

# PLAN

Table des illustrations .....	5
Résumé et mots clés.....	6
Introduction.....	7
Chapitre I : Trypanosomose à <i>Trypanosoma evansi</i> .....	8
1. Le parasite .....	8
1.1. Morphologie de <i>Trypanosoma evansi</i> (Steel 1885) Balbiani 1888 .....	8
1.2. Phylogénie.....	8
2. Répartition géographique, hôtes et effets sur l'hôte .....	9
2.1. Répartition géographique et principaux hôtes .....	9
2.2. L'immunodépression induite par <i>Trypanosoma evansi</i> .....	10
2.3. Lutte contre la maladie induite par <i>Trypanosoma evansi</i> .....	11
3. Transmission de <i>Trypanosoma evansi</i> .....	12
3.1. Transmission vectorielle .....	12
3.1.1. Transmission mécanique par les Tabanidés et les stomoxes .....	12
3.1.2. Transmission biologique par les vampires.....	13
3.2. Autres modes de transmission .....	13
3.2.1. Transmission par voie orale .....	13
3.2.2. Transmission congénitale.....	14
3.2.3. Transmission iatrogène .....	14
3.2.4. Transmission directe .....	14
4. Epidémiologie de <i>Trypanosoma evansi</i> .....	14
4.1. Cycle domestique chez les grands herbivores .....	14
4.2. Infection des carnivores .....	15
4.3. Cycle sauvage chez les petits animaux .....	15
4.4. Exploration des liens épidémiologiques .....	15
4.4.1. Rôle potentiel des tiques .....	15
4.3.2. Rôle potentiel des sanguins .....	15
Chapitre II : Evaluation de la transmission de <i>Trypanosoma evansi</i> par la sangsue .....	16
1. La sangsue : sa vie, son œuvre .....	16
1.1. Biologie de la sangsue .....	16
1.1.1. Classification et étymologie.....	16
1.1.2. Morphologie et anatomie .....	16
1.1.3. Comportement.....	17
1.1.4. Alimentation .....	18
1.1.5. Reproduction.....	18
1.1.6. Dynamique de croissance .....	19
1.2. La sangsue utilisée à des fins thérapeutiques.....	19
1.3. La sangsue en tant que vecteur de trypanosomes .....	20
2. La collecte et la conservation des sangsues .....	20
2.1. La collecte des sangsues .....	20
2.2. La conservation des sangsues .....	21
3. Evaluation de la présence de <i>Trypanosoma evansi</i> à l'état naturel chez la sangsue.....	22
3.1. Protocole .....	22
3.1.1. Dissection et prélèvements .....	22
3.1.2. Les glandes salivaires .....	23
3.1.3. Le liquide cœlomique .....	23
3.1.4. Le contenu intestinal .....	24

3.2. Mise en évidence de trypanosomes par observation directe .....	24
3.3. Mise en évidence de trypanosomes par PCR .....	25
3.3.1. Matériel .....	25
3.3.2. Méthode .....	25
3.3.3. Résultats .....	25
3.4. Discussion .....	28
4. Evaluation de la survie et de la localisation de <i>Trypanosoma evansi</i> dans la sanguine .....	29
4.1. Matériel et méthode .....	29
4.2. Résultats .....	30
4.2.1. Observations et inoculations .....	30
4.2.2. Résultats de l'analyse moléculaire par PCR .....	32
4.3. Discussion .....	34
5. Evaluation de la transmission expérimentale de <i>Trypanosoma evansi</i> par la sanguine .....	34
5.1. Etude préliminaire : Evaluation de l'infectiosité des sanguines récupérées sur le terrain ..	34
5.1.1. Matériel et méthode .....	34
5.1.2. Résultats .....	35
5.1.3. Discussion .....	35
5.2. Matériel et méthode .....	35
6.2. Résultats .....	36
6.3. Discussion .....	36
7. Conclusion sur le rôle de la sanguine en tant que vecteur de <i>Trypanosoma evansi</i> .....	36
 Chapitre III : Evaluation de la transmission de <i>Trypanosoma evansi</i> par ingestion de tiques contaminées.....	38
1. Transmission de <i>Trypanosoma evansi</i> chez la souris et le rat par ingestion de sang contaminé ..	38
1.1. Matériel et méthode .....	38
1.2. Résultats .....	38
1.3. Discussion .....	39
2. Transmission de <i>Trypanosoma evansi</i> par ingestion de tiques gorgées sur bovins infectés ..	39
2.1. Travaux préliminaires .....	39
2.2. Production de tiques gorgées sur bovins infectés .....	39
2.3. Essai de transmission aux rongeurs .....	41
3. Transmission de <i>Trypanosoma evansi</i> par ingestion de tiques gorgées sur rongeurs infectés ..	42
3.1. Travaux préliminaires .....	42
3.2. Production de tiques gorgées .....	42
3.3. Survie de <i>Trypanosoma evansi</i> dans les tiques du genre <i>Rhipicephalus</i> .....	44
3.4. Essai de transmission aux bovins .....	45
4. Conclusion sur la transmission de <i>Trypanosoma evansi</i> par ingestion de tiques contaminées ..	45
 Conclusion générale .....	47
 Références .....	48
 Annexe 1 : Protocole Geneaid d'extraction d'ADN à partir de sang congelé .....	53
Annexe 2 : Protocole Geneaid d'extraction d'ADN à partir de tissu .....	54
Annexe 3 : Protocole d'amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	55
Annexe 4 : Protocole d'un repas sanguin de sanguine sur rat et sur souris .....	56

# Table des illustrations

## Figures

Figure 1 : <i>Trypanosoma evansi</i> observé sur frottis de sang de rat après son isolement en Aveyron (cliché M. Desquesnes) .....	8
Figure 2 : Observation à la loupe binoculaire des appareils sensoriels visuels de sangsue (x 20) (cliché T. Vergne) .....	17
Figure 3 : Déplacement de la sangsue sur un support (clichés T. Vergne) .....	17
Figure 4 : Sangsue en plein repas sanguin sur un rat de laboratoire (cliché T. Vergne) .....	18
Figure 5 : Dynamique de croissance de <i>Haementeria ghilianii</i> de la forme juvénile au stade adulte arrivé à maturité sexuelle (d'après Sawyer et al. 1981) .....	19
Figure 6 : Observation des différences de taille entre une des plus grosses sangsues et une des plus petites (cliché T. Vergne) .....	21
Figure 7 : Conservation des sangsues (clichés T. Vergne) .....	22
Figure 8 : Observation de glandes salivaires de sangsue au microscope (état frais) (cliché T. Vergne) (x150) .....	23
Figure 9 : Etat du contenu intestinal chez la sangsue (état frais) (cliché T. Vergne) (x 400) .....	24
Figure 10 : Trypanosomatidés vivants observés dans le contenu intestinal d'une sangsue 4 jours après sa capture (état frais) (clichés T. Vergne) .....	24
Figure 12 : Gel d'électrophorèse 1 des produits de PCR obtenus avec les amores TRYP 1 à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sangsues récupérées sur le terrain .....	27
Figure 13 : Gel d'électrophorèse 2 des produits de PCR obtenus avec les amores TRYP 1 à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sangsues récupérées sur le terrain .....	27
Figure 14 : Gel d'électrophorèse 1 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sangsues récupérées sur le terrain .....	28
Figure 15 : Gel d'électrophorèse 2 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sangsues récupérées sur le terrain .....	28
Figure 16 : Trypanosomes observés dans le tube digestif 1 heure après le repas infectant (coloration EBM) (cliché T. Vergne) .....	30
Figure 17 : Trypanosomes morts dans le tube digestif de la sangsue 24 heures après un repas infectant (état frais) (cliché T. Vergne) .....	31
Figure 18 : Trypanosomes morts observés dans le contenu digestif de la sangsue à 14 jours post-infection (frottis colorés) (clichés T. Vergne) .....	32
Figure 19 : Gel d'électrophorèse 1 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sangsues expérimentalement infectées .....	33
Figure 20 : Gel d'électrophorèse 2 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sangsues expérimentalement infectées .....	33
Figure 21 : Boophilus microplus femelles en ponte (cliché T. Vergne) .....	40
Figure 22 : Sacs à tique posés sur le bovin (cliché T. Vergne) .....	40
Figure 23 : Vêtements des rats pour protéger les tiques .....	43
Figure 24 : Vêtements collés sur les rats .....	43
Figure 25 : Tiques gorgées fixées sur un rat infecté (cliché T. Vergne) .....	44

## Tableaux

Tableau 1 : Résultats de la collecte de tiques gorgées sur bovins infectés .....	41
--	----

## Résumé et mots clés

Résumé :

Afin d'évaluer les liens qui existent entre les grands ruminants (bovins, chevaux...) et les petits rongeurs concernant la maladie induite par *Trypanosoma evansi*, cette étude s'est concentrée sur les modalités de transmission par la sangsue *Hirudinaria manilliensis* et par les tiques. Tout d'abord, quelques sangsues récupérées sur le terrain (7/13) se sont révélées porteuses d'ADN de *Trypanosoma evansi*. Il a ensuite été montré que le parasite, une fois ingéré par la sangsue, restait confiné dans le tube digestif et qu'il y mourrait en quelques heures. L'ADN était quant à lui détectable pendant plus de 30 jours dans le contenu digestif de la sangsue. Aucun des 18 essais de transmission, réalisés de 30 minutes à 30 jours après le repas infectant des sangsues sur des rats infectés, n'a provoqué de passage du parasite à des rats sains lors d'un repas révélateur. Au vu de tous ces résultats, il semble que la sangsue *Hirudinaria manilliensis* n'est pas un bon vecteur de *Trypanosoma evansi*. Afin, d'évaluer la transmission du parasite par ingestion de tiques gorgées sur animal contaminé, des expériences préliminaires ont précédé les essais de transmission. Pour s'assurer du possible passage du parasite à travers la muqueuse buccale, des rats et des souris ont consommé 1ml de sang contaminé. Les rats ont présenté une forte parasitémie dès 3 jours après l'ingestion des parasites. Les souris, quant à elles, sont restées négatives tout au long du suivi. La survie de *T. evansi* dans l'organisme de la tique a aussi été étudiée. Il est apparu que le parasite est capable de survivre entre 2 et 4 heures dans les tiques du genre *Rhipicéphalus*. Au vu de ces deux résultats préliminaires, il paraissait justifié de réaliser des transmissions expérimentales. Des tiques du genre *Boophilus* se sont gorgées sur des bovins splénectomisés infectés mais la très faible parasitémie a provoqué l'échec de la transmission aux rongeurs. Des tiques du genre *Rhipicéphalus* se sont gorgées sur des rongeurs infectés. Les essais de transmission aux bovins par ingestion de ces tiques sont restés négatifs. Le faible nombre de tiques récoltées a empêché de tester la transmission de rongeur à rongeur par ingestion de tiques contaminées.

Mots clés :

*Trypanosoma evansi – sangsue – transmission – tique – rongeur – Thaïlande*

Abstract :

In order to investigate the infection route of small rodents in Thailand by *Trypanosoma evansi*, we focused on transmission by *Hirudinaria manilliensis* leeches and by ingestion of contaminated ticks. First of all, a few leeches (7/13) collected on the field and tested with PCR methods, were found to be positive for *T. evansi*. Then, when evaluating the survival of the parasites in the leech, it appeared that, the parasite is incapable of leaving the gut compartment, and that it dies there in 2 or 3 hours. Nevertheless, we can detect with PCR methods the *T. evansi* DNA in the gut for more than 30 days. Any of the 18 transmission tries by leeches from an infected rat to a healthy one, was successful. Regarding these results, it appeared that *Hirudinaria manilliensis* seems to be not a good vector for *T. evansi*. Before testing the transmission of the parasite by ingesting infected ticks, 2 preliminary investigations have been conducted. First, we verified that *T. evansi* is able to infect a rodent by oral route. Two rats and two mice were fed respectively with 1ml and 0, 3 ml of infected blood. The rats were found to be highly positive in 3 days whereas the mice were negative during all the follow up. Then, the survival of the parasite in the tick was evaluated. It appeared that *T. evansi* can survive in *Rhipicephalus* ticks between 2 and 4 hours. Finally, transmission tries were conducted. First, *Boophilus* ticks were fed on two splenectomised and infected bovines but they had a very low parasitemia that leaded to failure: the rats that ate the ticks never presented parasites in the blood. Then, *Rhipicephalus* ticks were fed on infected rats. The cattle that ate the engorged ticks never presented any parasite in the blood. Only a few ticks have been collected on the infected rats so we didn't have enough ticks to test the transmission from a rodent to another.

Keywords :

*Trypanosoma evansi – leech – transmission – tick – rodent - Thailand*

## Introduction

*Trypanosoma evansi* est un parasite sanguin provoquant le surra, la trypanosomose la plus largement répartie dans le monde. Cette maladie affecte de très nombreuses espèces animales dont beaucoup ont une grande importance économique. Ainsi les buffles, les bovins, les chevaux et les camélidés sont les principales espèces domestiques touchées. L'impact de cette trypanosomose, souvent sous estimé, est cependant très important, car, outre la mortalité que ce parasite occasionne notamment chez les camélidés et les équidés, il peut aussi être responsable de troubles de la reproduction, de retards de croissance et de chutes de production. Contrairement aux autres trypanosomes africains, *Trypanosoma evansi* s'est affranchi de la zone de répartition des glossines par adaptation à une transmission purement mécanique. Pouvant dès lors se transmettre par l'intermédiaire de tout insecte hématophage, et principalement ceux du genre *Tabanus*, il a pu s'implanter dans de très nombreuses régions du globe. *Trypanosoma evansi* est aussi capable d'infecter certains hôtes si ces derniers consomment de la viande ou du sang contaminé comme cela se produit chez les chiens ou même chez les chauves-souris vampires d'Amérique du sud qui jouent là bas un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie. Les réservoirs sauvages, aussi très nombreux, sont représentés principalement par les capybaras et les cervidés. Enfin, des petits rongeurs sont régulièrement infectés ce qui n'est pas sans soulever certaines questions quant à leur mode de contamination. En effet, les périodes d'activité nocturnes voire crépusculaires de ces petits rongeurs ne coïncident pas avec celles essentiellement diurnes des vecteurs classiquement impliqués dans la transmission du Surra. D'autres modes de contamination sont donc à considérer. Du fait des conséquences de cette trypanosomose, une meilleure compréhension des liens épidémiologiques gouvernant l'étendue et l'endémicité de la maladie s'avère très importante.

La présente étude vise à éclaircir les liens éventuels qu'il existe entre les rongeurs et les grands herbivores à travers différents modèles. Elle se fixe plusieurs objectifs : le premier, essentiellement bibliographique, consiste en une synthèse des connaissances actuelles de la maladie induite par *Trypanosoma evansi* ainsi que de son épidémiologie, en insistant sur les différentes modalités connues de transmission. Le deuxième objectif est d'évaluer le rôle des sangsues dans la transmission du parasite. En effet, en Thaïlande, dans certaines régions où cohabitent bovins et rongeurs, peuvent aussi se retrouver des sangsues parfois présentes en très grand nombre. Largement documenté concernant la transmission des trypanosomes du monde marin, le rôle de ces annélides dans la transmission des trypanosomes des mammifères est très peu connu. L'implication dans l'épidémiologie de *Trypanosoma evansi* de la sangsue aquatique *Hirudinaria manilliensis*, aussi appelée « sangsue du buffle », sera étudiée. Le troisième et dernier objectif est d'évaluer une possible transmission de *Trypanosoma evansi* par ingestion de tiques gorgées sur un animal présentant une parasitémie. Ainsi un rongeur pourrait s'infecter en consommant une tique gorgée sur un bovin infecté et vice versa. D'après cette même hypothèse, les tiques pourraient aussi permettre au parasite de se disséminer de rongeur à rongeur si ces derniers les consomment.

# Chapitre I : Trypanosomose à *Trypanosoma evansi*

## 1. Le parasite

### 1.1. Morphologie de *Trypanosoma evansi* (Steel 1885) Balbiani 1888

*Trypanosoma evansi* est un parasite extracellulaire, sanguin et tissulaire. C'est un protozoaire que l'on ne rencontre que sous sa forme sanguine, qui est sensiblement la même que celle de *T. brucei*. Cette forme sanguine, dans sa présentation la plus courante appelée forme longue, a une taille comprise entre 15 et 34 µm avec une moyenne de 24 µm et une largeur de 3 à 5 µm. *T. evansi* est considéré comme un parasite au polymorphisme très limité car, bien qu'il soit possible de rencontrer des formes intermédiaires voire des formes trapues, celles-ci restent très rares. *T. evansi* possède un flagelle avec une partie libre courte (3 – 5 µm) qui est parfois inexistant dans les formes trapues. Sa membrane ondulante est très développée ce qui peut provoquer des poches de lumière si le parasite est observé à l'état frais en contraste de phase. Il possède le plus souvent un kinétoplaste, qui est de petite taille (0,6 µm) et en position subterminale. L'extrémité postérieure est effilée ou parfois tronquée (cf. Figure 1).

Les mouvements de *T. evansi* sont rapides, mais ses déplacements réels sont limités contrairement à d'autres trypanosomes (*T. vivax*, *T. lewisi*).

