Les essais avec les deux protocoles, en low et high coating, ont montré une nette différence de DO entre le sérum d'un animal immunisé de référence (sérum de référence de l'ILRI) et les sérums des animaux infectés de terrain. Le protocole high coating a été utilisé en début d'expérience, il permettait de mieux détecter des différences de DO faibles. Les DO atteintes ont cependant rapidement saturé le système puisque avant la deuxième immunisation, les DO dépassaient déjà pour certains, une valeur de 0,8 (figure 15). Suite à la deuxième immunisation, le système a été totalement saturé avec des valeurs dépassant les 1,2. Il a donc été décidé de recommencer l'ensemble des mesures et de travailler avec des plaques low coating à une dilution de 1/4000. L'ensemble des résultats présentés dans le paragraphe suivant porte sur des sérums analysés sur plaques low coating à la dilution 1/4000.

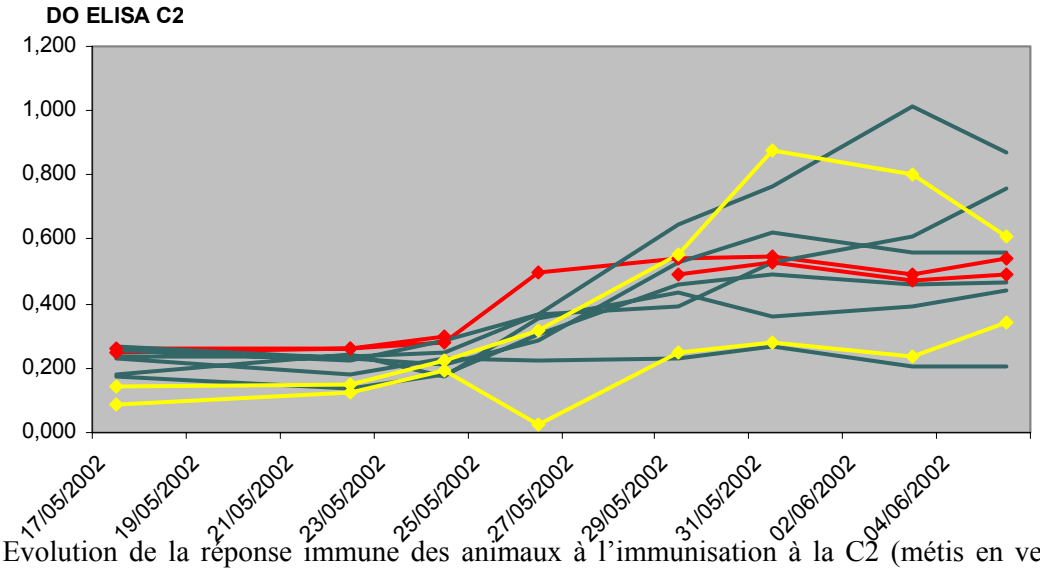


Figure 15 : Evolution de la réponse immune des animaux à l'immunisation à la C2 (métis en vert, baoulés en jaune et zébus en rouge) sur des plaques high coating, jusqu'à trois semaines après la première immunisation dilution (1/4000).

Puis, différentes dilutions ont été étudiées à partir des réponses à l'immunisation d'un animal de l'expérience, l'animal 434 (figure 16). Les dilutions testées sont successives de 1/1000 à 1/128000. Les dilutions inférieures ou égales à 1/16000 ne permettent un écart que de maximum 0,2 entre les différentes valeurs observées. Ces dilutions semblent de ce fait trop importantes pour évaluer un statut immun anti-C2. A l'inverse, le système n'a pas été saturé une seule fois, même après les deuxième et troisième immunisations à une dilution faible 1/1000. Les profils immuns sont similaires aux quatre premières dilutions (1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000) à un niveau et demi de DO près. Une valeur supérieure à 0,8 apparaît à la dilution 1/1000 et on peut craindre qu'avec d'autres animaux plus répondeurs, le système ne soit saturé. Ce test semble pouvoir être utilisé réellement entre les dilutions 1/1000 et 1/4000,

la dilution 1/8000 présentant des valeurs intermédiaires. Cet essai de dilutions a conforté notre choix de travail à 1/4000 ; les courbes ont effectivement la même allure à deux DO inférieures près mais le risque de saturation peut être considéré comme très faible avec la dilution 1/4000.

Figure 16 : Evolution de la réponse immune à l'immunisation à la congopaïne d'un animal, à différentes dilutions de sérums sur plaque low coating.

Enfin, de nombreuses hypothèses d'exploration de ce nouveau test C2 sont à étudier et une de celles-ci a été particulièrement testée : des animaux séropositifs ayant des valeurs d'hématocrite élevées seraient de bons répondeurs au test C2 alors que des animaux séropositifs ayant des valeurs d'hématocrite faibles seraient de mauvais répondeurs au test C2. Le test C2 pourrait alors être considéré comme un indicateur de tolérance qui à travers les réponses sérologiques anti-C2 évaluerait la capacité de tolérance des animaux prélevés. La méthode ainsi que les résultats sont présentés complètement en annexe 7.

La comparaison statistique des deux groupes d'animaux formés (à fort et faible hématocrite) ne met pas en évidence de supériorité de réponse au test C2 des animaux à fort hématocrite. L'hypothèse initiale avancée d'un lien entre la capacité de récupération et une réponse importante au test C2 n'est donc pas vérifiée. Un échantillonnage plus important devra être étudié pour confirmer ou infirmer ces observations.

De nombreux essais sont encore à réaliser sur ce nouveau test (étude de la sensibilité et spécificité, étude comparée des réponses d'animaux infectés et sains,…).

4.2.2 Suivi des réponses immunes

4.2.2.1 Première visualisation des résultats

Les résultats du suivi des réponses sérologiques par le test C2 de la première immunisation à un mois après la dernière injection sont représentés par la figure suivante :

Figure 17 : Suivi de la réponse humorale d'animaux trypanosensibles, trypanotolérants et métis suite aux trois immunisation à la C2 (en DO), à la dilution 1/4000 sur plaque low coating

La figure 17 présente la réponse humorale des dix animaux à l'immunisation à la C2 et indique tout d'abord que tous les animaux ont exprimé des immunoglobulines anti-C2.