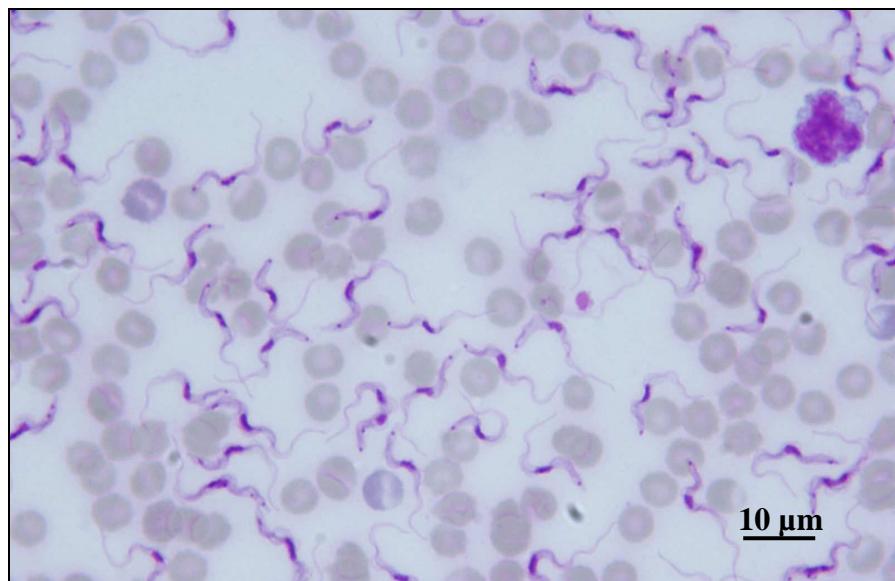


Figure 1 : Trypanosoma evansi observé sur frottis de sang de rat après son isolement en Aveyron (cliché M. Desquesnes)

### 1.2. Phylogénie

*Trypanosoma evansi* appartient au sous genre *Trypanozoon*, qu'il partage avec *T. brucei* et *T. equiperdum*, l'agent de la dourine. Du fait de l'observation d'une forte homogénéité génétique, Hoare est le premier à avoir avancé que *T. evansi* dériverait de *T. brucei* (Hoare 1972). *T. evansi* aurait évolué à partir de ce dernier par adaptation à une transmission uniquement mécanique due à une perte partielle ou totale de l'ADN kinétoplastique (Borst et al. 1987). Cette perte empêche le parasite de passer au stade procyclique, rendant impossible la multiplication dans la glossine. Le parasite reste alors bloqué au stade de trypomastigote sanguin et ne doit sa propagation qu'à la transmission mécanique. Hoare suggère que l'émergence de *T. evansi* aurait eu lieu chez les dromadaires de la Corne de l'Afrique dont la répartition géographique se trouve à la limite de celle des glossines. Le protozoaire aurait ainsi réussi à adapter sa transmission en l'absence du vecteur généralement impliqué (Hoare 1972). Le parasite se serait ensuite propagé à l'Inde puis à l'Asie.

Cette expansion est datée à plusieurs siècles avant J.C (Vittoz 1955), bien que certains auteurs remettent en cause ces données en ne faisant remonter l'arrivée du parasite en Asie qu'à une centaine d'années (Reid 2002). *T. evansi* aurait gagné le continent sud-américain du fait de l'importation de chevaux infectés avec les conquistadors espagnols au XVIème siècle (Hoare 1972).

Malgré cette très large répartition mondiale, il a été montré que les souches de *T. evansi* étaient très homogènes quels que soient l'hôte et la région du monde concernés. Cette très faible hétérogénéité génétique est marquée aussi à plus grande échelle, au niveau de tout le sous genre *Trypanozoon* (Ventura et al. 2002). Grâce à des études d'amplification aléatoire d'ADN, Ventura a aussi montré qu'il existait un fragment d'ADN spécifique de *T. evansi* présent dans toutes les souches considérées, mais qui était absent de *T. brucei*. Ce fragment témoignerait de la présence d'un ancêtre commun, soutenant la thèse d'une émergence unique de *T. evansi* à partir de *T. brucei*.

Depuis de très nombreuses années, *T. equiperdum*, *T. brucei* et *T. evansi* sont considérés comme des espèces à part entière du fait des grandes différences de spectre d'hôte, de pathogénie et de mode de transmission. Récemment, grâce à des outils de caractérisation moléculaire, des chercheurs seraient arrivés à la conclusion que *T. evansi* n'appartiendrait pas à une classe monophylétique. Il ne serait qu'une sous espèce de *T. brucei*, et par là, verrait son nom changer en *Trypanosoma brucei evansi* (Lai et al. 2008).

Ces thèses contradictoires ne sont donc pas résolues à ce jour.

## 2. Répartition géographique, hôtes et effets sur l'hôte

### 2.1. Répartition géographique et principaux hôtes

*T. evansi* est un parasite pathogène surtout pour les camélidés, les équidés, ainsi que pour les carnivores et dans une moindre mesure pour les éléphants d'Asie, les porcs et les petits ruminants. La virulence est très marquée chez les camélidés mais selon les souches et les régions, la maladie peut être aiguë ou chronique. Les bovins sont globalement peu sensibles mais les buffles du Sud-est asiatique présentent souvent une maladie aiguë (Itard 1981).

Du fait de sa très large répartition géographique, la trypanosomose à *T. evansi* possède de multiples appellations : surra (Inde, mais c'est maintenant la dénomination la plus courante), el debab qui veut dire « maladie de la mouche » (Maghreb), guifar (Tchad), tahaga (Mali), doukane (Ethiopie), murrina (Mexique), mal de Cadeiras (Amérique latine) (Hoare 1972).

*T. evansi*, est présent en Afrique du Nord, de la Mauritanie à l'Egypte, où le dromadaire est la cible la plus commune. Infecté par *T. evansi*, le dromadaire peut présenter une forme aiguë ou une forme chronique plus fréquente. Dans sa forme aiguë, la maladie provoque une faiblesse générale, une hyperthermie, un amaigrissement rapide, une démarche chancelante. On peut aussi observer des poils ternes, du larmoiement, des pétéchies sur la conjonctive, une chute de la lactation, ou encore des œdèmes, des complications pulmonaires et parfois, des manifestations nerveuses (Itard and Frézil 2003). La présence d'urée dans le sang a été mise en évidence (Gutierrez et al. 2006b) ainsi que des déchets du métabolisme des trypanosomes dans le sang et l'urine (Hussein and Gasmir 1993) conférant à l'urine une odeur acre caractéristique. Le parasite est parfois responsable de troubles de la reproduction avec des avortements et de la mortalité néonatale (Gutierrez et al. 2005). La mortalité est très élevée dépassant souvent les 50 %. La mort peut survenir entre 10 jours et 4 mois. La forme chronique, représentant 80 à 90 % des cas, se caractérise par une fièvre intermittente, de l'anémie et un amaigrissement. Ces phases fébriles coïncident avec des pics de parasitémie, et durent généralement de 2 à 8 jours. En dehors de ces accès, le dromadaire est normal. Il a récemment été montré en Egypte que l'infection par *T. evansi* chez les dromadaires provoquait un stress oxydatif caractérisé par une augmentation de la concentration sanguine en oxyde nitrique provoquant des désordres biochimiques significatifs (Saleh et al. 2009). Une auto-guérison (self-cure) peut parfois survenir comme cela a été montré sur un chameau en Mauritanie (Dia et al. 1997b) ou sur des moutons (Onah et al. 1996)

En Afrique sahélienne, du Sénégal à la Somalie, les animaux les plus touchées sont les bovins qui présentent la plupart du temps des infections chroniques assez longues voire asymptomatiques avec des parasitoses très basses (Dia and Desquesnes 2007). Exceptionnellement, ces parasitoses peuvent être plus élevées entraînant de l'anémie, de la fièvre et des troubles de la reproduction. La chèvre est aussi réceptive à l'infection, mais elle est naturellement peu sensible (Gutierrez et al. 2006a). Le seul réservoir sauvage cité dans la littérature y est constitué par l'antilope (Rottcher et al. 1987).

En Amérique du Sud, sur un territoire s'étendant du Mexique à la Patagonie, la principale espèce touchée est le cheval. La maladie y est présente soit sous une forme atténuée soit sous une forme nerveuse caractérisée par de l'incoordination motrice, un balancement de la croupe, une somnolence, et une paralysie générale occasionnant le plus souvent la mort de l'animal (Desquesnes 2004). Récemment, et ce pour la première fois du vivant de l'animal, il a été mis en évidence des parasites dans le liquide céphalo-rachidien et à l'intérieur même du système nerveux d'un cheval parasité (Berlin 2009). En Amérique du Sud, de nombreuses espèces peuvent jouer le rôle de réservoir sauvage comme les chauves-souris vampires (Hoare 1965), le capybara (Herrera et al. 2004), le pécari à collier, le pécari à lèvres blanches (Herrera et al. 2008)...

En Asie du Sud-est (Birmanie, Indonésie, Malaisie, Philippines, péninsule indochinoise et Chine méridionale), les cibles les plus importantes économiquement sont les chevaux et les zébus. Chez ces derniers, la mortalité peut atteindre 30 à 50 %. L'infection des chevaux occasionne sensiblement les mêmes signes que chez les dromadaires en Afrique et conduit généralement à une issue fatale. L'infection chez les bovins tendrait à gagner en importance du fait de l'observation d'importantes épidémies à forte mortalité aux Philippines (Reid 2002). Il a été aussi montré en Thaïlande, que le porc peut héberger l'infection (Holland et al. 2003) bien que les signes cliniques y soient le plus souvent bénins (Tuntasuvan and Luckins 1998). En Indonésie, ont été mis en évidence en tant que réservoir sauvage, le cochon sauvage et surtout le cerf rusa (*Cervus timorensis rusa*) qui semble présenter des parasitoses plus longues et plus élevées (Reid et al. 1999)

En Asie mineure et centrale (Irak, Iran, Inde), les espèces les plus touchées sont les dromadaires et les chameaux de Bactriane. C'est en Inde qu'ont été rapportés les premiers cas humains de trypanosomose à *T. evansi* faisant craindre une adaptation du parasite à l'espèce humaine (Joshi et al. 2005). Bien que dans le cas le mieux documenté, le patient souffrait d'une déficience en apolipoprotéine L1, trypanocide naturel conférant aux humains une immunité innée aux trypanosomoses animales, le potentiel zoonotique de *T. evansi* reste à étudier et à surveiller (Vanhollebeke et al. 2006). Il a aussi été démontré expérimentalement que le parasite pouvait être hébergé par des pigeons (Mandal et al. 2008) soulevant de nombreuses questions quant au rôle des oiseaux dans l'épidémiologie de *T. evansi*. Enfin, pour la première fois chez des ours, des ours noirs d'Himalaya (*Selenarctos tibethanus*) ont été identifiés comme hébergeant *T. evansi*. La parasitose était visible et des signes cliniques marqués (Muhammad et al. 2007). Au Rajasthan, les cerfs axis et sambar ont été identifiés comme des réservoirs sauvages (Singh 1998).

Le parasite est aussi présent au Proche Orient, dans la péninsule arabique ainsi qu'en Europe de l'Est (Bulgarie, région du Caucase, Russie centrale). Il a même été décrit dans les îles de l'océan Indien (Île Maurice, la Réunion) qui représentent la localisation la plus méridionale du parasite (Hoare 1972).

## 2.2. L'immunodépression induite par *Trypanosoma evansi*

*Trypanosoma evansi* interagit avec le système immunitaire de son hôte à deux niveaux : d'un côté, la variabilité de ses antigènes de surface lui permet d'installer durablement l'infection ; de l'autre, le parasite est capable de causer une immunodépression qui semble affecter à la fois la réponse à médiation cellulaire et celle à médiation humorale. Cette immunodépression est la manifestation clinique la moins visible mais peut être la plus importante de l'infection à *T. evansi*. L'immunodépression induite semble être liée principalement aux macrophages qui entraînent une inhibition de la prolifération des lymphocytes T (Onah et al. 2000). Cependant, bien qu'on les sache très impliqués dans l'immunosuppression induite par les trypanosomes transmis par les glossines

(Olsson et al. 1991), les lymphocytes T CD8+ semblent ne pas jouer de rôle important dans l'immunosuppression induite par *T. evansi* (Onah et al. 2000). L'impact de ces lymphocytes est donc variable d'une espèce de trypanosome à l'autre et d'un hôte à l'autre. En outre, une prolifération de plus de 70 % des lymphocytes B interviendrait aussi dans cette immunodépression, par production d'une grande quantité d'anticorps non spécifiques (Onah et al. 1998). Enfin, une étude récente montre qu'il existe un facteur pro-nécrotique protéique dans la membrane du trypanosome qui pourrait jouer un rôle dans la lymphopénie. Ce facteur serait activé par contact direct avec les lymphocytes (Antoine-Moussiaux et al. 2009).

Ces capacités immuno-suppressives de *T. evansi* posent de nombreux problèmes, car la diminution des réponses à médiations cellulaire et surtout humorale contre des antigènes hétérologues peut fortement compromettre l'efficacité des vaccinations. D'après Shahsavandi citant les travaux de Ahmad, cette interaction a été mise en évidence dès 1991 chez des cochons d'Inde, chez qui une seule injection de parasites provoquait une diminution significative de la réponse en anticorps à une infection par le virus de la fièvre aphteuse (Shahsavandi et al. 2001). De plus, il a été démontré au Vietnam que la réponse en anticorps chez les buffles suite à la stimulation par de l'albumine sérique humaine, était significativement diminuée chez les animaux infectés par *T. evansi* (Holland et al. 2001). De même, toujours chez les buffles, la réponse inflammatoire au site de vaccination contre *Pasteurella multocida* est nettement plus faible chez les animaux infectés que chez les animaux sains (Holland et al. 2001). Ceci peut s'expliquer par une diminution du nombre de lymphocytes T, cellules fortement impliquées dans les réactions inflammatoires locales. Enfin, chez les porcs, même si *T. evansi* est considéré comme peu pathogène, ce parasite peut interférer avec la vaccination contre la peste porcine classique, expliquant la faible efficacité des campagnes de vaccination dans les zones endémiques à *T. evansi* au Vietnam (Holland et al. 2003). Il apparaîtrait donc judicieux de mettre en place des traitements trypanocides précédant les campagnes de vaccination.

L'immunodépression induite par les infections à *T. evansi*, permettraient aussi le développement plus facile de maladies intercurrentes. Ainsi, il a été montré qu'une infection à *T. evansi* chez les chèvres, altère significativement la résistance à *Haemonchus contortus* : la période prépatente se voit diminuée, les signes cliniques plus marqués et la mortalité plus élevée (Sharma et al. 2000)

### 2.3. Lutte contre la maladie induite par *Trypanosoma evansi*

Du fait de la grande variabilité des antigènes de surface du parasite, il n'existe pas de vaccins contre la trypanosomose. De plus, la prolificité très importante des Tabanidés en comparaison de celle des glossines, ainsi que le très large spectre de vecteurs potentiels, rendent le plus souvent la lutte vectorielle beaucoup plus difficile que dans le cas des trypanosomoses africaines (Desquesnes et al. 2005). La chimiothérapie est donc toujours la méthode de choix pour lutter contre la maladie.

La lutte chimique contre *T. evansi* a débuté dès les années 1940-1950 avec l'apparition de la première molécule, la quinapyramine. Actuellement, le nombre de molécules disponibles sur le marché reste très faible car, pour des raisons économiques, les firmes pharmaceutiques ne s'y intéressent guère, et s'investissent peu dans la recherche. Depuis 1965, une seule nouvelle molécule a été mise sur le marché. Il s'agit de la mélarsamine, qui ne possède encore qu'une AMM pour les dromadaires. Dans le traitement des trypanosomoses à *T. evansi*, 4 molécules sont principalement disponibles : la quinapyramine, l'acéturate de diminazène, le chlorure d'isométhamidium et la mélarsamine.

La quinapyramine est la première molécule à avoir été commercialisée. Très utilisée depuis les années 1950, beaucoup de souches de *T. evansi* lui sont devenues résistantes. Sa production a été arrêtée en 1974. La molécule est réapparue en 1984 sous forme de sulfate de quinapyramine dans un objectif thérapeutique, et sous forme de chlorure de quinapyramine dans un objectif prophylactique (Schillinger and Röttcher 1986). La résistance de *T. evansi* à la quinapyramine est de plus en plus mise en évidence comme le montrent des études au Soudan (El Rayah et al. 1999) ou en Chine (Zhou et al. 2004).

Le chlorure d'isométamidium est une molécule qui semble peu active à l'égard de *T. evansi*. Chez le dromadaire, une injection de 1 mg/kg permet seulement de limiter les signes cliniques pendant 2 à 3 semaines (Balis and Richard 1977a). De plus, cette molécule semble très毒ique pour les animaux infectés comme cela a été montré sur les chevaux (Bouchard and Dick 1962), les chèvres (Toure 1973) ou les dromadaires (Balis and Richard 1977b). Enfin, de fortes résistances sont fréquemment associées (Zhang et al. 1992) (Mamadou 2006).

L'acéturate de diminazène possède des propriétés curatives très bonnes ainsi que de nombreux avantages (grande activité, bonne stabilité et faible toxicité) rendant son utilisation facile. La posologie indiquée est de 7 mg/kg. Expérimentalement, il a été montré que la dose efficace varie grandement selon les espèces infectées. Ainsi, 3,5 mg/kg traite avec succès des truies infectées (Sirivan et al. 1995) alors que des doses de 5 mg/kg restent inefficaces sur les buffles (Pholpark et al. 1984). C'est la molécule la plus largement utilisée en Thaïlande, mais le plus souvent à la dose de 3,5 mg/kg. Or, sur les chevaux en Thaïlande, il a été montré que cette dose n'est pas suffisante pour éliminer le parasite (Tuntasuvan et al. 2003). Ce sous-dosage pourrait donc être à l'origine des échecs thérapeutiques souvent observés dans la région. Les résistances sont encore peu fréquentes même si elles sont parfois décrites (Zhang et al. 1992) (Mamadou 2006).

La mélarsamine, dernière molécule mise sur le marché en 1992 suite à de mauvaises tolérances aux autres molécules et l'apparition de souches résistantes, est une molécule très efficace chez les dromadaires et qui semble aussi très prometteuse chez les équidés et les bovidés. Lors des essais thérapeutiques chez le dromadaire, il a été montré qu'une dose de 0,625 mg/kg permettait de traiter un animal en 24h et de le protéger pendant plus de 65 jours sans entraîner d'effets secondaires (Tager-Kagan et al. 1989). Il a ensuite été prouvé que cette dose pouvait être diminuée jusqu'à 0,25 mg/kg (Musa et al. 1994). La mélarsamine s'est aussi révélée très efficace à la dose de 0,5 mg/kg, à la fois chez les buffles d'eau en Asie (Lun et al. 1991), et chez les bovins en Afrique (Dia and Desquesnes 2007). Cependant, chez ces deux espèces, la dose de 0,25 mg/kg semble trop faible pour assurer le traitement de l'animal. Enfin, chez les chevaux, une dose de 0,25 mg/kg s'est avérée capable de traiter des infections récentes ou chroniques (Mdachi et al. 2008). En Thaïlande, un essai thérapeutique sur bovins est actuellement en cours. Un début de résistance de *T. evansi* à la mélarsamine a été documenté au Soudan (Abdel-Gadir 2008).

### **3. Transmission de *Trypanosoma evansi***

La transmission vectorielle de *T. evansi* est assurée par les insectes piqueurs hématophages partout où est présent le parasite, et par les chauves-souris vampires en Amérique du Sud. À l'inverse d'autres trypanosomes comme ceux du groupe Salivaria chez la glossine, *T. evansi* ne réalise pas de cycle biologique chez le vecteur. Des transmissions par voie orale, congénitale ou iatrogène sont aussi possibles.

#### **3.1. Transmission vectorielle**

##### **3.1.1. Transmission mécanique par les Tabanidés et les stomoxes**

Un insecte vecteur mécanique est défini comme étant un insecte hématophage capable de piquer plusieurs hôtes à quelques minutes ou quelques heures d'intervalle. Le résidu de sang ou de lymphé qui souille les pièces buccales, contient éventuellement des agents pathogènes (qui survivent peu de temps chez l'insecte, sans se développer ni se multiplier) qui sont ré-inoculés par la salive lors du repas sanguin suivant (Rodhain and Perez 1985).

Les Tabanidés sont les insectes les plus souvent impliqués dans la transmission mécanique de *T. evansi* avec surtout le genre *Tabanus*, mais aussi *Haematopota*, *Chrysops*, *Pangonia*, *Atylotus*, *Ancala* ou *Philoliche* qui est le genre le plus courant en Somalie (Dirie et al. 1989). Ils représentent les principaux vecteurs car leur piqûre est douloureuse, ce qui provoque des réactions de défense de la part de l'hôte, entraînant un fractionnement du repas de l'insecte et augmentant ainsi le risque de

transmission du parasite. Les pièces buccales des Tabanidés peuvent porter jusqu'à 0,01 µl de sang (Foil et al. 1987) ce qui justifie la nécessité de fortes parasitoses chez l'hôte pour rendre possible la transmission. En Thaïlande, l'espèce majoritaire semble être *Tabanus megalops* qui représente près de 65 % des espèces de Tabanidés (Tuntasuvan and Luckins 1998). Des Muscidés sont aussi souvent impliqués avec les genres *Stomoxys* et *Haematobia* mais leur piqûre est moins douloureuse et le volume porté par les pièces buccales est plus faible, ce qui diminue le risque de transmission (Luckins 1988). De plus, la survie de *T. evansi* dans les pièces buccales des Stomoxes ne dépasse pas 9 minutes alors qu'elle peut atteindre près de 30 minutes chez les Tabanidés (Cuisance et al. 2003). *Stomoxys calcitrans* a notamment été invoquée lors du récent épisode de Surra en Aveyron, France (Desquesnes 2007). Enfin, des insectes de la famille des Hippoboscidés peuvent intervenir aussi mais dans une moindre mesure (Oyieke 1987).

### 3.1.2. Transmission biologique par les vampires

En Amérique latine, la transmission de *T. evansi* par les chauves-souris vampires (*Desmodus rotundus*) a été démontrée expérimentalement par de nombreux auteurs, dès la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle (Dunn 1932) (Johnson 1936). Elle a ensuite été décrite précisément par Hoare en 1965, qui avançait même qu'elles y joueraient le principal rôle dans la transmission du parasite. En effet, les répartitions géographiques de *Desmodus rotundus* et de *T. evansi* coïncident largement. Les chauves-souris vampires, des chéiroptères hématophages, s'infectent par voie orale lors de repas sanguins pris sur des animaux contaminés comme les chevaux ou les bovins. Les parasites franchissent la muqueuse buccale et se retrouvent alors dans la circulation générale où ils se multiplient activement. Ils repassent ensuite dans la cavité buccale et permettent alors à la chauve-souris de devenir infectante. Lors d'une morsure, la contamination peut donc se faire dans le sens du mordeur au mordu par contamination de la plaie, et du mordu au mordeur par l'intermédiaire du sang contaminé. Une fois infectée, la chauve souris meurt dans le mois qui suit ou survit, et devient alors un porteur asymptomatique du parasite pendant très longtemps. Du fait de la contamination intra-espèce chez ces chéiroptères, le parasite est capable de se maintenir et de se multiplier même dans des zones où les hôtes préférentiels sont absents. La chauve souris est donc à la fois un hôte, un réservoir et un vecteur biologique du parasite (Hoare, 1965).

*T. evansi* ne connaît pas de transmission cyclique. Dans les chauves-souris vampires, il n'y a pas de formes non-infectantes, ni de formes morphologiquement distinctes de celles trouvées dans l'hôte. Le parasite ne réalise donc pas de cycle biologique dans le vampire. Mais comme ces chauves-souris jouent à la fois le rôle de vecteur et celui de réservoir, et du fait de la multiplication du parasite dans le vecteur, il est justifié de considérer la chauve-souris vampire comme un vecteur « biologique » de *T. evansi*, différent du vecteur « biologique à transmission cyclique » qu'est la glossine africaine pour les trypanosomes du groupe Salivaria, et différent aussi du vecteur simplement « mécanique » que sont les insectes hématophages pour *T. vivax* et *T. evansi* (Desquesnes 2004)

## 3.2. Autres modes de transmission

### 3.2.1. Transmission par voie orale

Si elle est validée pour les chauves-souris vampires, la contamination par voie orale a aussi été décrite à l'état naturel chez les chiens par ingestion de viande contaminée par *T. evansi* (Curasson 1943), puis a été confirmé expérimentalement chez les chiens et les souris (Raina et al. 1985), et chez les rats (da Silva et al. 2007). Ces animaux, aux muqueuses non lésées, se sont nourris de sang ou de viande contaminée, puis ont développé des parasitoses dans les trois semaines qui suivirent. Ceci met donc en évidence un possible passage de *T. evansi* à travers des muqueuses buccales ou gastro-intestinales saines.

### 3.2.2. Transmission congénitale

Dès 1937, bien que considérée comme exceptionnelle, une transmission transplacentaire de *T. brucei* a été mise en évidence chez les rats (Morenas and Roman 1937). En 1954, est démontrée la transmission transplacentaire de *T. evansi* chez le cochon d'Inde (Kraneveld and Mansjoer 1954). Fortement soupçonnée chez le dromadaire (Rottcher et al. 1987), elle a été observée sur des bovins aux Philippines (Manuel 1998). En définitive, bien que très peu documenté, ce mode de transmission reste possible.

### 3.2.3. Transmission iatrogène

La transmission iatrogène de *T. evansi* est possible mais son importance n'est pas déterminée. L'utilisation sérieuse d'aiguilles doit toutefois être strictement évitée lors des campagnes de prophylaxie.

### 3.2.4. Transmission directe

La transmission directe de *T. evansi* semble possible notamment lors des contacts étroits de la mère à l'enfant ou par voie vénérienne, mais l'importance de ces phénomènes n'a jamais été déterminée.

## 4. Epidémiologie de *Trypanosoma evansi*

L'épidémiologie de *T. evansi* est gouvernée par ses modes de transmission. En Amérique latine, le rôle des vampires peut être déterminant comme il a été rappelé précédemment. Si l'on considère plus particulièrement le cas de l'Asie, l'essentiel de la transmission entre animaux de rente semble lié aux insectes vecteurs mécaniques. Toutefois d'autres modes de transmission peuvent être envisagés.

### 4.1. Cycle domestique chez les grands herbivores

On considère comme cycle domestique de *T. evansi*, celui qui s'opère entre les animaux de rente ou de loisir tels que les bovins, les buffles, les camélidés ou les chevaux qui sont tous des herbivores de grand gabarit. Du fait du même mode de transmission du parasite et du partage de vecteurs communs, un cycle mixte domestique-sauvage peut s'établir entre ces animaux et des hôtes sauvages de grande taille.

En Amérique Latine, le capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), l'un des plus gros rongeurs qui présente la capacité d'héberger *T. evansi* et de supporter de fortes paraséries sans développer les signes cliniques classiques d'une infection (Reveron et al. 1992), peut contribuer à l'épidémiologie de *T. evansi* chez le bétail. En effet, l'abondance de cet animal, notamment au Venezuela et dans la région du Pantanal au Brésil, et la forte prévalence de l'infection, en font un réservoir particulièrement efficace, et pourraient en faire un acteur important du cycle incluant chevaux et bovins dans ces régions (Herrera et al. 2004). En Asie les cerfs, lorsqu'ils sont en pâturage commun avec le bétail, pourraient également assurer ce rôle. Dans tous ces cas la contamination se fait d'un animal infecté à un animal sain par l'intermédiaire des insectes hématophages (Tabanidés, Stomoxes), par le partage des sites de pâturage ou d'abreuvement.

## **4.2. Infection des carnivores**

De par leur pelage et leur taille généralement petite comparée aux grands herbivores, les chiens et tous les autres carnivores sauvages semblent peu favorables à un partage des mêmes vecteurs que ceux impliqués dans le cycle domestique décrit plus haut (Hoare 1972). Toutefois, dans les systèmes d'élevage où le chien de berger est utilisé, la proximité des ruminants avec les chiens permettrait la transmission du parasite grâce aux vecteurs habituellement décrits chez le bétail. De manière plus générale, les chiens contracteraient l'infection en consommant de la viande infectée autour des abattoirs (chiens errants), ou provenant de proies contaminées (chiens de chasse et autres carnivores sauvages) (Curasson 1943 ; Desquesnes 2004).

## **4.3. Cycle sauvage chez les petits animaux**

En Thaïlande, les petits mammifères sauvages comme les rongeurs, ont été trouvés infectés par *T. evansi* dans les zones agricoles et forestières (Jittapalapong et al. 2008). Ces petits rongeurs, parfois évoqués en tant que réservoirs (Rademaker et al. 2009), soulèvent d'intéressantes questions quant à leur mode de contamination et au maintien du parasite. En effet, ces espèces, d'activité nocturne voire crépusculaire, ont peu de possibilités de rencontrer les principaux vecteurs mécaniques à l'activité diurne (Herrera et al. 2004). D'autres vecteurs ou d'autres voies d'infection sont donc à considérer.

## **4.4. Exploration des liens épidémiologiques**

Du fait des différences de période d'activité des rongeurs et des insectes communément impliqués dans la transmission de *T. evansi*, les liens entre le cycle domestique chez les grands herbivores et celui, sauvage, des petits animaux, ne sont pas encore établis. Pour explorer les liens possibles entre ces cycles, les transmissions par des tiques et par des sangsues seront évaluées.

### **4.4.1. Rôle potentiel des tiques**

Le rôle potentiel de la tique dans la transmission de *T. evansi* a déjà été envisagé. En effet, il a été démontré que le trypanosome était capable de survivre quelques heures au sein de tiques, notamment du genre *Hyalomma* (el Kady 1998). De par son ingestion, la tique pourrait être un intermédiaire reliant les cycles domestique des grands herbivores et sauvage des petits animaux, dans les deux sens. Selon l'espèce de tique considérée, elle pourrait permettre le passage du parasite des rongeurs aux grands herbivores, ou alors des grands herbivores aux rongeurs. Ces deux aspects sont étudiés ici, en considérant des tiques du genre *Boophilus* gorgées sur bovins infectés, ingérées par des rongeurs, ou des tiques du genre *Rhipicephalus* gorgées sur des rongeurs infectés, ingérées par des grands herbivores. Enfin la consommation d'ectoparasites par un rongeur pourrait également être une voie de contamination horizontale entre rongeurs.

### **4.3.2. Rôle potentiel des sangsues**

La sangsue parasitant les vertébrés à sang chaud, se nourrit de divers hôtes au cours de sa croissance : au début, sa petite taille ne lui permettant pas de percer des peaux trop épaisse, elle se contente de larves d'insectes, de mollusques puis de petits animaux comme les rongeurs. Au fur et à mesure de sa croissance, elle devient capable de se nourrir sur des animaux à la peau plus épaisse comme les grands herbivores. On peut alors envisager une transmission du parasite par la sangsue des petits rongeurs vers les grands herbivores si une transmission différée de trois à quatre semaines est possible, entre grands herbivores et entre rongeurs par une transmission immédiate (quelques minutes) ou quasi-immédiate (quelques heures voire quelques jours). Le rôle de la sangsue dans la transmission de *T. evansi* n'ayant jamais été étudié, le travail réalisé ici constitue une étude préliminaire à l'appréciation des capacités vectrices de cet animal.

# Chapitre II : Evaluation de la transmission de *Trypanosoma evansi* par la sanguine

Ce chapitre se propose de donner un bref aperçu de l'anatomie et de la physiologie de la sanguine, notions qui seront nécessaires par la suite, puis d'évaluer le rôle potentiel que pourrait jouer la sanguine aquatique *Hirudinaria manilliensis* dans la transmission de *T. evansi*. Pour cela, les populations de trypanosomes présents à l'état naturel chez cette sanguine seront déterminées, la durée de survie et la localisation de *T. evansi* dans la sanguine seront ensuite étudiées, et enfin, des essais expérimentaux de transmission du parasite seront réalisés.

## 1. La sanguine : sa vie, son œuvre

### 1.1. Biologie de la sanguine

*Le paragraphe 1.1. Biologie de la sanguine a pu être rédigé grâce à trois traités publiés dans la première moitié du XIXème siècle (Vitet 1809; Derheims 1825; Fermond 1854) et à des observations personnelles.*

#### 1.1.1. Classification et étymologie

Embranchement : Annélides

Classe : Achètes

Ordre : Gnathobdellida

Famille : Hirudinidae

La famille des Hirudinidae comprend environ 650 espèces. Environ 300 d'entre elles sont des parasites hématophages temporaires d'animaux marins, terrestres ou d'eau douce. Les autres espèces se nourrissent de déchets organiques. Le mot français « sanguine » provient du latin *sanguisuga* composé de *sanguis* « sang », et *suga* « sucer ». Dans la Bible, elle apparaît sous le nom d'aluka et dans certains récits arabes sous le nom d'aleca. En anglais, le sens primitif de « leech » est « médecin » preuve vraisemblable de son utilisation en médecine vers le Xème siècle.

#### 1.1.2. Morphologie et anatomie

Le corps des sanguines est aplati dorso-ventralement mais la forme générale ainsi que la taille peuvent être très variables d'une espèce à l'autre. Le corps est recouvert d'une fine cuticule et le tégument est pigmenté.

*Segmentation* : le corps des sanguines est constitué du prostomium et de 33 segments. Le prostomium est la partie antérieure à la ventouse buccale. Il forme, ajouté aux cinq premiers segments, la tête de la sanguine.

*Appareil locomoteur* : chacune des extrémités du corps de la sanguine est pourvue d'une ventouse. La ventouse antérieure, ou ventouse buccale, est la plus petite. Elle entoure la bouche et sert à la fois à la succion et à la fixation. La ventouse postérieure, plus grande, sert uniquement à la fixation. Les deux ventouses possèdent des glandes sécrétives produisant des substances adhésives.

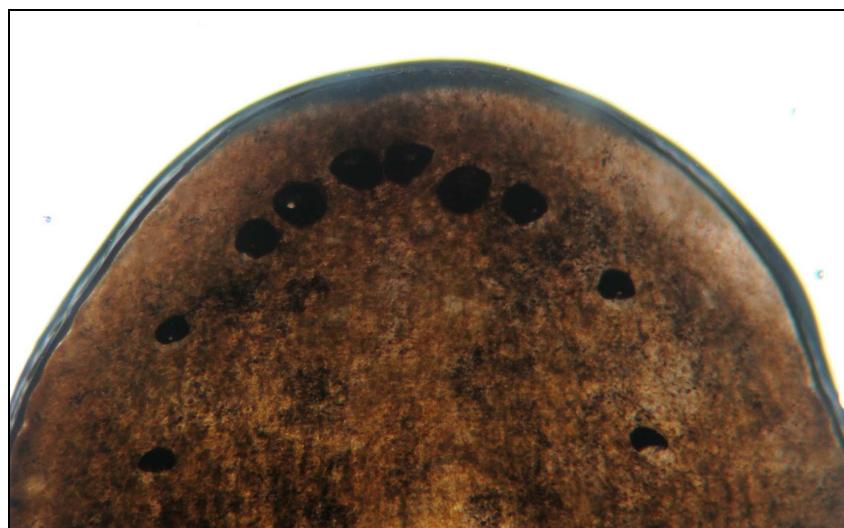
*Appareils sensoriels* : les sanguines ont cinq paires de petits yeux noirs situés sur la face dorsale de l'extrémité antérieure de leur corps (cf. Figure 2). Ils sont parfois difficiles à voir si le tégument est sombre. Ce sont des récepteurs sensitifs à la lumière. En outre, de nombreuses petites papilles sont réparties le long du corps. Elles sont situées à mi-hauteur de chaque segment. Ce sont des récepteurs sensitifs aux produits chimiques et au mouvement de l'eau.

*Appareil digestif* : l'appareil digestif comporte cinq parties. La bouche s'ouvre au fond de la ventouse antérieure. Elle est munie de trois mâchoires formant un Y renversé et portant de très nombreuses dents assurant l'effraction cutanée de l'hôte. Le pharynx, doté de muscles puissants,

permet la succion et la déglutition du sang. L'estomac assure le stockage du sang en quantité très importante. L'intestin constitue la zone digestive active dans sa partie moyenne et la zone de stockage des excréments dans sa partie postérieure ; l'anus est situé sur la face dorsale de la ventouse postérieure.

*Appareil reproducteur* : les sangsues sont des animaux hermaphrodites avec un appareil sexuel mâle et un appareil sexuel femelle, indépendants l'un de l'autre. L'appareil mâle est constitué de neuf paires de testicules, de spermiductes et d'un pénis permettant la libération des spermatozoïdes. L'appareil femelle comprend quant à lui deux ovaires, des oviductes, un utérus et un vagin. Le nombre d'anneaux séparant les deux appareils varie d'un genre à l'autre et constitue donc un critère de diagnose (Dudgeon 1999).