Toujours d'après la figure 17, la répartition des réponses humorales anti-C2 est constituée pour tous les animaux immunisés de deux principales périodes. La première, du 10 mai au 19 juin, décrit une augmentation faible des taux d'immunoglobulines anti-C2, les moyennes des DO allant de 0,0711 au 10 mai à 0,11 au 19 juin. Ce premier « plateau » correspond au mois suivant la première immunisation.
La deuxième immunisation marque le début de la deuxième période (du 26 juin au 31 juillet), celle-ci est effectivement très rapidement suivie d'une augmentation brutale des DO (la moyenne des DO le 19 juin à 0,11 passe à 0,35 le 26 juin) puis de fluctuations autour de DO plus importantes (0,35 le 26 juin à 0,37 le 31 juillet).
La troisième immunisation est également suivie d'une augmentation de la valeur des DO des sérums des dix animaux mais la pente suivie par les dix distributions est moins forte que celle suivant la deuxième immunisation et l'écart entre les valeurs des DO est plus faible (moyenne des DO le 3 juillet à 0,348 passant à 0,447 le 10 juillet). Une partie des résultats statistiques est présenté dans l'annexe 5.

La réponse sérologique à l'immunisation à la C2 peut donc être décrite et analysée en deux temps : tout d'abord, les effets de la première injection puis ceux des deuxième et troisième injections.
4.2.2.2 Analyse des variances et covariances des données

La réponse de chaque animal est décrite par une série de 14 valeurs de DO, s'étalant du 10 mai au 31 juillet. Les observations obtenues pour chaque individu sont dépendantes.

Première méthode ou l'analyse des variances de données répétées.

- Phase 1 (10 mai au 19 juin) ou la réponse à la première immunisation :

La figure 17 décrit une réponse supérieure des zébus aux baoulés et une réponse des métis étalée entre les différentes DO des zébus et des baoulés.

L'analyse univariée décrit l'augmentation lente des moyennes des DO, allant de 0,0711 le 10 mai à 0,11 le 19 juin.

L'analyse des variances concernant les dix prélèvements sans tenir compte de la race met en évidence une différence significative - F = 12,482 supérieur à F(5,4) = 6,26 (9)- entre les différentes DO relevées ($p < 0,05$). Cette même analyse, prenant cette fois en compte le facteur race, n'aboutit pas à une différence des DO selon la race – F < F(5,4) – ($p > 0,05$).
On observe donc un effet date significatif qui correspond certainement à l'expression croissante des immunoglobulines anti-congopaïne dans le temps, il n'y a cependant pas d'interaction entre l'effet date et la race.

✔ Phase 2 (26 juin au 31 juillet) ou la réponse aux deuxième et troisième injections :

La figure 17 montre un pic important suivant le 19 juin puis des courbes de DO plus stables fluctuant autour de valeurs plus élevées. Au niveau de ce deuxième plateau, les courbes semblent toutes avoir la même allure à des valeurs de DO différentes. Les zébus ne montrent plus de réponse supérieure et on observe une hétérogénéité des réponses avec des animaux montrant des DO autour de 0,25 et d'autres autour de 0,6. Les réponses des dix animaux pour cette deuxième phase s'étalent sur une gamme importante de DO (0,124 à 0,621). Les métis semblent présenter des courbes hétérogènes mais au même titre que les zébus et les baoulés.

L'analyse univariée décrit le deuxième « plateau » avec des moyennes de DO allant de 0,348 à 0,447 et fluctuant autour d'une moyenne de 0,394.

L'analyse des variances concernant les dix animaux sans tenir compte de la race met en évidence une différence significative – F = 9,142 supérieur à F(5,4) = 6,26 – entre les DO aux différentes dates ($p < 0,05$). Cette même analyse, prenant en compte le facteur race, ne met pas de différence en évidence entre les DO des animaux des trois races – F < 6,26 – ($p > 0,05$).
Pour cette deuxième phase, on observe un effet date qui correspond aux vagues de réponses immunes suivant la deuxième et troisième immunisation. Il n'y a cependant pas d'interaction entre ces effets dates et la race des animaux. On ne peut donc pas mettre en évidence de différence significative entre les réponses immunitaires des animaux selon leur race.

Deuxième méthode ou l'analyse des variances entre le facteur race et une variable approchée des DO aux différentes dates.

Les résultats obtenus avec cette autre méthode rejoignent les conclusions précédentes. Qu'il s'agisse de la phase 1 ou de la phase 2, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs approchées de DO des dix animaux selon la race (annexe 5).

4.2.2.3 Distinction de deux groupes répondant différemment à l'immunisation

Par ailleurs, on observe sur la figure 17 deux groupes de réponses qui semblent distincts, l'un autour d'une valeur de DO de 0,3 et l'autre autour de 0,5. L'hypothèse alors à tester est que certains animaux répondent mieux que d'autres à l'immunisation, indépendamment du facteur de la race.
Soit G1, le premier groupe d'animaux dont les DO se situent, à la date du 31 juillet, autour de 0,5.
Soit G2, le deuxième groupe d'animaux dont les DO se situent, à la date du 31 juillet, autour de 0,3.

Le premier groupe est composé de deux métis, un baoulé et un zébu alors que le second groupe compte un zébu, un baoulé et quatre métis. Les animaux sont répartis dans ces deux groupes indifféremment de la race.

Une comparaison des moyennes des DO du 31 juillet, selon la loi de Student (observations indépendantes, à date fixée, à variances égales) a montré une différence significative entre les deux groupes (annexe 6). Le groupe 1 présente une moyenne significativement supérieure à celle du groupe 2. Des animaux semblent donc mieux répondre à l'immunisation à la C2 que d'autres et ceci indépendamment de la race.