*Appareil respiratoire* : il n'est pas différencié. La respiration s'effectue directement à travers l'épiderme. Les sangsues ventilent la surface de leur corps par des ondulations antéro-postérieures. Les gaz sont distribués dans le corps par l'hémoglobine contenue dans le fluide cœlomique.



**Figure 2 : Observation à la loupe binoculaire des appareils sensoriels visuels de sangsue (x 20) (cliché T. Vergne)**

#### 1.1.3. Comportement

La sangsue se déplace dans son milieu soit par la nage à l'aide de mouvements ondulatoires, soit par mouvements reptatoires à l'aide des ventouses (comme les chenilles). Sur un support, elle progresse en fixant la ventouse postérieure puis en allongeant le corps pour fixer la ventouse antérieure (cf. Figure 3). Détachant ensuite le disque arrière et se contractant sur le point d'appui, elle rapproche toute la partie postérieure du corps vers la ventouse antérieure et réapplique la ventouse arrière.



**Figure 3 : Déplacement de la sangsue sur un support (clichés T. Vergne)**

a : la sangsue vient de détacher sa ventouse antérieure. b : la sangsue commence à allonger son corps. c : la sangsue fixe à nouveau sa ventouse antérieure, elle s'apprête à détacher sa ventouse postérieure pour la ramener près de la ventouse antérieure.

Dans le milieu naturel, les sangsues sont alertées de la présence d'une proie potentielle par les vibrations de l'eau. Elles nagent alors vers la source principale des vibrations. Dans le repérage

des proies, la vision ne paraît pas être primordiale. Les sanguines présentent une sensibilité à la lumière : placées dans un aquarium éclairé, elles recherchent instinctivement les endroits sombres. L'autre stimulus important pour les sanguines est la température de la proie potentielle. Une source de chaleur, comme un ballon d'eau chaude, placée dans l'eau du bassin attire les sanguines à la surface. Elles repèrent ainsi vraisemblablement plus facilement les vertébrés à sang chaud. La sanguine présente aussi une sensibilité au toucher la conduisant parfois à se rétracter de plus des deux tiers de sa longueur.

#### 1.1.4. Alimentation

La sanguine est un animal réputé strictement hématophage. Certaines sont des parasites de poissons, d'amphibiens, d'autres de vertébrés à sang chaud. Parfois, les jeunes individus peuvent s'alimenter initialement de larves d'insectes ou de petits mollusques. Il a parfois été observé des sanguines fixées sur des cadavres, mais elles ne s'y attardent pas. D'après certains auteurs citant des observations de M. Vauquelin, un comportement cannibale peut aussi parfois avoir lieu vis-à-vis de sanguines gorgées (Johnson 1825). Une fois fixée par ses deux ventouses sur sa proie, la sanguine pratique une incision trifide du tégument ou de la peau grâce à ses trois mâchoires munies de dents (cf. Figure 4). Le contenu sécrétoire des glandes salivaires est libéré au moment de la morsure. Le mucus facilite la lubrification du site. L'hirudine contenue dans la salive est injectée au début du repas et favorise la prise du repas sanguin en empêchant la coagulation. Lorsque la sanguine est fixée, des petits mouvements de succion sont observables dans la région céphalique. Le sang subit ensuite des changements très lents, notamment par la lyse progressive des erythrocytes. Au cours des expériences décrites ci-après, des globules rouges intacts étaient encore observables 14 jours après le repas sanguin. La digestion du repas est rendue possible par la présence d'un symbioète de type bactérien, *Aeromonas hydrophila*, dans le tube digestif de l'annélide (Whitlock et al. 1983). Après son repas, la sanguine est gonflée et se déplace avec peine car elle peut absorber entre 3 et 10 fois son poids de sang. Dans le milieu naturel, l'accès aux proies n'est pas toujours régulier mais le mode de digestion des sanguines est adapté à ce mode de vie car elles présentent une extraordinaire résistance au jeûne. En effet, les sanguines adultes supportent aisément un jeûne de six à huit mois.



Figure 4 : Sangsue au cours du repas sanguin sur un rat de laboratoire (cliché T. Vergne)

#### 1.1.5. Reproduction

Possédant des organes de reproduction mâle et femelle, la sanguine est hermaphrodite. Cependant, l'autofécondation n'est pas possible et la copulation n'est pas obligatoirement réciproque. Elle s'effectue tête-bêche. Le pénis est introduit dans le vagin où le sperme est déposé. À l'approche de la ponte, la sanguine présente un renflement dans la partie antérieure du corps accompagné d'une coloration de la zone. La ponte se produit en général un mois après la fécondation et a lieu à l'extérieur de l'eau. La sanguine libère un cocon, capsule ovoïde d'une

consistance variable, dans lequel les œufs fécondés sont déposés. La taille du cocon, jusqu'à trois centimètre de longueur et deux centimètre de largeur, est fonction de la taille de la sanguine pondeuse. Le cocon est rempli d'un liquide nutritif permettant l'alimentation des jeunes sangsues avant leur sortie vers le milieu extérieur. Cette période de vie dans le cocon dure au minimum trois semaines, puis les jeunes en perforent une extrémité et gagnent l'eau le plus rapidement possible.

#### 1.1.6. Dynamique de croissance

Une fois sorties de l'œuf, les sangsues juvéniles réalisent leur premier repas sanguin à environ un mois. Pendant celui-ci, qui dure environ vingt minutes, les sangsues juvéniles ingèrent environ six fois leur poids. Les sangsues ne se nourrissent ensuite plus pendant un mois afin que leur organisme puisse métaboliser le sang ingéré. Près d'un tiers du poids du sang ingéré est éliminé sous forme d'urine dans les quelques jours suivant le repas. Le deuxième repas dure approximativement une heure. Les sangsues ingèrent cinq fois leur poids en sang. La période de digestion dure alors deux mois. Pendant leur troisième repas, les sangsues absorbent encore près de cinq fois leur poids en sang puis digèrent pendant trois mois (cf. Figure 5). Cette tendance suit son rythme jusqu'à la mort de la sangsue : les repas s'espacent de plus en plus, durent de plus en plus longtemps et la quantité de sang ingérée comparée au poids de la sangsue diminue progressivement (Sawyer et al. 1981). Les sangsues ont des durées de vie variables selon l'espèce considérée. Certaines sangsues médicinales ont été conservées dans des bocaux de verre pendant plus de quarante ans (Vitet 1809).

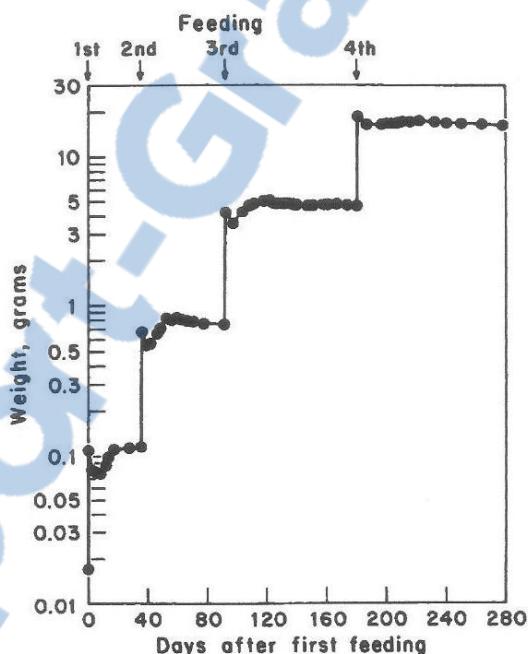


Figure 5 : Dynamique de croissance de *Haementeria ghilianii* de la forme juvénile au stade adulte arrivé à maturité sexuelle (d'après Sawyer et al. 1981)

#### 1.2. La sangsue utilisée à des fins thérapeutiques

Les traces les plus anciennes de l'utilisation de la sangsue semblent remonter à la plus Haute Antiquité, au moins à 1600 – 1300 avant J.C. En effet, dans un tombeau de Thèbes (Egypte), une fresque murale représentant une pose de sangsue a été mise en évidence (Munshi et al. 2008). En Grèce, Nicandre de Colophon (185 – 138 av. J.C.), et Thémison de Laodicée (123 – 43 av. J.C.) à Rome semblent avoir été les premiers à préconiser l'emploi des sangsues en thérapeutique. Pline l'Ancien (23 – 79 ap. J.C.) conseillait déjà leur usage pour traiter les phlébites et les hémorroïdes. A la fin du Moyen Age, les médecins traitaient de nombreuses maladies par l'application de sangsues. Au XVII<sup>e</sup> siècle, la saignée était pratiquée avec des lancettes et l'intervention de la sangsue restait marginale. A cette époque, pourtant, Jérôme Negrisoli publia un ouvrage sur l'application des sangsues en gynécologie. Au XVIII<sup>e</sup> siècle, elles ont été remises à l'honneur en particulier dans

le traitement des phlébites et des hémorroïdes. A l'époque de la Révolution, faute de chirurgiens, elles étaient utilisées pour réaliser des saignées. Au XIXème siècle, la sanguine est de nouveau perçue comme un outil thérapeutique unique. Différentes monographies sont alors publiées. La France devient le pays le plus consommateur de sangsues. La quantité d'annélides qui y est utilisée entre les années 1830 et 1840 aurait été d'environ soixante millions par an. Dans le même temps, la Russie consommait annuellement trente millions de sangsues pour traiter des affections aussi diverses que la tuberculose, l'épilepsie ou les rhumatismes. Favorisé par l'amélioration du transport, le commerce de la sanguine a pris, à cette époque, une dimension mondiale. Tout le monde s'y intéresse. L'Etat américain offrait même une prime de 500 dollars à quiconque réussirait à éléver la sanguine européenne. Mais, après la grande épidémie de choléra de 1832 et l'avènement de l'asepsie avec Pasteur, les médecins ont rejeté l'usage de la sanguine considérée alors comme un vecteur de germes. Ainsi, le discrédit fut jeté sur les sangsues du fait des convalescences interminables, des hémorragies et des infections cutanées. Après les années 1850, l'élevage de la sanguine a été abandonné par le plus grand nombre. Le XXème siècle n'a fait que renforcer cette tendance (Hyson 2005). Actuellement, la sanguine est de nouveau au cœur de l'actualité car elle est de nouveau utilisée par des médecins généralistes pour le traitement de différentes affections comme les phlébites, l'arthrose ou les intoxications sanguines. Les chirurgiens y ont aussi de plus en plus recours lors des greffes ou lors de chirurgie plastique afin de favoriser la néo-vascularisation (Yantis et al. 2009). Son utilisation est cependant encore à l'origine d'infections parfois graves comme peut en témoigner un cas de méningite à *Aeromonas hydrophila* lié à l'application de sangsues (Onderkirk et al. 2004). L'industrie pharmaceutique et les laboratoires scientifiques se penchent depuis quelques années sur les formidables pouvoirs des sangsues.

### **1.3. La sanguine en tant que vecteur de trypanosomes**

Dans le monde marin, le lien entre les sangsues et les trypanosomes de poissons est très étroit. Certains trypanosomes arrivent bien à survivre dans l'organisme de certaines espèces de sangsues marines se nourrissant de sang de poissons. Ainsi, *Trypanosoma murmanensis* a pu être observé vivant dans la sanguine marine *Johanssonia artica* au moins 80 jours après que cette dernière ait consommé du sang parasité (Karlsbakk et al. 2005). De plus, différents stades de développement d'un trypanosome non identifié ont aussi été observés dans la sanguine *Zeylanicobdella argumanensis*, lui conférant un éventuel rôle de vecteur biologique (Hayes et al. 2006). Enfin, il a été montré que la sanguine *Orientobdella confluens* est capable de transmettre expérimentalement *Trypanosoma gargantua*, un autre trypanosome de poissons (Burreson et al. 2007). Dans le monde marin, la sanguine est donc effectivement un vecteur reconnu de trypanosomes.

Chez les mammifères, très peu d'informations ont été publiées concernant la transmission des trypanosomes par les sangsues. Cependant, Hamilton cite Tubangu qui aurait, dès 1932, observé une transmission du surra par la sanguine terrestre *Haemadipsa zeylanica* (Hamilton et al. 2005). Plus récemment, de l'ADN de *Trypanosoma theileri* a été mis en évidence dans des sangsues de cette même espèce provenant du Sri Lanka et de l'espèce *Leiobdella jawarerensis* provenant de Papouasie Nouvelle Guinée. Cependant, en raison du mode de conservation des sangsues dans l'alcool, les trypanosomes vivants n'ont pas pu être mis en évidence à l'observation directe (Hamilton et al. 2005). Certaines sangsues aquatiques sont soupçonnées de participer à la transmission de *Trypanosoma binneyi*, un parasite de l'ornithorynque en Australie (Jakes et al. 2001).

## **2. La collecte et la conservation des sangsues**

### **2.1. La collecte des sangsues**

Lieux de capture : pour mener la présente étude, les captures ont été faites à deux endroits différents. Le premier était une mare d'eau stagnante de 30 m<sup>2</sup> peu profonde (maximum 1 mètre de fond) située dans l'université vétérinaire de Chiang Mai et à laquelle des vaches avaient accès. Le deuxième était

une rizière non cultivée de très grande étendue mais peu profonde (maximum 1 mètre de fond) située dans le district de Mae Chan dans la province de Chiang Rai. Des vaches et des buffles avaient aussi accès à ce point d'eau. Il est intéressant de noter que notre recherche à ce dernier endroit est due à l'appel d'éleveurs ayant enlevé le matin même deux sangsues de leurs buffles. Ces informations de cohabitation entre le bétail et les sangsues sont très intéressantes épidémiologiquement et confirment l'intérêt de notre étude.

Technique de récolte : les sangsues étant attirées par les mouvements de l'eau, il a suffit de faire quelques pas bruyamment dans le point d'eau, de se retourner et de passer une épuisette dans son sillage afin de capturer les sangsues.

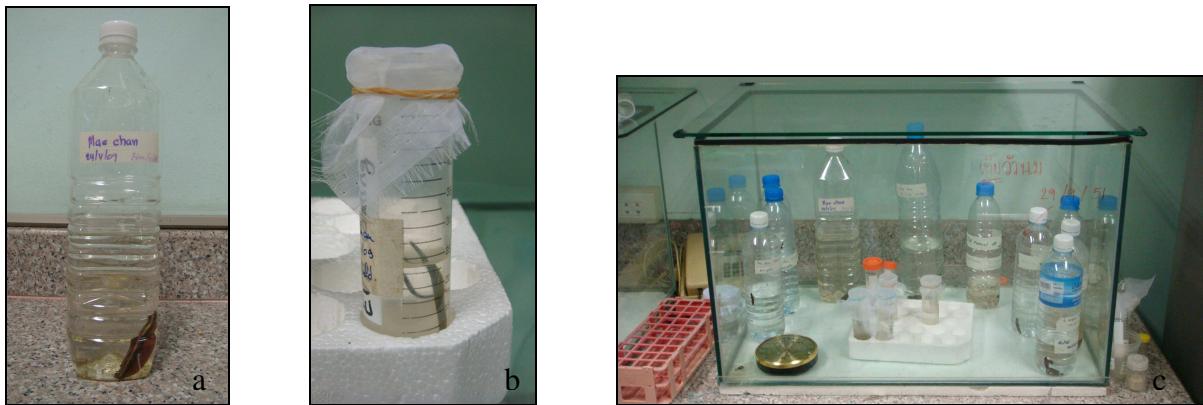
Bilans de la récolte : Quatre-vingt-une sangsues ont été récoltées, dix-sept dans le premier lieu de capture et soixante-quatre dans le second. L'espèce de sangsue était la même dans les deux endroits. Grâce à un arbre de classification des Hirudinae (Dudgeon 1999), il a pu être déterminé que cette espèce appartient au genre *Hirudinaria*. D'après des comparaisons avec des photographies des espèces de sangsues de ce genre, elles ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Hirudinaria manilliensis*. En Thaïlande, elles sont aussi appelées « sangsue du buffle ». Selon leur âge, les tailles étaient très variables. Les plus petites pesaient 0,06 grammes et mesuraient deux centimètres en extension alors que les plus grandes atteignaient des longueurs de plus de trente centimètres dans la même position et des poids proches de 20 grammes (cf. Figure 6). Les effectifs de chaque taille ont été dans le même ordre de grandeur.



Figure 6 : Observation des différences de taille entre une des plus grosses sangsues et une des plus petites (cliché T. Vergne)

## 2.2. La conservation des sangsues

En attendant le début des expériences, les sangsues ont été conservées à l'Université de Kasetsart dans des tubes Falcon pour les plus petites et dans des bouteilles en plastique pour les plus grandes. Les récipients étaient remplis aux deux tiers avec de l'eau du robinet. L'eau était changée une fois par semaine pour éviter que les sangsues ne s'intoxiquent avec les produits d'excrétion et de macération. Les sangsues n'ont pas été nourries dans l'attente des expérimentations. Les tubes Falcon ont été refermés avec une pièce de moustiquaire fixée par un élastique afin de laisser l'air se renouveler dans le récipient. Dans le même objectif, les bouteilles d'eau ont été percées dans leur partie haute avec une aiguille (cf. Figure 7). Les tubes Falcon et les bouteilles ont été placés dans une enceinte semi fermée dont le taux d'humidité a été conservé entre 50 et 60 %. Dans ces conditions, 86 % des sangsues ont survécu jusqu'au début des expérimentations qui ont commencé quarante jours après leur collecte. Lorsqu'une sangsue mourrait, elle libérait par l'anus une partie de son contenu intestinal qui se collectait dans une bulle membraneuse abouchée à l'anus, la bulle agonique. Il n'y a pas eu de reproduction des sangsues car les sangsues collectées à maturité sexuelle (après 3 ou 4 repas sanguins) étaient conservées individuellement afin d'éviter les risques de cannibalisme.



**Figure 7 : Conservation des sangsues (clichés T. Vergne)**

a : les grosses sangsues sont conservées dans des bouteilles en plastique dont la partie s'évasant a été percée pour permettre à l'air de circuler. b : les petites sangsues sont conservées dans des tubes Falcon recouverts de moustiquaire. c : les bouteilles et les tubes Falcon sont entreposés dans une enceinte semi fermée dont l'hygrométrie et la température sont contrôlés.

### **3. Evaluation de la présence de *Trypanosoma evansi* à l'état naturel chez la sangsue**

Comme cela a été énoncé plus haut, les études concernant les populations de trypanosomatidés présents dans l'organisme de sangsues sont très peu nombreuses. L'objectif de cette partie est de savoir un peu plus précisément quels sont les trypanosomes présents chez les sangsues en Thaïlande et, plus spécifiquement, si elles peuvent éventuellement être porteuses de *T. evansi*. Pour cela, des sangsues récupérées sur le terrain dans le nord de la Thaïlande ont été sacrifiées et disséquées. Les liquide coelomique, contenu intestinal et glandes salivaires de ces annélides ont été observés et analysés par PCR.

#### **3.1. Protocole**

##### **3.1.1. Dissection et prélèvements**

Le protocole de dissection est largement inspiré des explications données par Fox (Fox 2003). La sangsue vivante est fixée ventralement sur une plaque de polystyrène par deux aiguilles fichées au niveau des ventouses (cf. Figure). Elle est étirée au maximum. Afin d'éviter les contaminations entre les compartiments, les prélèvements se font dans un ordre croissant de probabilité de présence des trypanosomes : les glandes salivaires seront les premiers organes à être prélevés, puis, la dissection se concentrera sur le liquide coelomique pour finir par le contenu digestif.

Tout d'abord, à l'aide de pinces propres et d'une lame de bistouri stérile, une incision longitudinale est réalisée dans la région céphalique. Il faut inciser à travers le tissu blanchâtre tout en s'assurant que le jabot de la sangsue n'a pas été ouvert ce qui pourrait provoquer une contamination par le contenu digestif. Un liquide rouge perle généralement de la plaie. Il s'agit du liquide coelomique qui est récupéré à l'aide d'une seringue stérile. La plaie est alors rincée au PSG 1% et les deux rabats de la plaie sont fixés avec des aiguilles sur la plaque de polystyrène. Les glandes salivaires, difficilement visibles et non individualisables, peuvent cependant être identifiées dans le tissu blanchâtre entourant le jabot. Elles apparaissent comme un tissu granuleux, différent de l'aspect des muscles lisses les entourant (cf. Figure). Elles sont prélevées en découpant proprement ce tissu granuleux de part et d'autre du jabot, rincées au PSG 1%, et mises dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Les outils sont lavés à grande eau.

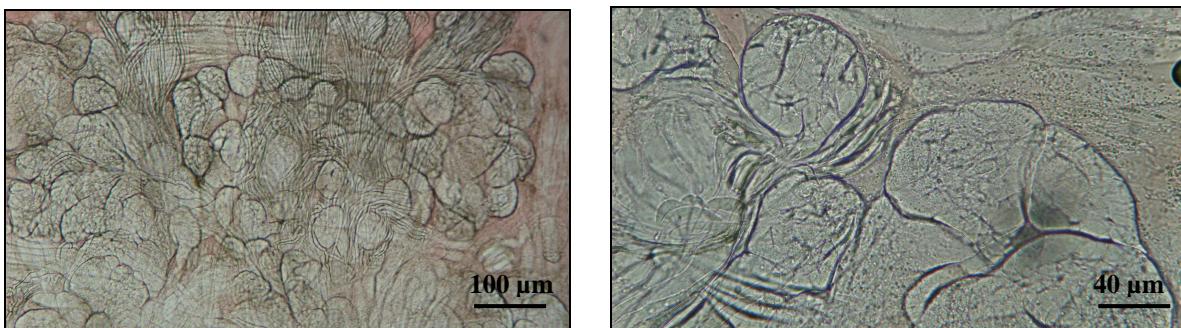
Une incision très superficielle est ensuite réalisée sur le dos de la sangsue, perpendiculairement à l'axe du corps de la sangsue, à peu près à mi-longueur. Cette incision, la plus

longue possible, n'entaille que le tégument et la couche musculaire qui apparaît noire. Si des capillaires coelomiques sont sectionnés lors de l'incision, du liquide coelomique peut couler comme lors du prélèvement des glandes salivaires. Il est récupéré avec une seringue stérile. On peut écarter les deux lèvres de la plaie avec des pinces afin de dilacerer les tissus et mieux voir. Il est alors possible d'observer sur la face dorsale et sur les faces latérales de la sangsue trois vaisseaux à l'activité contractile contenant un liquide rouge. Il s'agit des canaux coelomiques contenant le liquide coelomique destiné à distribuer l'oxygène aux tissus, par l'intermédiaire de l'hémoglobine qu'il contient. Ces canaux coelomiques se ramifient ensuite en capillaires coelomiques qui iront irriguer les différents organes. Les canaux sont percés par la lame du scalpel ou une aiguille et leur contenu est récupéré dans un micro tube de 1,5 mL grâce à la seringue. La plaie est rincée avec du PSG 1% pour éviter les contaminations entre les compartiments. Les outils sont eux aussi lavés à grande eau.

On peut distinguer, dans la partie médiane de la sangsue, l'intestin. Selon son état de remplissage, celui-ci peut apparaître blanc (lorsqu'il est vide, la lumière est petite, la paroi est donc épaisse) ou noir (lorsqu'il est plein, la paroi devient invisible, il est alors très fragile). Une petite incision est pratiquée dans la paroi de l'intestin avec la pointe du scalpel. Le contenu est récupéré dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Si le tube est plein, son contenu sort tout seul. S'il est vide, il est possible d'en récupérer une petite quantité avec une micropipette. Ces dissections peuvent être faites à différentes hauteurs sur le corps de la sangsue. Ainsi, nous avons fait des incisions plus postérieures ou plus antérieures selon les cas.

### 3.1.2. Les glandes salivaires

Macroscopiquement, les glandes salivaires apparaissent comme un tissu non individualisable et granuleux entourant le pharynx. Pour l'examen microscopique, le tissu prélevé est écrasé délicatement entre lame et lamelle. Il est alors possible d'observer de nombreuses structures glandulaires (cf. Figure 8). Ces formations, de nature épidermique, sont toutes indépendantes et ouvrent chacune directement dans la cavité buccale de la sangsue par l'intermédiaire de canaux sécrétaires. Les canaux sécrétaires contenant la salive peuvent se contracter et les ondes péristaltiques sont visibles au microscope dans les minutes qui suivent l'extraction des organes. La salive est aussi observable au niveau des ces ondes.



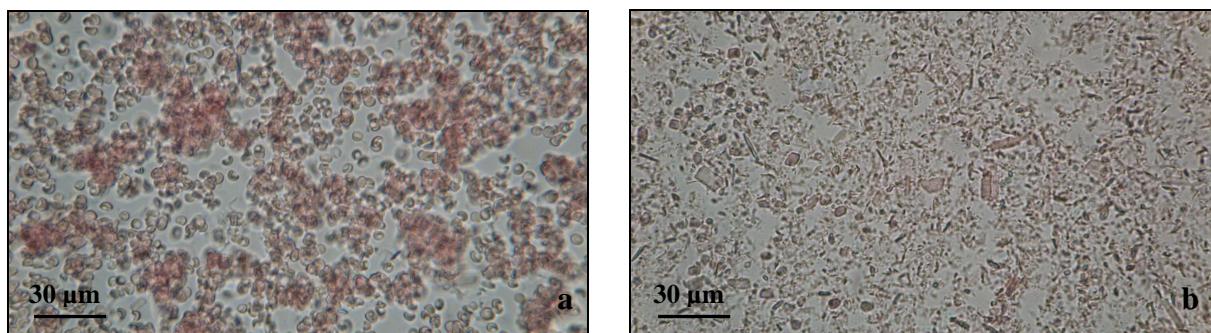
*Figure 8 : Observation de glandes salivaires de sangsue au microscope (état frais) (cliché T. Vergne) (x150)*

### 3.1.3. Le liquide cœlomique

Lorsque les vaisseaux contenant le fluide cœlomique sont percés, ce dernier s'écoule tout seul grâce aux capacités pulsatiles des canaux cœlomiques qui jouent le rôle du cœur. Il s'agit d'un liquide fluide, rouge clair. Il est difficile d'en récupérer des quantités supérieures à 100 µL. A l'observation directe au microscope, ce liquide, peu dense, ne présente pas de cellules caractéristiques si ce n'est quelques rares débris cellulaires. Le frottis de liquide cœlomique n'apporte pas plus d'informations. Il semble dépourvu de cellules nucléées.

### 3.1.4. Le contenu intestinal

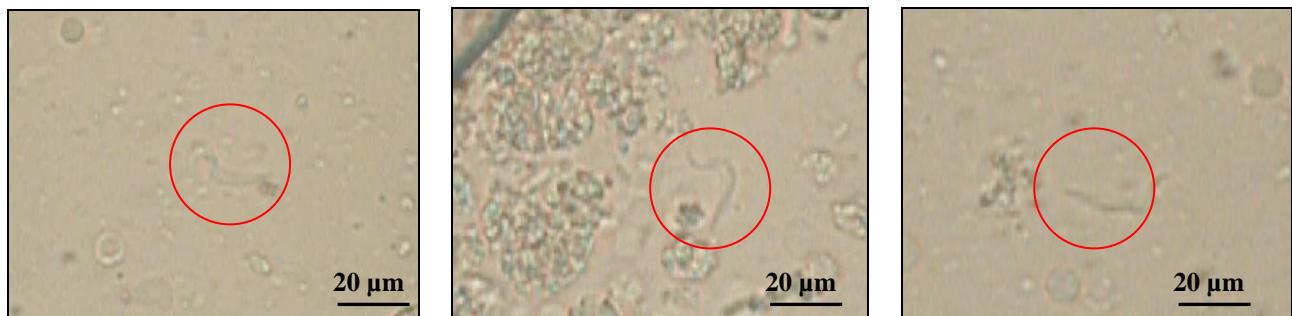
La consistance du contenu intestinal varie en fonction du lieu de prélèvement et du délai après le repas sanguin. Le contenu intestinal est globalement liquide en région antérieure, visqueux en région médiane, et plus pâteux en région postérieure. Cependant, cette distinction n'est observable ni trop tôt ni trop tard. Si le prélèvement se fait moins de 1 semaine après le repas, le contenu intestinal sera entièrement liquide sur toute la longueur du tube digestif. En revanche, si le prélèvement est tardif, plus d'un mois après le repas, tout le contenu intestinal tendra à prendre une consistance solide. La couleur est rouge foncé, voire noire. Environ 100 µl de contenu intestinal est mis dans un tube eppendorf. Sont ajoutés alors 100 µl de PSG 1 % pour diluer son contenu. A l'examen direct au microscope, on peut observer de nombreux érythrocytes. Leur état de dégradation est encore un fois, fonction de la durée séparant le prélèvement du repas sanguin (cf. Figure 9). La flore intestinale de la sangsue, très mobile, est aussi observable.



**Figure 9 : Etat du contenu intestinal chez la sangsue (état frais) (cliché T. Vergne) (x 400)**  
a : 1 jour après le repas sanguin. b : 7 jours après le repas sanguin

### 3.2. Mise en évidence de trypanosomes par observation directe

Il nous a été permis d'observer au microscope des trypanosomes vivants sous forme trypomastigote dans l'organisme de la sangsue qu'une seule fois, lors de la dissection d'une sangsue qui a eu lieu 4 jours après sa collecte dans la rizière de Mae Chan. La sangsue a été tuée par immersion dans de l'alcool 70° puis son contenu intestinal a été observé au microscope dans l'heure qui suivit. Le contenu intestinal était liquide et rouge sur toute la longueur de l'appareil digestif ce qui sous-entend que le repas sanguin avait eu lieu peu de temps avant la dissection (moins d'une semaine). Les trypanosomes étaient présents à tous les niveaux du tube digestif mais en très petit nombre. Ils mesuraient à peu près 30 µm, possédaient une membrane ondulante bien développée et un flagelle libre relativement court (cf. Figure 10). Leurs mouvements ondulatoires étaient vifs pour certains et nettement ralenti pour d'autres. A l'examen direct, la morphologie et la motilité du parasite étaient compatibles avec celles de *T. evansi*. Des séquences vidéo ont été capturées. Ces observations, réalisées au minimum 4 jours après un éventuel repas contaminant, suggèrent que les trypanosomes sont capables de survivre au moins pendant cette durée au sein de la sangsue.



**Figure 10 : Trypanosomatidés vivants observés dans le contenu intestinal d'une sangsue 4 jours après sa capture (état frais) (clichés T. Vergne)**

Le contenu digestif de 5 autres sangsues de taille comprise entre 10 et 15 cm en extension, a par la suite été observé au microscope. Ces observations ont été réalisées au moins trois semaines après la récolte des sangsues. Il n'a jamais été permis d'observer d'autres trypanosomes vivants. A l'examen direct de cinq échantillons, le liquide cœlomique n'a lui non plus jamais révélé la présence de trypanosomes.

### 3.3. Mise en évidence de trypanosomes par PCR

#### 3.3.1. Matériel

Echantillons de sangsues : afin d'évaluer la présence de trypanosomes à l'état naturel chez les sangsues récupérées sur le terrain, divers prélevements ont été analysés. Dès qu'une sangsue mourrait, le contenu de la bulle agonique était récupéré. Il était considéré comme révélateur du contenu intestinal. Les glandes salivaires étaient aussi prélevées sur ces sangsues mortes. De plus, huit sangsues ont été sacrifiées pour augmenter le nombre d'échantillons et pouvoir ponctionner du liquide cœlomique. Il a ainsi pu être récupéré quatre échantillons de bulle agonique, neuf de contenu intestinal, huit de glandes salivaires et trois de liquide cœlomique. Ces échantillons ont été conservés à -20°C en attendant l'extraction de l'ADN.

Kit d'extraction : l'extraction de l'ADN a été réalisée avec un kit commercialisé par Geneaid Biotech Ltd. Le protocole « sang congelé » a été utilisé pour extraire l'ADN des échantillons de la bulle agonique, du contenu intestinal et du liquide cœlomique. Le protocole « tissu » a été utilisé pour les glandes salivaires.

Amorces : deux jeux d'amorces ont été utilisés.

- amorces TRYP1 : ces amarces, assez peu sensibles, ont pour cible une séquence d'ADN non transcrive, dont la taille varie selon le genre de trypanosome considéré. Selon la taille des produits de la PCR, il est donc possible de déterminer de manière assez spécifique, le genre des trypanosomes présents (Desquesnes et al. 2001). La taille du produit d'amplification de *T. evansi* et de tous les *Trypanozoon* est de 545bp. De manière générale, ces amarces nous permettront donc de savoir si des trypanosomatidés sont présents à l'état naturel chez la sangsue.

- amorces TBR : ces amarces permettent l'amplification d'une séquence répétée d'ADN satellite spécifique des *Trypanozoon* (GIBSON et al. 1988) ; elles sont très sensibles.

#### 3.3.2. Méthode

L'ADN de tous les échantillons a été extrait à l'aide du kit Geneaid selon le protocole décrit en annexe. Tous les échantillons ont été amplifiés par PCR avec les amarces TRYP1 et TBR selon le protocole décrit en annexe. Une fois la migration réalisée, certains produits de la PCR amplifiés avec les amarces TRYP1 présentaient des signaux non compatibles avec les produits de la PCR amplifiés avec les amarces TBR. Ces échantillons amplifiés ont donné lieu à un séquençage afin de pouvoir identifier les trypanosomes présents dans les sangsues à l'état naturel.

#### 3.3.3. Résultats

##### Résultat des PCR avec amplification par les amarces TRYP1 (cf. Figures 12 et 13)

Sur les treize sangsues analysées, sept ont présenté des signaux après migration des produits de la PCR. Tous ces signaux correspondaient à des séquences d'ADN de poids moléculaire compatible avec les témoins positifs *Trypanosoma evansi*. Toutefois certains paraissaient sensiblement plus lourds.

La première sangsue disséquée quatre jours après sa collecte, dans le tube digestif de laquelle des trypanosomes vivants ont été observés, produit un signal très faible. Néanmoins, ce signal est reproductible car il est apparu sur tous les gels de migration qui ont été réalisés. Il semble révéler la présence d'un trypanosome dont le produit de la PCR paraît de poids moléculaire légèrement supérieur à celui des témoins positifs *T. evansi*.

Si l'on s'intéresse plus précisément à la nature des prélèvements présentant les signaux, on s'aperçoit que tous les compartiments de la sangsue sont représentés. En effet, sur les sept échantillons positifs, deux proviennent du contenu intestinal, trois des glandes salivaires et deux du liquide coelomique. Cette considération permet de conclure que le parasite mis en évidence par ces analyses est capable de diffuser dans tout l'organisme de la sangsue.

Les trois dernières sangsues analysées, sacrifiées 59 jours, 60 jours et 80 jours après leur collecte, présentent encore des signaux respectivement dans le fluide coelomique, le contenu intestinal et le fluide coelomique. N'ayant pas été nourries durant leur conservation, il est justifié de conclure que l'ADN des trypanosomes mis en évidence ici, est capable de se conserver autant de jours au sein des sangsues. Concernant le signal du contenu digestif, cette conclusion est compatible avec la physiologie de la digestion de la sangsue qui est très lente. Le trypanosome et son ADN mettent donc beaucoup de temps à se faire dégrader. La présence d'ADN de trypanosome dans le fluide coelomique révèle quant à elle une capacité du parasite à franchir les tissus. Cette présence à 80 jours après la collecte de la sangsue soulève cependant d'intéressantes questions. En effet, la sangsue possède un organe d'épuration qui détruit les éléments étrangers du liquide coelomique. Une persistance simple pendant 80 jours d'ADN de trypanosome dans le liquide coelomique paraît donc peu probable. Cela amène à émettre l'hypothèse que le trypanosome mis en évidence possède la capacité de survivre, voire de se multiplier dans le liquide coelomique de la sangsue. Les cellules observées sur les frottis de liquide coelomique de ces deux sangsues peuvent être rattachées à une forme de survie du trypanosome dans la sangsue. Des techniques immuno-histochimiques, non disponibles dans le cadre de cette étude, auraient été nécessaires pour permettre de conclure sur ce point.