4.2.3 Suivi de l'hématocrite et du poids

La figure 18 montre l'évolution de l'hématocrite des animaux de la première immunisation à un mois après la dernière injection. L'hématocrite est restée stable durant l'expérience et chaque animal présente un hématocrite normal. Le suivi de l'hématocrite est surtout intéressant lorsque les animaux sont infectés puisqu'un des symptômes majeurs de la trypanosomose est représenté par une chute de l'hématocrite. Le suivi de la valeur de l'hématocrite durant la phase d'immunisation a surtout permis de définir des hématocrites moyennes pour chaque animal, valeur de référence utile pour la période suivante de challenge trypanosomien.

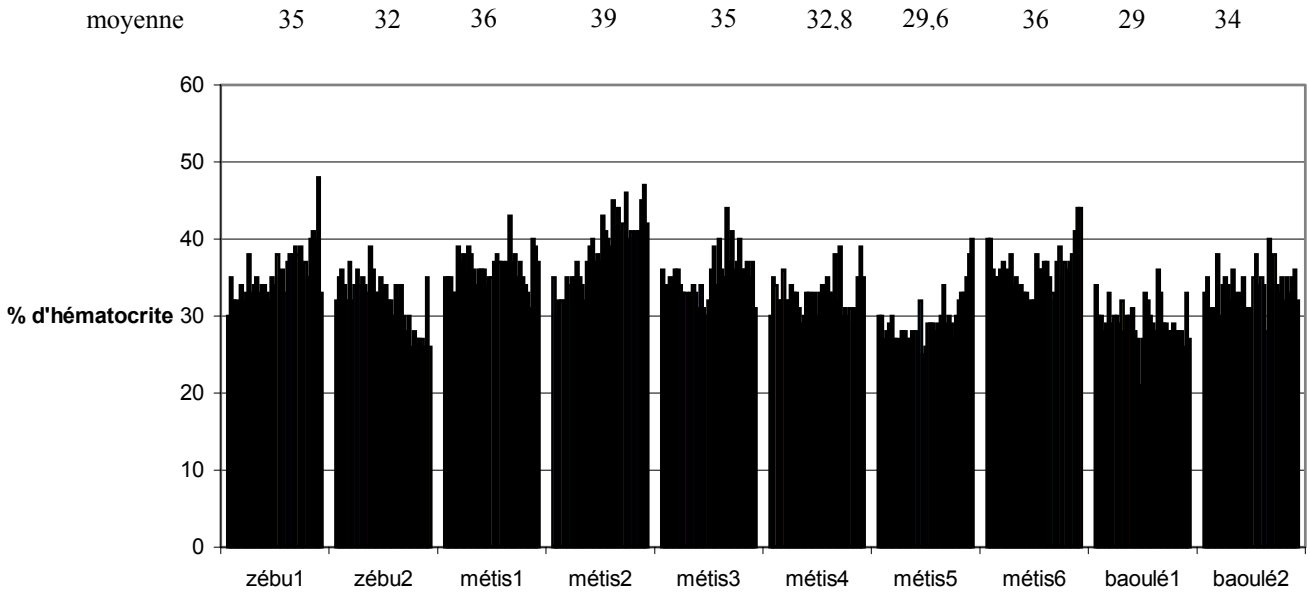


Figure 18 : Suivi de la valeur de l'hématocrite des dix animaux de la première immunisation à un mois après la dernière injection

4.2.4 Réactions locales au point d'injection

Une réaction inflammatoire aux points d'injection (figure 19) est apparue une dizaine de jours après la troisième immunisation seulement et a persisté durant deux semaines. Sur les deux côtés de l'encolure, huit animaux sur dix ont présenté ces masses indurées , non adhérentes aux tissus sous-cutanées pouvant atteindre la taille d'un poing, chaudes et non douloureuses. Celles-ci ont régressé sous une quinzaine de jours. Le protocole de fabrication du mélange immunisant ainsi que les injections ont pourtant été réalisés de la même façon que lors des deux premiers essais. Il faut noter une éventuelle réaction au point d'injection, bénigne et régressant, de ce mélange antigène C2 – adjuvant ISA 206. Ce type de réaction, bien que cliniquement inoffensive peut avoir des conséquences économiques, tant sur la valeur d'achat de la bête que sur l'inquiétude et le mécontentement des propriétaires face à une telle réaction. Cet effet indésirable est à prendre en compte très sérieusement dans l'optique d'une commercialisation éventuelle de ce produit.

Figure 19 : Réaction inflammatoire au point d'injection du mélange immunisant au niveau de l'encolure droite du zébu 431

4.3 Discussion

L'immunisation avec la protéine recombinante C2 a provoqué l'expression d'immunoglobulines anti-C2 chez tous les animaux immunisés, qu'ils soient trypanosensibles, trypanotolérants ou métis.

La synthèse d'anticorps s'est déroulée en plusieurs étapes : tout d'abord, une première expression d'immunoglobulines peu importante durant le mois suivant la première injection, puis quelques jours après la deuxième immunisation, un pic général de synthèse des anticorps et enfin un taux d'anticorps restant relativement stable autour des valeurs atteintes après le pic. La troisième injection a également relancé la réponse immune mais l'augmentation des DO est nettement moins importante qu'après le deuxième rappel. L'allure de ces courbes d'immunisation est classique avec une première période d'exposition à l'antigène puis une seconde période pendant laquelle le système immunitaire peut exprimer rapidement et massivement des anticorps face à un antigène connu.

La comparaison entre la réponse immune des dix animaux a révélé une différence significative entre chaque individu mais aucune distinction significative n'a pu être établie quand les DO des animaux sont comparées selon la race. Les réponses des animaux sont donc hétérogènes mais il semblerait qu'il n'y ait pas de relation avec la race. L'hypothèse initiale selon laquelle les métis pourraient répondre de façon plus hétérogène que les zébus et baoulés n'est pas vérifiée dans le cadre de cette étude préliminaire. De plus, les deux zébus de cette expérience ont montré une réponse vaccinale du même ordre de grandeur que celle des baoulés, contrairement aux résultats attendus. Il faut noter que les essais d'immunisation antérieurs (7 et document interne) se basaient sur un antigène vaccinal synthétisé dans des systèmes à baculovirus alors que la C2 utilisée pour ces essais a été produite par *Pichia pastoris*. Le degré de purification et d'efficacité de l'antigène vaccinal employé pour ces derniers essais est nettement supérieur à celui de la C2 produite en baculovirus.

Le choix des animaux pour les prochaines immunisations peut donc s'orienter sur les métis, animaux les plus répandus dans la région, puisque tous les animaux présentent le même type de réponse immune et que ceux-ci ne montrent pas une hétérogénéité de profils immuns supérieure.
Il faut cependant noter que les faibles effectifs de cette étude préliminaire nous incitent à interpréter l'ensemble de ces résultats avec précaution, la variabilité des réponses chez les zébus et baoulés ne pouvant être estimée sur seulement deux animaux. Quoiqu'il en soit, la

réponse quantitative des métis est satisfaisante et permet d'évaluer les effets vaccinaux sur ce type d'animaux.

Par ailleurs, un premier groupe d'animaux présente des DO significativement supérieures au deuxième groupe. Certains animaux présenteraient donc une meilleure capacité à produire des anticorps anti-C2 que d'autres face à la même stimulation. Cette capacité est donc indépendante de la race et de certains facteurs extrinsèques comme l'alimentation, l'état général, le statut physiologique,…Elle peut s'expliquer par des variations individuelles d'expression du système immunitaire ou par des facteurs inconnus à rechercher.

Les réactions locales aux points d'injection sont à prendre en compte pour la suite du projet. Dans le cadre d'une éventuelle commercialisation de ce vaccin, sa composition, notamment l'adjuvant, doit être modifiée. Ces réactions sont inattendues puisque les effets secondaires de ce type (formation d'abcès stériles suite à l'injection) sont théoriquement rares avec l'utilisation d'un adjuvant comme le Montanide ISA 206. Les injections ont été réalisées par le même technicien et moi-même pour les trois séries d'immunisations avec des conditions d'hygiène respectées à chaque fois.

Enfin, le test ELISA employé est de récente utilisation et ne possède pas encore de normes référentielles. Différents protocoles ont été essayés avant et pendant l'immunisation, le système est peu répondeur avec des animaux infectés alors qu'il est rapidement saturé avec des animaux immunisés si on ne dilue pas suffisamment les sérums. Il semble donc possible de distinguer facilement les animaux immunisés des animaux infectés par la haute différence de DO exprimée.
Nos essais préliminaires n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les réponses des animaux infectés et des indemnes. La quantité d'antigène C2 de coating étant restreinte, il nous a été impossible de tester cette différence (animaux infectés – animaux sains) sur un nombre élevé de sérums. Il faudra de même reconduire les analyses concernant l'hypothèse du test C2 indicateur de trypanotolérance avec un plus grand nombre de sérums à l'appui.

Une épreuve d'infection a pu être organisée dès début août, c'est-à-dire, un mois après la dernière immunisation. Cinq animaux témoins de l'étable du CIRDES ainsi que cinq de nos métis immunisés ont été infectés afin de voir les éventuels effets de l'immunisation sur l'établissement et l'évolution de la pathologie. Le suivi des animaux parasités est actuellement en cours.

La cinquième et dernière partie de ce document présente la mise en place et le début du suivi de l'infection des animaux.

5. Epreuve d'infection et suivi post-infection des animaux parasités

5.1 Matériel et méthode

La dernière immunisation ayant eu lieu le 1er juillet, il était alors intéressant de poursuivre l'expérience par une épreuve d'infection programmée début août. Les animaux métis restant de l'étable du CIRDES ont été testés à l'ELISA classique indirect et cinq d'entre eux se sont révélés négatifs. Cinq des six métis de l'essai d'immunisation ont été gardés pour subir l'épreuve d'infection et constituer ainsi deux lots de cinq animaux.

Des souris ont été inoculées avec la souche IL 1180 de *Trypanosoma congolense* et ont été sacrifiées une semaine plus tard afin de récolter les parasites sanguins (30,10). Chaque animal (cinq immunisés et cinq témoins) a reçu une dose de 10 000 trypanosomes dans la veine jugulaire le 31 juillet.

Pour le suivi des animaux infectés, trois prélèvements par semaine ont été organisés afin de surveiller la parasitémie et l'hématocrite. Un suivi de la température et du poids a complété la surveillance de la période de post-infection. Un traitement au Bérénil à la dose de 3,5 mg/kg est prévu pour des valeurs d'hématocrite inférieures à 18 et/ou pour un état de décubitus et anorexie dépassant quarante huit heures. Tous les animaux ont reçu la même ration alimentaire pendant la durée de l'expérience.

5.2 Résultat

Tout d'abord, au niveau de l'état général des bovins, un animal non immunisé a présenté une forme aiguë de trypanosomose, avec abattement, période de décubitus et état d'anorexie depuis 48 heures. Il a été traité au Bérénil à la dose stérilisante de 7 mg/kg. Il a été de ce fait exclu de la suite de l'expérience. Puis, trois animaux non immunisés ont également été traité au Bérénil à une dose de 3,5 mg/kg un mois après l'infection car ont présenté des valeurs d'hématocrite inférieures à 18. Il n'est donc resté à partir de la cinquième semaine post-infection qu'un seul animal non immunisé non traité pour les cinq animaux immunisés. Enfin, à 45 jours post-infection, seuls deux animaux immunisés n'ont pas été traités. Ainsi, à un mois et demi post-infection, sept des dix animaux ont été traités au Bérénil sur un critère d'hématocrite inférieur à 18 et un seul sur un critère d'état clinique critique. Un animal a été retiré de l'expérience car traité à une dose stérilisante. Les résultats suivants sont relatifs aux premiers quarante cinq jours post-infection correspondant à la phase d'invasion des trypanosomes.