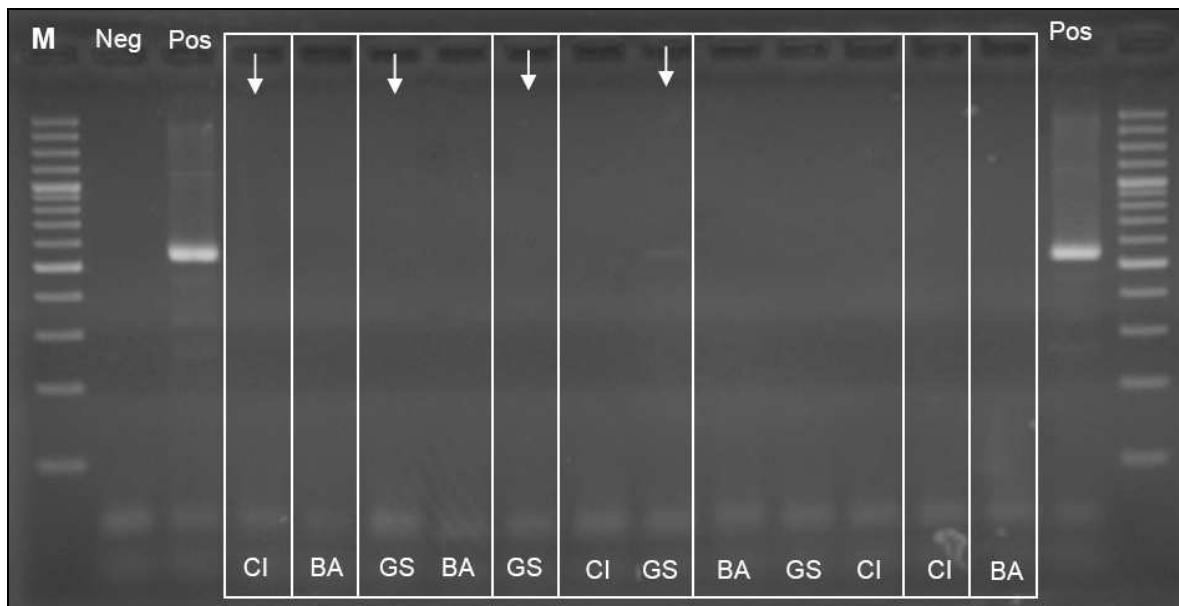
### Résultat des PCR avec amplification par les amores TBR (cf. Figures 14 et 15)

Sur les treize sangsues analysées, cinq ont présenté des signaux après migration des produits de la PCR. Les sangsues de l'espèce *Hirudinaria manilliensis* sont donc naturellement porteuses d'ADN de *Trypanosoma evansi*.

Deux de ces cinq sangsues présentaient aussi des signaux après migration des produits d'amplification par TRYP1. Cependant, il est important de noter que, dans ces deux sangsues, ce ne sont pas les mêmes compartiments qui apparaissent positifs. En définitive, aucun des échantillons positifs avec l'amorce TRYP1 ne s'est révélé de nouveau positif avec l'amorce TBR, beaucoup plus spécifique de *T. evansi*. Les signaux issus de l'amplification avec les amores TRYP1 témoignaient donc de la présence d'un autre trypanosome dont le poids moléculaire du produit d'amplification était proche de celui de *T. evansi*. Il est fort probable que les trypanosomes observés dans la sangsue 4 jours après sa collecte appartenaient à cette espèce là. Afin de déterminer cette espèce, des essais de séquençage ont été réalisés. Malheureusement, les signaux obtenus après migration étaient le plus souvent trop faibles pour permettre un découpage du gel afin d'isoler la séquence. Seul le produit d'amplification par TRYP1 de l'échantillon de glande salivaire de la quatrième sangsue a pu servir à un séquençage. Le résultat du séquençage témoigne de la présence d'un gène non spécifique présent sur l'ARN 18S de très nombreuses sangsues. Les signaux issus de la migration des produits d'amplification avec les amores TRYP1 ne sont donc pas révélateurs de la présence de trypanosomes.

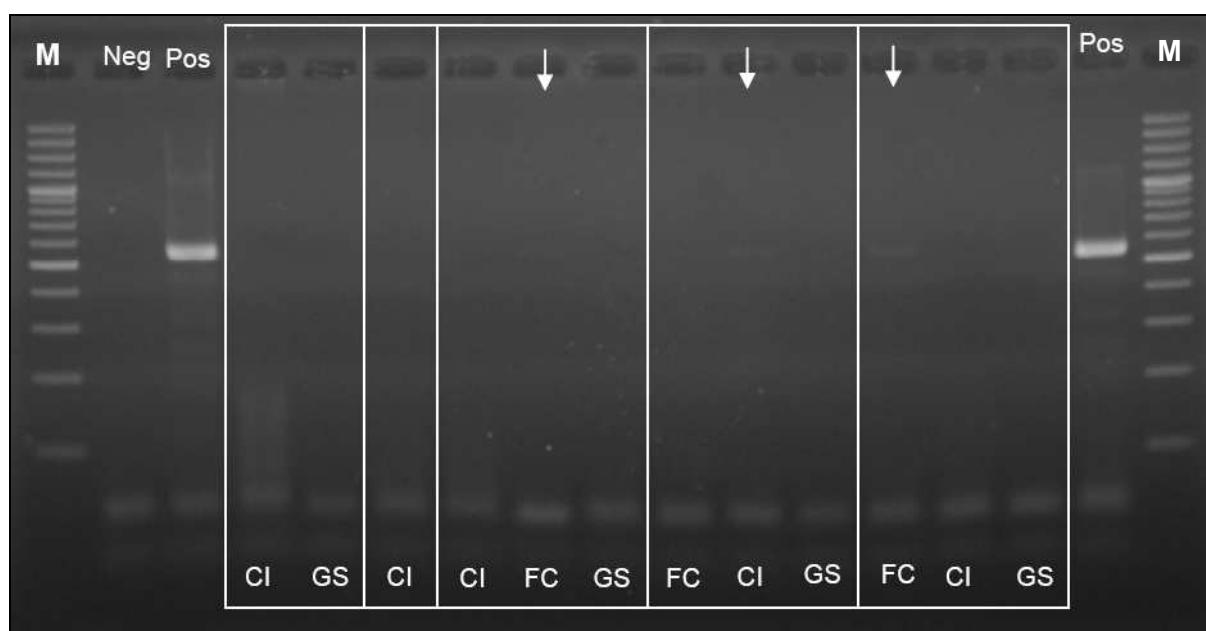
Si l'on s'intéresse aux localisations de *Trypanosoma evansi* dans les sangsues, il s'avère que le parasite semble confiné au contenu intestinal. Aucun échantillon prélevé dans le fluide coelomique ni dans les glandes salivaires ne se révèle positif après la migration des produits de l'amplification. Dans cette espèce de sangsue, le parasite ne paraît donc pas capable de quitter le tube digestif afin de rejoindre le liquide coelomique.

Le dernier échantillon positif a été prélevé dans une sangsue sacrifiée 30 jours après sa récolte. *Trypanosoma evansi* est donc un parasite dont l'ADN peut naturellement persister dans le tube digestif de la sangsue au moins 30 jours après un repas infectant.



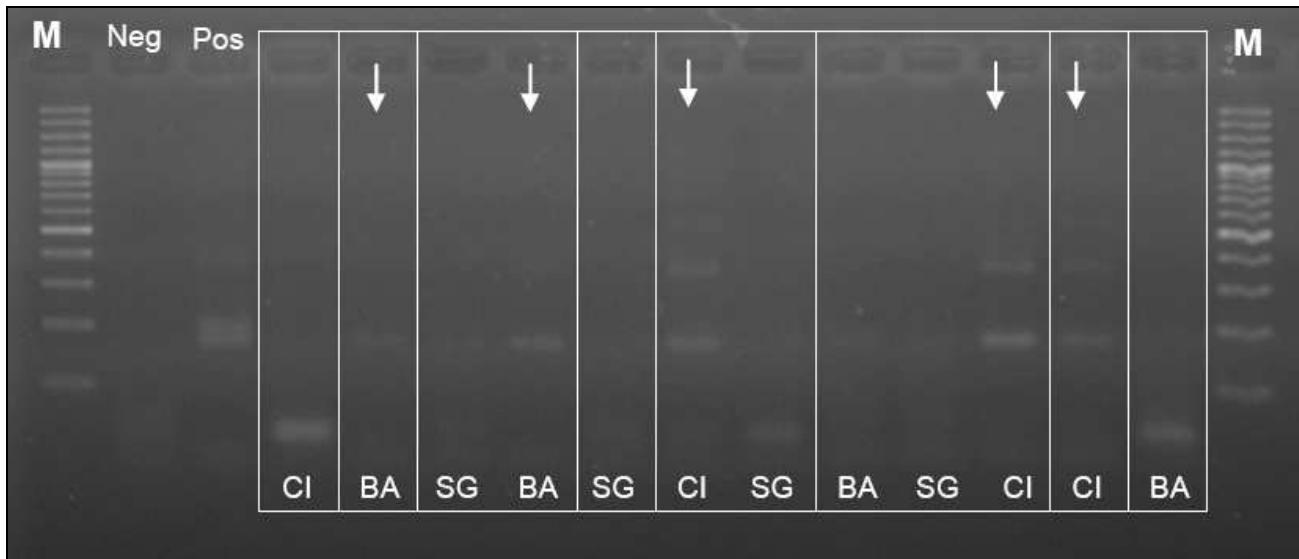
**Figure 12 : Gel d'électrophorèse 1 des produits de PCR obtenus avec les amores TRYP 1 à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sanguins récupérées sur le terrain.**

M : marqueur moléculaire 100bp plus (Fermentas) ; Neg : contrôle négatif ; Pos : contrôle positif ;  
CI : Contenu Intestinal ; BA : Bulle Agonique ; GS : Glandes Salivaires. Chaque rectangle correspond à une sanguine.



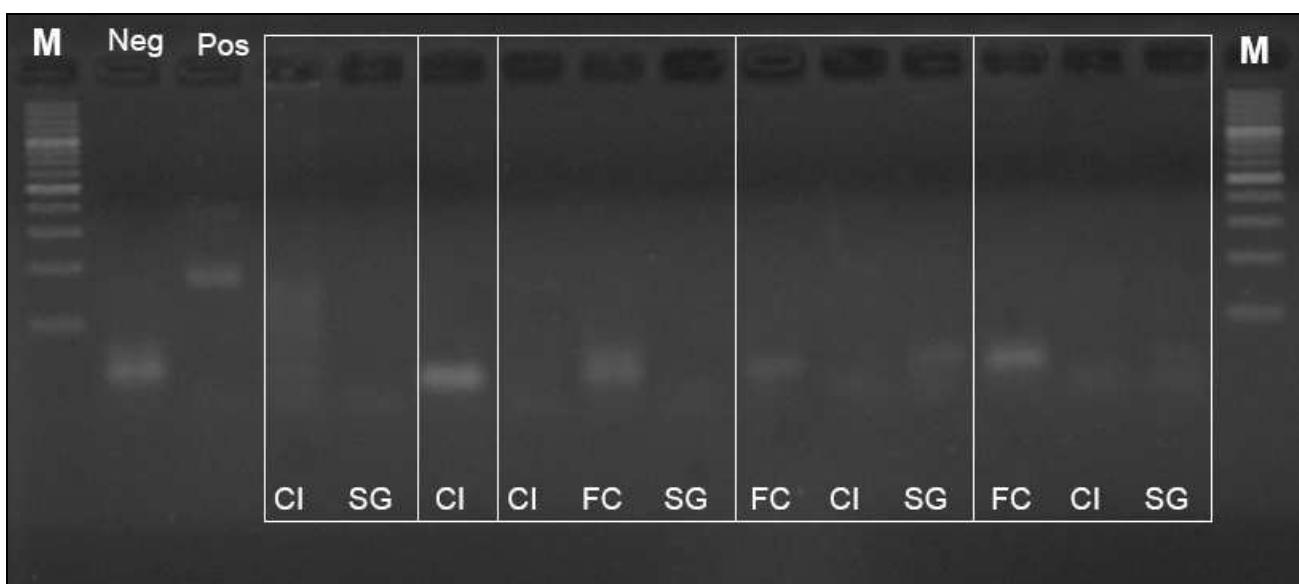
**Figure 13 : Gel d'électrophorèse 2 des produits de PCR obtenus avec les amores TRYP 1 à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sanguins récupérées sur le terrain.**

M : marqueur moléculaire 100bp plus (Fermentas) ; Neg : contrôle négatif ; Pos : contrôle positif ;  
CI : Contenu Intestinal ; GS : Glandes Salivaires ; FC : Fluide Cœlomique.;



**Figure 14 : Gel d'électrophorèse 1 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sanguines récupérées sur le terrain.**

M : marqueur moléculaire 100bp plus (Fermentas) ; Neg : contrôle négatif ; Pos : contrôle positif ; CI : Contenu Intestinal ; BA : Bulle Agonique ; SG : Glandes Salivaires



**Figure 15 : Gel d'électrophorèse 2 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sanguines récupérées sur le terrain.**

M : marqueur moléculaire 100bp plus (Fermentas) ; Neg : contrôle négatif ; Pos : contrôle positif ; CI : Contenu Intestinal ; GS : Glandes Salivaires ; FC : Fluide Cœlomique.,;

### 3.4. Discussion

Ces observations ont donc permis de mettre en évidence la présence à l'état naturel d'ADN de *Trypanosoma evansi* dans la sanguine *Hirudinaria manilliensis*. La présence de *T. evansi* dans le tube digestif de ces sanguines n'est pas surprenante car, en Thaïlande, ces sanguines cohabitent fortement avec les buffles d'eau, animaux naturellement infectés par *T. evansi* et présentant parfois de fortes parasitoses. La limite de cette étude vient du fait qu'il est impossible de savoir quand les sanguines ont procédé à leur repas sanguin et ont donc éventuellement consommé les parasites. Pour les sanguines qui ne paraissent pas héberger l'ADN de *T. evansi*, il n'est pas possible de savoir si elles ont déjà été en contact avec le parasite ou si elles ont déjà dégradé l'ADN. Ces lacunes ne

permettent donc pas d'avancer avec certitude que *T. evansi* est incapable de franchir la barrière intestinale et ainsi de diffuser dans l'organisme de la sanguine. Il est seulement permis de conclure que les sanguines de l'espèce *Hirudinaria manilliensis* sont naturellement porteuses d'ADN de *T. evansi* et que celui-ci persiste dans le tube digestif de la sanguine plus de 30 jours après le repas infectant. L'observation dans le tube digestif d'une sanguine, de trypanosomes de morphologie compatible à celle de *T. evansi*, n'est pas sans ambiguïté car les analyses moléculaires ne sont pas réellement concluantes. Les essais de séquençages des produits de PCR avec les amores TRYP1 ont échoué car les signaux après migration étaient trop faibles. Etant donné que des trypanosomes vivants ont réellement été observés, d'autres essais de séquençages vont être menés.

#### **4. Evaluation de la survie et de la localisation de *Trypanosoma evansi* dans la sanguine**

Afin de confirmer les conclusions issues des observations réalisées sur des sanguines de terrain et énoncées dans la partie précédente, un protocole basé sur des infections expérimentales de sanguines a été mis en place. Des observations directes et des analyses moléculaires pourront ainsi être réalisées régulièrement avec un délai entre l'analyse et le repas infectant qui sera maîtrisé. La durée de vie du trypanosome dans la sanguine, la durée de persistance de l'ADN dans l'intestin, et la localisation des parasites dans les tissus selon la durée séparant l'observation du repas infectant seront les informations qui découleront de cette expérimentation.

##### **4.1. Matériel et méthode**

###### **Matériel**

Sanguines : six sanguines aquatiques ont été utilisées pour cette expérience. Leur capture a été faite 54 jours plus tôt. D'après leur taille, c'était des sanguines ayant réalisé au moins 2 repas sanguins, potentiellement infectants, avant d'être capturées. Elles avaient des tailles en extension comprises entre 10 et 15 cm.

Rat infecté : il s'agissait d'un rat Wistar, inoculé 4 jours plus tôt par une injection en intra-péritonéal d'une souche de *Trypanosoma evansi* isolée sur bovin à Bangkok. Au moment de l'expérience, le rat présentait une parasitémie de  $10^7$  trypanosomes/ml.

###### **Méthode**

Infection des sanguines : une à une, les six sanguines ont réalisé un repas sanguin sur le rat infecté, selon le protocole décrit en annexe (cf. Annexe 3). La durée du repas a été fixée à 10 minutes.

Mise en évidence de *T. evansi* : ces six sanguines, ayant reçu du sang parasité par voie orale, ont été disséquées une à une selon le protocole de dissection décrit précédemment, immédiatement après l'infection, à 1 jour, 3 jours, 7 jours, 14 jours et 30 jours post-infection. Le liquide coelomique a été recueilli et observé directement au microscope. Il a ensuite été fixé au méthanol sur une lame pour faire un frottis coloré à l'éosine et au bleu de méthylène (EBM). Après dilution du prélèvement avec du PSG 1% afin d'atteindre un volume de 200 µl, environ 100 µl a été injecté en intra-péritonéal à une souris et la quantité restante a été utilisée pour faire une analyse par PCR. Le contenu digestif a aussi été observé à l'état frais au microscope et 100 µl injectés en intra-péritonéal à une souris. La quantité restante a été utilisée pour faire des analyses par PCR. Des frottis ont aussi été réalisés afin d'apprécier l'état de dégradation des trypanosomes. Un prélèvement des glandes salivaires est observé à l'état frais au microscope. A été étudiée la présence de trypanosomes dans les glandes elles-mêmes, ainsi que dans les canaux sécrétateurs. Le tissu glandulaire a ensuite été broyé dans 200 µl de PSG 1 %. Le surnageant a servi à faire un frottis, 100 µl injectés en intra-péritonéal à une souris et la quantité restante a été utilisée pour faire des analyses par PCR. Concernant les analyses par PCR, les extractions ont été réalisées grâce au kit Geneaid. Etant donné que les quantités d'échantillon récoltées sont parfois très faibles, l'élution de l'ADN ne fut réalisée qu'avec 50 µl de

solution d'élution, comme cela est conseillé par le fabricant, de manière à concentrer l'ADN purifié. L'amplification fut réalisée avec les amores TBR.

## 4.2. Résultats

### 4.2.1. Observations et inoculations

#### *Dissection de la sangsue immédiatement après l'infection*

*Liquide cœlomique* : le liquide cœlomique a été observé au microscope 30 minutes après le repas infectant et une heure après. A chaque observation, aucun trypanosome n'a été observable. L'injection en intra-péritonéal à une souris saine n'a jamais permis l'observation de parasites dans le sang tout au long du suivi qui a duré 4 semaines.

*Contenu intestinal* : environ 30 minutes après le repas infectant, les trypanosomes présentaient toujours une bonne mobilité. Aucun trypanosome mort n'a été observable. A 1 heure post infection, la mobilité des trypanosomes a légèrement diminué et quelques spécimens morts ont pu être aperçus (cf. Figure 16). A 1h30, cette tendance s'est accentuée et 2 heures après le repas, près de 70 % des trypanosomes étaient morts. Les survivants apparaissaient peu mobiles. L'allure de certains d'entre eux était légèrement modifiée, leur cytoplasme semblant se concentrer dans la région postérieure qui apparaît donc plus arrondie. Une deuxième manipulation identique a été réalisée avec une autre sangsue. A l'observation du contenu intestinal, il est cette fois apparu que tous les trypanosomes étaient morts dès 45 minutes après le repas infectant.

*Glandes salivaires* : les différentes observations réalisées tout au long de la dissection, qu'elles soient directes ou après coloration, n'ont révélé la présence d'aucun trypanosome. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

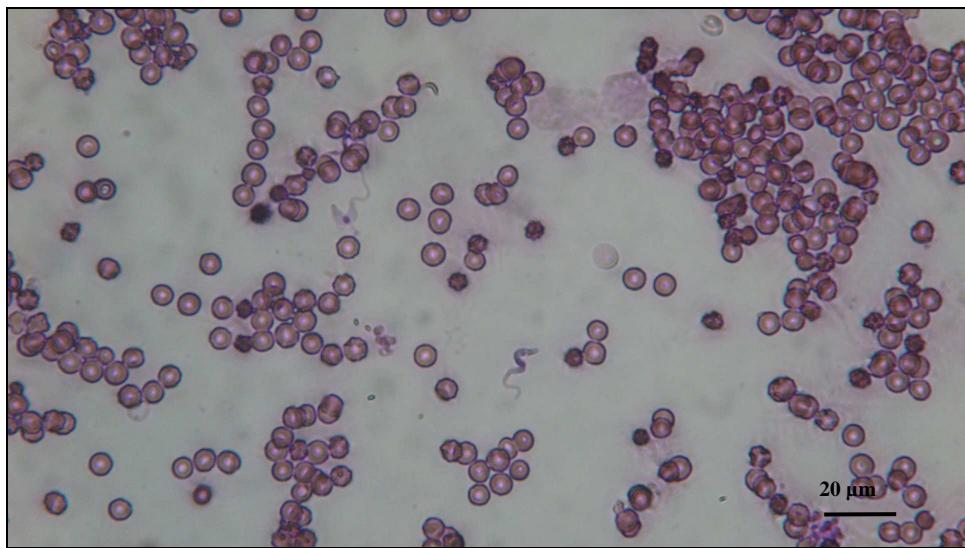


Figure 16 : Trypanosomes observés dans le tube digestif 1 heure après le repas infectant (coloration EBM) (cliché T. Vergne)

#### *Dissection de la sangsue à 1 jour post-infection*

*Liquide cœlomique* : aucun trypanosome n'a été observé. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

*Contenu intestinal* : de très nombreux trypanosomes morts sous forme trypomastigote étaient présents (cf. Figure 17), mais aucun trypanosome mobile n'a pu être mis en évidence. L'injection de 100 µl de contenu intestinal en intra-péritonéal à une souris naïve n'a jamais permis d'observer de parasitémie durant les trois semaines de suivi.

*Glandes salivaires* : aucun trypanosome n'a été observé ni dans les glandes salivaires, ni dans la salive véhiculée par les canaux excréteurs. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.



**Figure 17 : Trypanosomes morts dans le tube digestif de la sangsue 24 heures après un repas infectant (état frais)**  
(cliché T. Vergne)

#### **Dissection de la sangsue à 3 jours post-infection**

*Liquide cœlomique* : aucun trypanosome n'a été observé. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

*Contenu intestinal* : aucun trypanosome vivant n'était visible à l'observation directe. En revanche, la présence de nombreux trypanosomes morts sous forme trypomastigote pouvait encore une fois être notée. Ils se présentaient cependant dans un état plus dégradé que lors de la dissection de la sangsue 1 jour après le repas infectant. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

*Glandes salivaires* : aucun trypanosome vivant n'a été observé ni dans les glandes salivaires ni dans les canaux excréteurs. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

#### **Dissection de la sangsue à 7 jours post-infection**

*Liquide cœlomique* : aucun trypanosome n'a été observé. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

*Contenu intestinal* : les éléments figurés étaient très difficilement identifiables. Le contenu intestinal était très dense, rouge, et seulement quelques trypanosomes encore reconnaissables. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

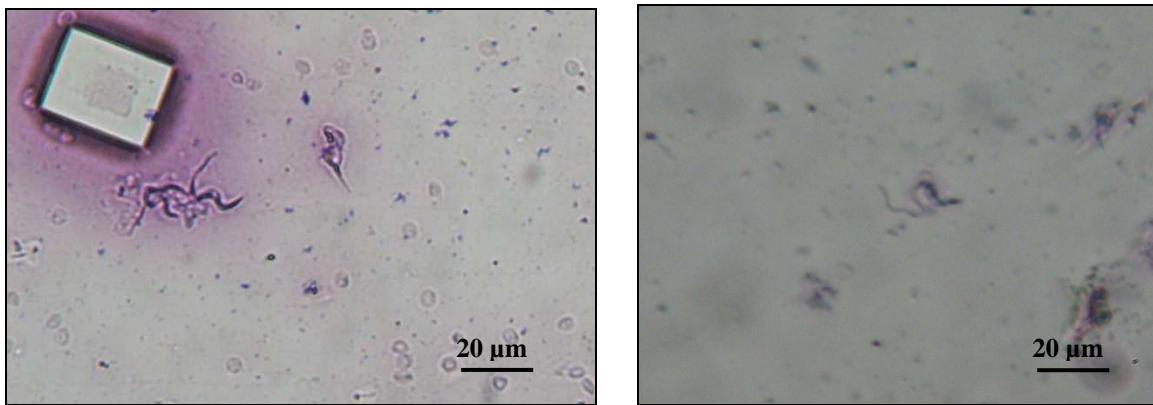
*Glandes salivaires* : aucun trypanosome n'a été visible à l'observation directe. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

#### **Dissection de la sangsue à 14 jours post-infection**

*Liquide cœlomique* : aucun trypanosome n'a été observé. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

*Contenu intestinal* : il était toujours très riche en débris cellulaires. A l'état frais, aucun trypanosome vivant n'a été observé. Quelques trypanosomes morts étaient visibles. Un frottis a été réalisé sur lequel il était possible de noter la présence de quelques trypanosomes (cf. Figure 18). Il y en avait cependant peu. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

*Glandes salivaires* : aucun trypanosome n'a été observé. La souris naïve ayant reçu l'injection de 100 µl de broyat de glandes salivaires en intra-péritonéal n'a jamais présenté de parasites dans le sang jusqu'à sa mort qui a eu lieu 19 jours après l'injection. Elle avait commencé à présenter des écoulements rouges au niveau des yeux 4 jours avant sa mort. Une analyse PCR avec amplification par amorce TBR a été réalisée sur le caillot sanguin présent dans la cavité cardiaque. Elle s'est révélée négative.



**Figure 18 : Trypanosomes morts observés dans le contenu digestif de la sangsue à 14 jours post-infection (frottis colorés) (clichés T. Vergne)**

#### **Dissection de la sangsue à 30 jours post-infection**

*Liquide cœlomique* : aucun trypanosome n'a été observé. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

*Contenu intestinal* : à l'observation directe, quelques érythrocytes étaient encore reconnaissables mais aucun trypanosome n'a pu être identifié. Les mêmes observations ont pu être faites concernant les frottis EBM. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

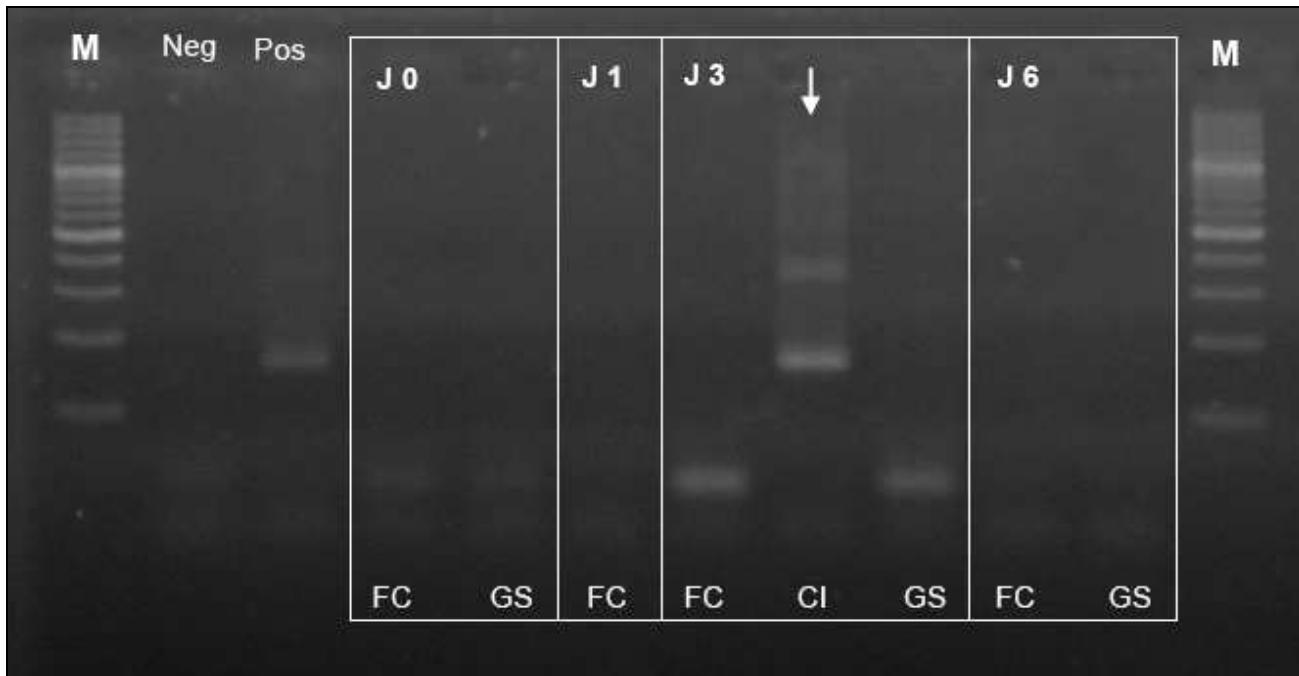
*Glandes salivaires* : aucun trypanosome n'a été observé. L'injection à la souris n'a jamais provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

#### **4.2.2. Résultats de l'analyse moléculaire par PCR**

A l'exception des échantillons provenant du contenu digestif des sangsues disséquées immédiatement et 1 jour après le repas infectant, tous les prélèvements de contenu digestif ont été analysés par PCR avec amplification par les amorce TBR. En effet, de très nombreux trypanosomes étaient facilement visibles dans ces échantillons, il ne nous a donc pas paru très intéressant d'en faire l'analyse. Concernant les glandes salivaires, il a été très difficile d'en récupérer des quantités suffisantes chez la sangsue disséquée 1 jour après le repas, ce qui explique l'absence d'analyse. Enfin, tous les échantillons de fluide cœlomique ont été analysés (cf. Figures 19 et 20).

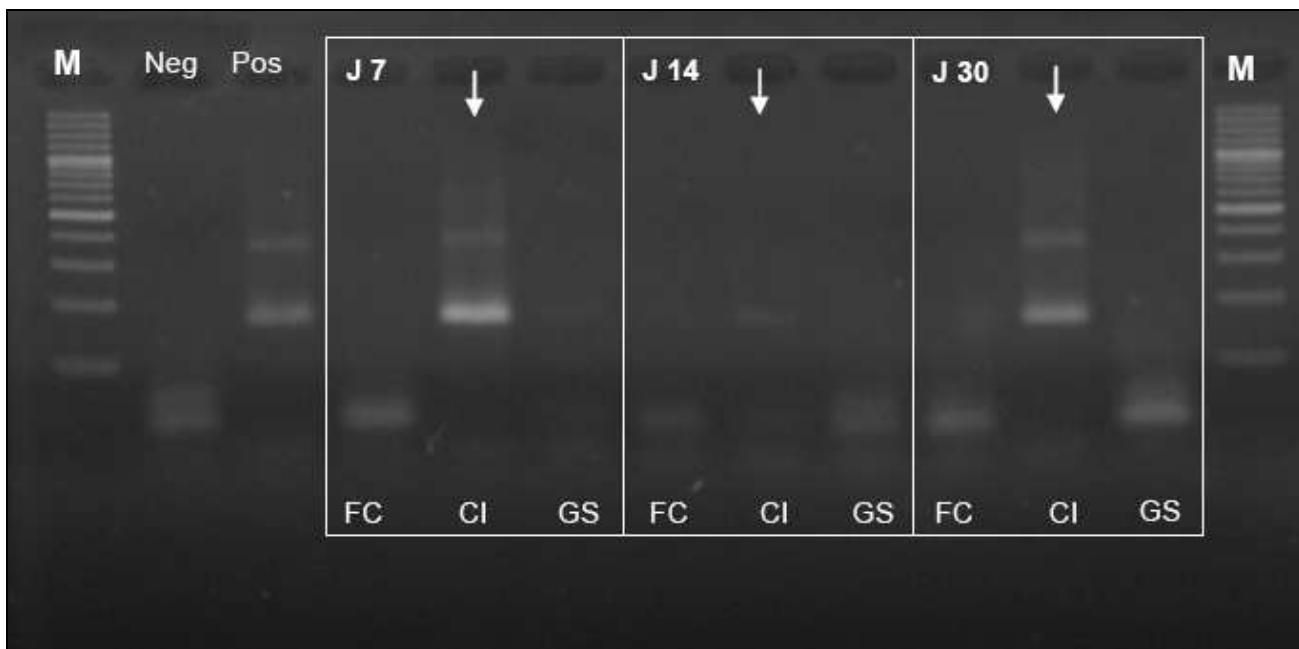
Tous les prélèvements effectués dans le contenu digestif ont provoqué des signaux après migration des produits de l'amplification. Ces résultats confirment donc la conclusion avancée dans le paragraphe précédent : l'ADN de *T. evansi* persiste dans le tube digestif de la sangsue *Hirudinaria manilliensis* au-delà de 30 jours après le repas infectant.

Enfin, aucun des prélèvements de glandes salivaires ou de fluide cœlomique n'a provoqué de signaux sur le gel. L'ADN de *T. evansi* n'y est donc pas présent confirmant encore une fois l'incapacité du parasite à quitter le tube digestif pour rejoindre le liquide cœlomique et par là diffuser dans tout l'organisme de la sangsue.



*Figure 19 : gel d'électrophorèse 1 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sanguines expérimentalement infectées.*

*M : marqueur 100bp plus (Fermentas) ; Neg : contrôle négatif ; Pos : contrôle positif ; J 0 : sanguine sacrifiée 30 minutes après le repas infectant ; J 1 : sanguine sacrifiée 1 jour après le repas infectant ; J 3 : sanguine sacrifiée 3 jours après le repas infectant ; J 6 : sanguine sacrifiée 6 jours après le repas infectant ; FC : Fluide Cœlomique ; GS : Glandes Salivaires ; CI : Contenu Intestinal.*



*Figure 20 : gel d'électrophorèse 2 des produits de PCR obtenus avec les amores TBR à partir d'échantillons pris dans différents compartiments de sanguines expérimentalement infectées.*

*M : marqueur 100bp plus (Fermentas) ; Neg : contrôle négatif ; Pos : contrôle positif 1 ; J 7 : sanguine sacrifiée 7 jours après le repas infectant ; J 14 : sanguine sacrifiée 14 jours après le repas infectant ; J 30 : sanguine sacrifiée 30 jours après le repas infectant ; FC : Fluide Cœlomique ; CI : Contenu Intestinal ; GS : Glandes Salivaires.*

### **4.3. Discussion**

L'ensemble des résultats obtenus grâce à cette expérimentation constitue d'intéressantes informations concernant l'implication de la sangsue *Hirudinaria manilliensis* dans l'épidémiologie de *Trypanosoma evansi*. Il apparaît que le parasite, s'il est ingéré par la sangsue lors d'un repas sur animal infecté, est incapable de quitter le compartiment digestif. Il y reste et subit la lente digestion de la sangsue. Il apparaît que *T. evansi* est incapable de survivre plus de quelques heures dans le tube digestif. Sa mort survient dès la première journée suivant le repas infectant, et parfois même très rapidement en moins d'une heure. A partir de ce moment là, plus aucune forme infectante du parasite n'est présente au sein de la sangsue dans les différents compartiments étudiés, l'appareil digestif, le fluide coelomique et les glandes salivaires. L'ADN du parasite est cependant capable de persister au-delà de 30 jours dans le contenu intestinal. Au regard de ces résultats, il semble que la sangsue *Hirudinaria manilliensis* ne constitue pas un vecteur de *Trypanosoma evansi* permettant la transmission de ce dernier quelques jours après un repas infectant. Elle constituerait un cul-de-sac épidémiologique de ce parasite. Cependant, comme il a été montré que *T. evansi* était parfois capable de survivre jusqu'à quelques heures dans le tube digestif de la sangsue, il paraît tout à fait probable qu'elle puisse provoquer une transmission mécanique immédiate par une contamination de la zone de morsure.