5.2.1 Suivi de la parasitémie

Comme l'indiquent les figures 20 et 21, l'apparition de la parasitémie a été précoce, sept des dix animaux ont présenté un nombre conséquent de parasites dès le sixième jour post-infection. L'évolution des parasitémies a montré une rapide augmentation des valeurs pour atteindre les 10 000 parasites par millilitre de sang au bout du neuvième jour post-infection puis a fluctué autour de ce seuil pendant le reste de l'expérience. Les animaux immunisés ou non ont présenté deux profils de parasitémie différents avec élimination des populations parasitaires soit vers la troisième semaine post-infection (animaux immunisés 5099 et 5098, non immunisés 5283 et 5281) soit autour de la cinquième semaine (métis 433 et 5100) puis apparition de la nouvelle vague parasitémique.

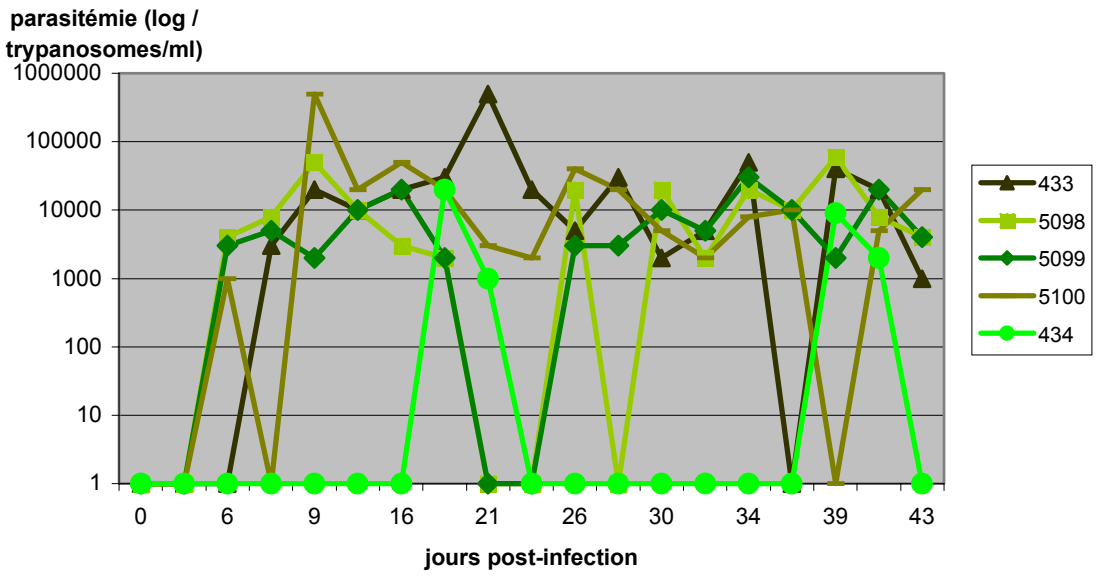


Figure 20 : Evolution de la parasitémie des animaux immunisés après infection à *T. congolense*

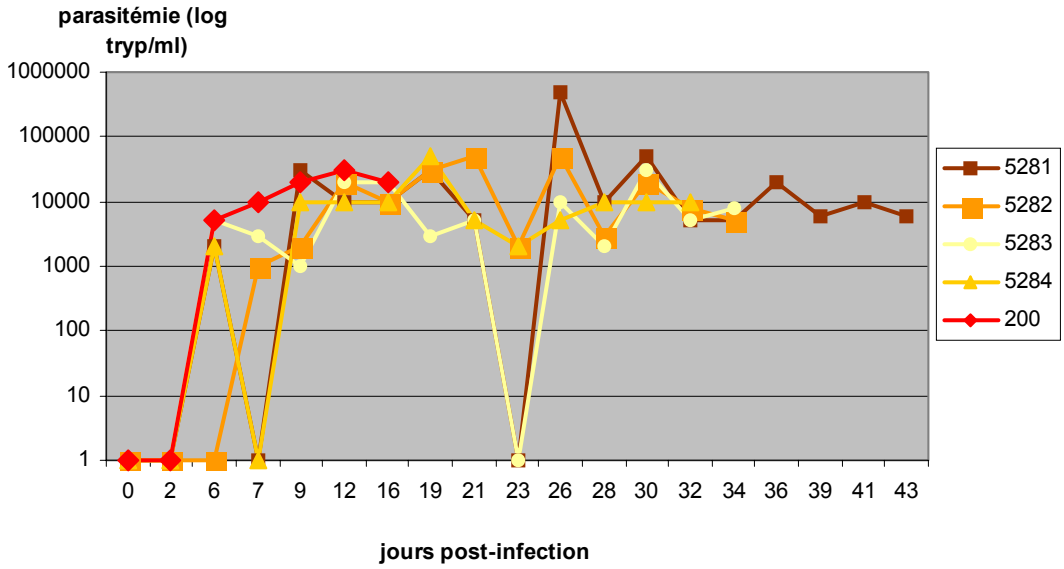


Figure 21 : Evolution de la parasitémie des animaux non immunisés après infection à *T. congolense*

Sur la figure 21, ne sont représentées que les valeurs de parasitémie avant traitement. L'animal 200 a été exclu de l'expérience car traité à une dose stérilisante. Les autres animaux traités (5282, 5283, 5284) ont vu leur parasitémie chuter rapidement après l'injection et dans le cadre d'une comparaison avec les animaux immunisés durant cette première phase, seules les valeurs avant traitement sont intéressantes.

Un animal immunisé (le 434) a cependant échappé aux profils parasitaires décrits et n'a montré sa première parasitémie qu'après la deuxième semaine post-infection (figure 20). La courbe de parasitémie de cet animal est inversée par rapport aux autres, la parasitémie montre un niveau nul sauf aux deux périodes précitées, la troisième et cinquième semaine post-infection.

Que les animaux aient été ou non immunisés, la parasitémie a fluctué autour des mêmes valeurs et a montré la même évolution avec échappement de populations parasitaires au système immunitaire des métis à deux périodes, la troisième ou la cinquième semaine post-infection. Il faut cependant noter qu'un métis a semblé mieux contrôler sa parasitémie tout au long de l'expérience, avec des échappements parasitaires rapidement maîtrisés.

5.2.2 Suivi de l'hématocrite

Les valeurs d'hématocrite des dix animaux ont commencé à chuter une semaine après l'infection et n'ont cessé de décroître de façon régulière et relativement homogène (figure 22). La quasi totalité des animaux est passée à un hématocrite inférieur à 30 dès la deuxième semaine et inférieur à 25 à partir de la troisième semaine. La majorité des animaux a montré des valeurs d'hématocrite inférieures à 20 dès la quatrième semaine post-infection.

Un mois et demi après l'épreuve, huit animaux sur dix ont présenté des hématocrites inférieures à 18 et il semblerait que les métis non immunisés aient atteint des valeurs d'hématocrite basses plus rapidement que les immunisés (interruption des courbes claires correspondant au traitement de Bérénil reçu).

L'animal 434, un métis immunisé, a présenté un profil d'hématocrite différent des autres animaux. Bien que de pente descendante, le tracé du suivi de son hématocrite est resté nettement supérieur à celui des autres animaux (figure 22). Cet hématocrite est quasiment demeuré supérieur à 30 durant l'expérience et est même remonté lors des derniers prélèvements. Cet animal a semblé non seulement mieux contrôler sa parasitémie mais aussi son état d'anémie.

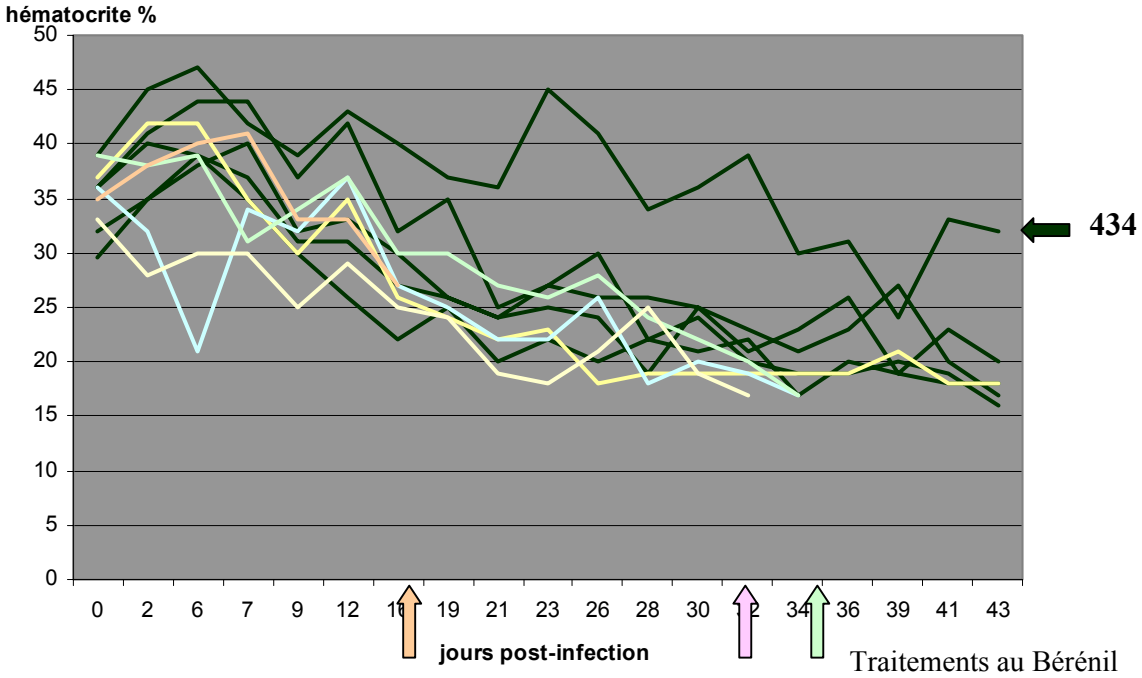


Figure 22 : Evolution de l'hématocrite des métis immunisés (courbes vert fonçé) et des non immunisés (courbes claires) après infection à *T. congolense*

5.3 Discussion

Indépendamment de leur état d'immunisation, neuf animaux sur dix ont présenté des parasitémies précoces, rapidement fluctuantes autour du même seuil et suivant le rythme d'apparition des sérodèmes. Un animal immunisé a cependant présenté une parasitémie quasi nulle avec deux pics vite maîtrisés. Le suivi des hématocrites a révélé la même « résistance » de cet animal 434 alors que l'ensemble des autres métis, immunisés ou non, a montré une chute constante et conséquente de l'hématocrite. Il faut cependant noter que les animaux non immunisés semblent avoir atteint des valeurs basses d'hématocrite plus rapidement que les animaux immunisés. Cette observation est à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux.

La quasi totalité des animaux a nécessité un traitement précoce interrompant le suivi de la phase invasive de l'infection. La primo-infection a donc atteint gravement ces animaux naïfs quelque soit l'état d'immunisation, avec peut-être une chute plus lente de l'hématocrite des animaux immunisés.

La protection conférée par cette immunisation est reconnue intervenir surtout pendant la phase de récupération, une fois la phase invasive dépassée (7). Nos animaux n'ont majoritairement pas réussi à passer cette phase critique, selon les critères définis, sans traitement trypanocide. Il nous est donc difficile de conclure sur les effets de cette immunisation pendant cette première phase.

Il faut alors se demander si la limite d'hématocrite inférieur ne devrait pas être fixée plus bas (15 par exemple) ou même à l'extrême décider de laisser les animaux traverser cette phase invasive sans traitement possible, jusqu'à ce que mort s'ensuive si nécessaire. Toutefois, dans ce cas, on risque d'assister à la mort d'un trop grand nombre d'animaux (immunisés ou non) pour permettre une interprétation statistique des résultats…

Pour les immunisations de terrain, 48 animaux séronégatifs en ELISA indirect vont être sélectionnés, immunisés en zone indemne et déplacés sur un site de forte pression parasitaire. Le choix d'animaux séronégatifs pour les essais d'immunisation permet effectivement de suivre l'évolution des réponses immunes sans aucune gêne d'expériences trypanosomiennes antérieures. Cependant, il est probable que ces animaux naïfs, placés sous forte pression parasitaire, souffrent de la primo-infection et que dans de nombreux cas, le traitement soit nécessaire. L'évaluation de l'efficacité de ce vaccin ne portera probablement pas sur la phase invasive mais uniquement sur la phase de récupération de l'infection. L'efficacité de cette immunisation est surtout connue au niveau de la phase de récupération des animaux atteints dans une optique de vaccin cocktail où cet antigène particulier, associé à d'autres, permettrait d'améliorer la récupération clinique post-infection.

CONCLUSION

L'immunisation des dix animaux en étable n'a pas confirmé l'hypothèse initiale de l'hétérogénéité des réponses immunes des métis comparées à celles des zébus et des Baoulés. Les profils immuns sont certes variés, une différence statistiquement significative a pu être mise en évidence mais indépendamment du facteur de la race. Les Baoulés n'ont pas montré de réponses immunes supérieures à celles des zébus mais il est difficile de conclure sur une comparaison à si faible effectif (deux zébus et deux Baoulés).

Les métis seraient donc d'aussi bons candidats que les zébus ou les Baoulés pour participer aux essais d'immunisation de terrain. Ce choix paraîtrait d'autant plus judicieux qu'ils représentent la majorité de la population cible en cas de commercialisation du produit.

Le nouveau test ELISA C2 (synthèse en *Pichia pastoris*), employé pour la détection des immunoglobulines G anti-C2, a été utilisé pour la première fois au début de mon stage. De nombreux essais sur sérums de référence et de terrain ont été nécessaires pour établir les gammes de valeurs atteintes à différentes dilutions et selon les deux protocoles proposés. Les résultats d'immunisation ont finalement été lues sur des plaques sensibilisées en low coating et à dilution 1/4000, la dilution 1/1000 présentant un risque de saturation du système non négligeable. De nombreuses lectures supplémentaires de plaques seront nécessaires pour établir les paramètres de référence relatifs à ce test.

L'infection à *Trypanosoma congolense* a montré une atteinte grave de tous les bovins, immunisés ou non, lors de la phase invasive. Un traitement a été nécessaire pour la majorité des animaux qui ont présenté un hématocrite inférieur à 18. Le suivi de la phase de récupération est en cours.

Les parasitémies ont rapidement augmenté puis ont fluctué autour des mêmes valeurs moyennes, que les animaux soient ou non immunisés. Ces parasitémies ont présenté des vagues classiques intermittentes correspondant au phénomène de variation antigénique des protéines de surface parasitaires. L'immunisation n'a pas semblé modifier la parasitémie pendant cette phase invasive.

La majorité des animaux a présenté un hématocrite inférieur à 18 avant le quarante cinquième jour post-infection. Les animaux non immunisés ont semblé atteindre des valeurs basses d'hématocrite plus rapidement que les animaux immunisés mais leur traitement précoce au Bérénil a empêché toute comparaison statistique.

Il aurait été intéressant de suivre l'évolution de l'ensemble des animaux durant toute la période invasive de l'infection. Il aurait fallu pour cela fixer soit une limite d'hématocrite inférieure plus basse soit ne pas en fixer du tout, la valeur de 18 est vraisemblablement trop élevée pour ce type d'infections. La valeur d'hématocrite limite devra être soigneusement réfléchie lors des essais d'immunisation de terrain, une valeur trop élevée empêchera un suivi correct de la phase invasive mais une valeur trop basse pourrait être fatale aux animaux et donc au suivi.

Cette étude a permis de vérifier la bonne efficacité de l'effet immunogène de la préparation à base de C2. L'adjuvant devra cependant être modifié car responsable d'abcès stériles au point d'injection, non acceptables en cas de commercialisation. La prochaine étape immunisation – infection sera réalisée dans des conditions naturelles sur une durée de suivi plus longue sur laquelle il sera possible d'analyser les éventuels effets bénéfiques de la vaccination.

Le concept de la vaccination anti-maladie, approche moderne de la lutte contre les pathologies parasitaires, s'il s'avère fructueux, pourrait s'appliquer à de nombreuses autres

parasitoses, tant animales qu'humaines, avec toutes les perspectives imaginables d'amélioration de la santé, des qualités de vie et de la productivité.

BIBLIOGRAPHIE

1/ AUTHIE E., C. D., FORCE-BARGE P., FREZIL J.L., GOUTEUX J.P., JANNIN J., LANCIEN J., LAVEISSIERE C., LEMESRE J.L., MATHIEU-DAUDE F., NITCHEMAN S., NOIREAU F., PENCHENIER L., TIBAYRENC M., TRUC P., (1991). Some new prospects in epidemiology and fight against human african trypanosomiasis. *In* "Research and reviews in Parasitology", Vol. 51, pp. 29-46.

2/ AUTHIE E., M. D. K., MBAWA Z.R., LONSDALE-ECCLES J.D., WEBSTER P., WELLS C.W., (1992). Identification of a 33-kilodalton immunodominant antigen of *Trypanosoma congolense* as a cysteine protease. *In* "Molecular and Biochemical Parasitology", Vol. 56, pp. 103-116. Elsevier Science Publishers B.V.

3/ AUTHIE E. (1993). Contribution à l'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans la trypanotolérance des taurins d'Afrique., Thèse pour le Doctorat ès Sciences de la Vie, Biologie-Santé, Bordeaux : Université de Bordeaux II, FRANCE.

4/ AUTHIE E., D. G., ROBERTSON C., WILLIAMS D.J.L., (1993). Antibody responses to a 33 kDa cysteine protease of *Trypanosoma congolense*: relationship to "trypanotolerance" in cattle. *In* "Parasite Immunology", Vol. 15, pp. 465-474.

5/ AUTHIE E., M. D. K., WILLIAMS D.J.L., (1993). Antibody responses to invariant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis. *In* "Parasite Immunology", Vol. 15, pp. 101-111.

6/ AUTHIE E. (1994). Trypanosomiasis and trypanotolerance in cattle: a role for Congopain? *In* "Parasitology Today", Vol. 10, pp. 360-364.

7/ AUTHIE.E, B. A., MUTETI D., LALMANACH G., GAUTHIER F., MUSOKE A.J., (2001). Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense*: targetting the disease rather than the parasite. *In* "International Journal for Parasitology", Vol. 31, pp. 1429-1433.

8/ BOULANGE A., S. C., BRILLARD M., MINET C., GAUTHIER F., DIALLO A., LALMANACH G., AUTHIE E., (2001). Functional expression of the catalytic domains of two cysteine proteinases from *Trypanosoma congolense*. *In* "International Journal of Parasitology", Vol. 31, pp. 1435-1440.

9/ BOUYER J. (1997). "Méthodes statistiques - Médecine - Biologie,"INSERM

10/ CIRDES (2001). "Diagnostic et contrôle des hémoparasitoses animales et leurs vecteurs," Marc DESQUESNES/Ed., Bobo-Dioulasso.

11/ CUISANCE D. (session 2001). "Glossines et trypanosomes," CIRAD, Montpellier.

12/ D'IETEREN G.D.M., A. E., WISSOCQ N., MURRAY M., (1998). Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomosis. *In* "Revue scientifique et technique de l'Office international des Epizooties", Vol. 17, pp. 154-175.

13/ DELAFOSSE A., B. Z., DUVALLET G., (1996). Use of Trypanosoma antigen detection ELISA during an epidemiological follow-up in the Sideradougou, Burkina Faso. (R. E. M. V. P. Trop, ed.), Vol. 49, pp. 32-37.

14/ DESQUESNES M. (1997). Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques : méthode, intérêts et limites. (R. S. T. O. I. Epiz, ed.), Vol. 16, pp. 809-823.

15/ DESQUESNES M., M. J. F., DE LA ROCQUE S., SOLANO P., MILLOGO L., BENGALY Z., SIDIBE I., CUISANCE D., (2001). Enquête parasitologique et sérologique (ELISA-indirectes) sur les trypanosomoses des bovins dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. (R. E. M. V. P. Trop, ed.), Vol. 24, pp. 251-263.

16/ DONELSON J.E., H. K. L., EL-SAYED N.M.A., (1998). Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *In* "Mol. Biochem. Parasitol.", Vol. 91, pp. 51-66.

17/ DUVALLET G. (1987). Trypanosomoses humaine et animake en Afrique de l'Ouest. Recherches épidémiologiques et immunoparasitologiques., Thèse pour le Doctorat de l'Université d'Orsay, FRANCE.

18/ FUMOUX F. (1987). Contribution à l'étude de la résistance naturelle des bovins aux trypanosomoses africaines., Thèse pour le Doctorat d'Etat-Sciences, Université d'Aix-Marseille II, Faculté des Sciences de Luminy, FRANCE.

19/ HIGUCHI R. (1989). PCR technology. *In* : Principles and applications for DNA amplification. Ed. H.A. ERLICH, Stockton Press, Stockton, U.K., 31-37.

20/ LUCKINS A.G. (1976). The immune response of Zebu cattle to infection with *Trypanosoma congolense* et *Trypanosoma vivax*. *In* "Annals of Tropical Medicine and Parasitology", Vol. 70, pp. 133-145.

21/ MURRAY M. (1987). Trypanotolerance, its criteria and genetic and environmental influences. ILCA/ILRAD, ed., pp. 133-145, Nairobi, Kenya.

22/ MURRAY M., D. T. M. (1988). Anaemia in bovine African trypanosomiasis. *In* "Acta trop.", Vol. 45, pp. 389-432.

23/ MURRAY M., MURRAY P.K., McINTYRE, W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 325-326

24/ MUSOKE A.J., NANTULYA V. M., BARBET A.F., KIRONDE F., McGUIRE T.C., (1981). Bovine immune response to African trypanosomes : specific antibodies to variable surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei. In* "Parasite Immunology", Vol. 3, pp. 97-106.

25/ NANTULYA V.M., M. A. J., RURANGIRWA F.R., BARBET A.F., NGAIRA J.M., KATENDE J.M., (1982). Immune depression in African trypanosomiasis : the role of antigenic competition. *In* "Clin. Exp. Immunol.", Vol. 47, pp. 234-242.

26/ PAGOT J. (1974). Les races trypanotolérantes. *In* "Les moyens de lutte contre les trypanosomoses et leurs vecteurs", Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, pp. 235-248, Paris.

27/ PEARSON T.W., B. R. P., WELBURN S.C., RUEPP S., RODITI I., HWA K.Y., ENGLUND P.T., WELLS C.W., MURPHY N.B., (2000). The major cell surface glycoprotein procyclin is a receptor for induction of a novel form of cell death in African trypanosomes in vitro. *In* "Mol Biochem Parasitol", Vol. 111, pp. 333-49.

28/ QUEVAL R. (1982). La glucose-6-phosphate déshydrogénase érythrocytaire chez des races bovines trypanosensibles et trypanotolérantes de l'ouest africain. *In* "Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux", Vol. 35. IEMVT.

29/ ROELANTS G.E. (1986). Natural resistance to African trypanosomiasis. *In* "Parasite Immunology", Vol. 8, pp. 1-10.

30/ SMITH C.J., L. R. A., MANSFIELD J.M., (1982). Cloning of African trypanosomes in mice immunosuppressed by cyclophosphamide treatment. (A. j. t. M. Hyg., ed.), Vol. 31, pp. 1098-1102.

31/ VOLLER A., BARTLETT A., BIDWELL D.E. (1976). Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 98-106

32/ WELLDE B.T., PRESTON J. M., KOVATCH R.M., HIGGS J., CHUMO D.A., (1989). *Trypanosoma congolense*: erythrocyte indices, plasma iron turn-over and effects of treatment in infected cattle. *In* "Annals of Tropical Medicine and Parasitology", Vol. 83, pp. 201-206.