## **5. Evaluation de la transmission expérimentale de *Trypanosoma evansi* par la sangsue**

Comme énoncé précédemment, du fait de l'absence de formes infectantes du parasite dans la sangsue, cette dernière semble être un mauvais vecteur de *T. evansi*, au moins en ce qui concerne la transmission différée. Une transmission mécanique reste envisageable. Cette partie a pour objectif de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses en mettant en place des essais expérimentaux de transmission du parasite sur un modèle rongeur.

### **5.1. Etude préliminaire : Evaluation de l'infectiosité des sangsues récupérées sur le terrain**

Dans cette expérience, l'objectif est de vérifier que les sangsues qui seront utilisées pour les essais de transmission expérimentale de *T. evansi* sont bien incapables de transmettre le parasite de manière différée par la salive lors de la morsure, suite à une éventuelle infection dans la nature. Dans ce but, cette étude préliminaire a été réalisée avec des sangsues du terrain n'ayant pas subi d'infection expérimentale. Si ces résultats s'avèrent effectivement négatifs, les sangsues seront considérées comme non infectantes et seront alors réutilisées pour les essais de transmission expérimentale.

#### **5.1.1. Matériel et méthode**

##### **Matériel**

Sangues : dix-huit sangsues aquatiques ont été utilisées pour cette expérience. L'expérience a eu lieu 35 jours après leur capture pour douze d'entre elles et 63 jours après pour les six autres. C'étaient des sangsues ayant déjà réalisé des repas sanguins dans la nature avant d'être capturées. Elles avaient des tailles en extension comprises entre 5 et 8 cm.

Rats : il s'agissait d'un lot de trois rats de laboratoire Wistar mâles issus d'un élevage indemne de trypanosomes. Une goutte de sang a été prélevée à la queue sur chaque rat au début de l'expérience et a été observée au microscope. Ces rats ne présentaient pas de parasitémie.

## Méthode

Les dix-huit sangsues ont été réparties aléatoirement en trois lots de six individus. Toutes les sangsues ont réalisé une à une un repas sanguin de trois minutes sur un rat selon le protocole décrit en annexe. Lorsque les sangsues étaient retirées manuellement, la plaie était vérifiée. Si le sang ne coulait pas, les sangsues étaient repositionnées pendant trois minutes supplémentaires. Il était fait en sorte que les sangsues ne s'alimentent pas au niveau d'une plaie réalisée précédemment par une congénère. Chaque rat a donc servi de repas à six sangsues potentiellement infectées naturellement. La parasitémie des rats a par la suite été vérifiée trois fois par semaine pendant quatre semaines par observation au microscope d'une goutte de sang collectée à la queue.

### 5.1.2. Résultats

Tout au long de leur suivi, aucun des trois rats n'a présenté de parasite dans le sang.

### 5.1.3. Discussion

La libération de salive au niveau de la plaie est réalisée par la sangsue dans les quelques instants qui suivent l'effraction cutanée (Fermond 1854). Cette salive riche en hirudine, empêche le sang de coaguler. Elle permet aussi une analgesie au niveau de l'opercule rendant le repas plus aisés. La transmission éventuelle de *T. evansi*, si elle a lieu par la salive au moment où celle-ci est libérée, survient donc immédiatement après l'effraction de la barrière cutanée. Le fait de s'assurer que du sang coule par la plaie lorsqu'on retire la sangsue, nous indique que la contamination par le parasite a pu avoir lieu. Dans l'expérience réalisée ici, les rats n'ont jamais présenté de trypanosomes dans le sang durant les trois semaines de suivi. Connaissant la virulence de *T. evansi* chez ces rongeurs, il est justifié de conclure que soit, les sangsues n'ont jamais rencontré le parasite, soit même si le parasite est présent, la transmission à 35 jours et à fortiori à 63 jours, n'est pas possible. Les dix-huit sangsues utilisées pour cette expérience n'ont donc pas été capables de transmettre le parasite. Considérées en conséquence comme non infectantes, elles ont par la suite été utilisées pour être infectées expérimentalement afin de tester la transmission immédiate et les transmissions différées selon différents pas de temps. En attendant, les trois lots ont été conservés séparément.

## 5.2. Matériel et méthode

### Matériel

Sangsues : dix-huit sangsues aquatiques ont été utilisées pour cette expérience. Leur capture a été faite entre 50 et 80 jours plus tôt. C'étaient des sangsues ayant réalisé au moins un repas dans la nature avant d'être capturées. Elles avaient des tailles en extension comprises entre 5 et 8 cm. Comme expliqué dans le paragraphe précédent, ces sangsues ont été certifiées incapables de transmettre des trypanosomes qu'elles auraient éventuellement ingérés avant leur capture. On peut donc considérer que si transmission de trypanosomes il y a dans la suite de l'expérience, elle est réellement la conséquence de la transmission que l'on veut mettre en évidence.

Rats infectés : il s'agissait d'un lot de trois rats Wistar mâles inoculés 4 jours plus tôt en intraperitoneal avec une souche de *Trypanosoma evansi* isolée sur bovin. Au moment de l'expérience, les rats présentaient des parasitémies de  $10^6$  trypanosomes/ml.

Souris : il s'agissait d'un lot de sept souris ICR femelles issues d'un élevage indemne de trypanosomes.

### Méthode

Repas infectant : toujours grâce au même protocole, les dix-huit sangsues réparties en trois lots de six, ont été nourries une à une sur les trois rats infectés. Elles y ont été laissées fixées pendant cinq minutes. Les sangsues sont donc maintenant considérées comme infectées.

Repas révélateurs : ces repas vont tester la capacité des sanguins infectées à transmettre *T. evansi* à des souris saines. Ils ont eu lieu selon différents délais les séparant du repas infectant. Les dix-huit sanguins ont été réparties aléatoirement en neuf lots de deux. Chaque lot a réalisé son repas révélateur sur une souris. Quatre lots ont servi à tester la transmission immédiate : leur repas s'est fait moins de 30 minutes après le repas infectant. Deux lots ont exploré la transmission différée à 24h, un lot la transmission à 4 jours, un lot celle à 10 jours, et le dernier à 30 jours. Le déroulement du repas sanguin sur souris s'est déroulé selon le protocole décrit en annexe (cf. Annexe 3). La parasitémie des neuf souris a été contrôlée trois fois par semaine pendant les quatre semaines qui vont suivre les repas révélateurs. Elles ont été logées séparément.

## 6.2. Résultats

Les quatre souris ayant servi à mettre en évidence une éventuelle transmission immédiate n'ont jamais présenté de parasites dans le sang tout au long de leur suivi qui a duré 4 semaines. Pour augmenter la sensibilité de la détection, des observations entre lame et lamelle du buffy coat après centrifugation en tube hématocrite du sang des souris, ont été réalisées à 3 et à 4 semaines (Woo 1969). Elles se sont révélées négative. De la même manière, les deux souris utilisées pour l'étude de la transmission à 24h ainsi que celles utilisées pour investiguer les transmissions à 4 jours et à 10 jours, se sont révélées négatives pendant les 4 semaines de suivi. Une des deux sanguins du lot servant à mettre en évidence une éventuelle transmission à 30 jours est morte 18 jours après le repas infectant. Le repas révélateur à 30 jours a donc été réalisé avec une seule sanguine. La souris ayant servi à ce repas révélateur n'a jamais présenté de parasitémie tout au long du mois de suivi.

## 6.3. Discussion

Aucun repas révélateur n'a donc provoqué de parasitémie chez les souris, qu'ils se soient passés immédiatement après le repas infectant ou 1 jour, 4 jours, 10 jours ou même 30 jours après. Pour évaluer la possibilité d'une transmission mécanique immédiate, conséquence d'une souillure du site de morsure par des trypanosomes encore situés sur les mâchoires de la sanguine, 8 individus ont été utilisés. Même si ce mode de transmission paraissait très plausible, aucun passage n'a pu être mis en évidence. L'hypothèse d'une transmission du parasite de rongeur à rongeur voire de bovin à bovin, par interruption du repas sanguin et reprise sur un autre hôte de la même espèce quelques minutes après, paraît donc peu probable. Les sanguins de l'espèce *Hirudinaria manilliensis* semblent donc être de mauvais vecteurs mécaniques. Les essais de transmission à 1 jour et à 4 jours après l'infection auraient de même servi à investiguer des transmissions entre animaux de la même espèce. Mais comme le laissaient prévoir les résultats de la partie précédente, ces essais de transmission se sont révélés eux aussi infructueux. Les transmissions à 10 jours et surtout à 30 jours auraient pu permettre un passage du parasite du cycle des rongeurs à celui des grands herbivores car entre les deux repas, l'augmentation de taille de la sanguine peut lui permettre d'acquérir les capacités à réaliser son repas en perçant des peaux plus épaisses. Ces transmissions auraient impliqué soit une survie du parasite dans le tube digestif de la sanguine soit un passage dans le liquide coelomique pour rejoindre les glandes salivaires et pouvoir être réinjectés lors d'un nouveau repas. Confirmant les résultats de la partie précédente, ces essais ont eux aussi été non concluants. Les effectifs de sanguins ayant servi à tester ces hypothèses étant faibles, les potentialités vectrices de ces annélides ne peuvent pas être considérées comme nulles.

## 7. Conclusion sur le rôle de la sanguine en tant que vecteur de *Trypanosoma evansi*

En Thaïlande, les sanguins de l'espèce *Hirudinaria manilliensis*, aussi appelées « sanguins du buffle », sont des annélides que l'on rencontre dans des marécages, des lacs peu profonds ou des

rizières. Ces environnements sont aussi des espaces où cohabitent des bovins d'élevage et des petits rongeurs, animaux naturellement infectés par *Trypanosoma evansi*. Les modalités de passage éventuel du parasite des rongeurs aux bovins et entre rongeurs étant inconnues, la présente étude a essayé d'évaluer le rôle de la sangsue dans la transmission du parasite. Suite aux différentes manipulations, il s'est avéré que cette sangsue était naturellement porteuse d'ADN de *Trypanosoma evansi* dans son tube digestif, conséquence de l'ingestion du parasite lors de repas sanguins sur des animaux parasitiques. Ce portage de l'ADN du parasite peut perdurer pendant des durées assez conséquentes car il a été montré ici, que 30 jours après le repas infectant, l'ADN était toujours détectable. Cependant, il s'est avéré que *T. evansi* était incapable de survivre plus de quelques heures dans le tube digestif de ces sangsues. De plus, *T. evansi* semble incapable de quitter le tube digestif pour rejoindre la circulation cœlomique et diffuser dans l'organisme de l'annélide. Dès lors, il apparaît très improbable que cette sangsue soit capable de transmettre le parasite des rongeurs aux bovins après avoir acquis la capacité de se nourrir sur des grands animaux. Des transmissions mécaniques auraient pu être envisageables par interruption du repas sur un animal infecté puis reprise sur un animal sain. Quoi qu'il en soit, les expériences expliquées dans cette étude n'ont pas réussi à les mettre en évidence. La sangsue *Hirudinaria manilliensis* n'est capable de transmettre *T. evansi* ni de manière immédiate, ni de manière différée. Elle n'est alors qu'un cul-de-sac dans l'épidémiologie du parasite. Néanmoins, ces conclusions n'écartent pas un possible rôle d'autres espèces de sangsues comme cela semble avoir été observé avec des sangsues terrestres de l'espèce *Haemadipsa zeylanica* (Tubangui 1932).

# **Chapitre III : Evaluation de la transmission de *Trypanosoma evansi* par ingestion de tiques contaminées**

En Thaïlande, des rongeurs sauvages capturés en zone rurale ont été trouvés infectés par *Trypanosoma evansi* (Jittapalapong et al. 2008). Cependant, dans la mesure où ils ont une activité crépusculaire et nocturne alors que les vecteurs généralement impliqués dans la transmission du parasite ont une activité plutôt diurne, les modalités de passage du protozoaire au cycle des rongeurs sont encore inconnues. Il est possible que les deux cycles soient indépendants avec des modalités de transmission propres ou qu'il existe un lien épidémiologique entre eux. Pour répondre à cette question, une étude en cours en Thaïlande a pour objectif de comparer des souches isolées sur grands herbivores à celles isolées sur petits rongeurs. Ici, l'objectif de nos travaux est d'expliquer l'éventuel passage de *T. evansi* d'un cycle à l'autre et le maintien du parasite chez les rongeurs, par l'ingestion de tiques s'étant gorgées sur un animal contaminé.

## **1. Transmission de *Trypanosoma evansi* chez la souris et le rat par ingestion de sang contaminé**

Un pré-requis à la mise en évidence d'une transmission par ingestion de tiques contaminées, est de s'assurer que le parasite est bien capable d'atteindre la circulation sanguine en franchissant des muqueuses saines. Bien que cela ait été déjà documenté (Raina et al. 1985 ; Silva et al. 2007), il est important de valider ce phénomène dans les conditions qui sont les nôtres, avec les souches parasitaires et les animaux que nous allons utiliser dans l'expérience.

### **1.1. Matériel et méthode**

Rats sains : deux rats Wistar ont été utilisés pour cette expérience. Une goutte de sang prélevée à la queue nous a permis de nous assurer qu'ils ne présentaient pas de parasitémie.

Souris saines : deux souris de laboratoire (*Mus musculus*) de souche ICR ont été utilisées pour cette expérience. Les souris ont été assurées saines de la même manière que les rats.

Rat contaminé : un rat Wistar fut inoculé inoculé 4 jours avant le début de l'expérience avec une souche de trypanosomes isolée sur bovin. Au moment de l'expérience, le rat présentait une parasitémie de  $10^7$  trypanosomes/ml.

#### **Méthode**

Le rat contaminé a été sacrifié, son sang recueilli sur citrate dans un tube Falcon. La motilité des parasites a été vérifiée en début d'expérience. Grâce à une seringue, 1 ml de sang a été donné à manger à chaque rat sain, en deux repas espacés de 10 minutes. De la même manière, 0,5 ml de sang a été donné aux souris en deux fois. Les repas effectués, la motilité des parasites a été vérifiée. Les rats ont été logés séparément des souris. De l'eau et de la nourriture leur ont été donnés à volonté. Deux rats et deux souris n'ayant pas consommé de sang parasité constituaient un lot témoin. La parasitémie de tous les animaux a été vérifiée quotidiennement par observation directe entre lame et lamelle d'une goutte de sang prélevée à la queue.

### **1.2. Résultats**

Dans le lot témoin, aucun des animaux n'a présenté de parasites dans le sang tout au long des 4 semaines de suivi.

La parasitémie chez les rats est devenue positive pour les deux animaux. Des parasites ont pu être observés dès 4 jours pour l'un et dès 5 jours pour l'autre. Au bout de sept jours, les animaux présentaient tous les deux une parasitémie d'environ  $10^6$  trypanosomes/ml.

En revanche, aucune des deux souris n'a présenté de parasites dans son sang tout au long des 4 semaines de suivi. Des observations entre lame et lamelle du buffy coat après centrifugation en tube hématocrite du sang des souris, ont été réalisées à 3 et à 4 semaines. Elles se sont révélées négatives.

### 1.3. Discussion

Les résultats de cette étude montrent que la transmission de *T. evansi* par voie orale chez les rats est possible, même en l'absence de lésions buccales majeures. Ces observations confirment l'hypothèse de Raina qui avançait que le parasite était capable de franchir des muqueuses buccales ou gastro-intestinales saines pour atteindre la circulation capillaire. Cependant, d'après les résultats de notre expérience, cette conjecture semble valable uniquement pour les rats, alors que Raina avait réussi à le mettre en évidence chez les souris (Raina et al. 1985). Cette discrimination d'espèce va en revanche dans le sens des observations publiées par da Silva qui avait justement montré une possibilité d'infection par voie orale des rats mais pas des souris (da Silva et al. 2007). Ce passage transmuqueux du parasite chez les rats justifie les travaux menés ici concernant la contamination des rongeurs par ingestion de tiques contaminées.

## 2. Transmission de *Trypanosoma evansi* par ingestion de tiques gorgées sur bovins infectés

### 2.1. Travaux préliminaires

Pour obtenir des tiques gorgées sur bovin infecté, un premier essai a été réalisé sur un bovin. Des sacs à tique ont été posés sur le bovin comme décrit ci-dessous. Deux semaines plus tard, le bovin a été inoculé à partir de 10 ml de sang de rat parasitémique présentant  $10^7$  trypanosomes/ml. La parasitémie du bovin a été contrôlée 3 fois par semaine, puis tous les jours lors du décrochage des tiques gorgées. Cette parasitémie a été faible, oscillant généralement autour de  $10^3$  trypanosomes/ml. Un pic de parasitémie à  $10^4$  trypanosomes/ml de 2 jours a pu être observé. La parasitémie étant donc trop faible pour permettre de retrouver avec certitude des trypanosomes dans les tiques gorgées, il a été décidé de refaire l'expérience avec deux bovins splénectomisés afin d'augmenter les chances de récupérer des tiques suffisamment contaminées.

### 2.2. Production de tiques gorgées sur bovins infectés

#### Matériel

Tiques : ce sont des larves de tiques de l'espèce *Boophilus microplus*.

Bovins : il s'agit de deux taurillons de type Holstein (97 %) âgés de 10 mois. Ils ont été splénectomisés 2 mois avant le début de l'expérience.

#### Méthode

Obtention des larves de *Boophilus microplus* : des femelles gorgées ont été récupérées lors d'une mission terrain dans le Nord-est de la Thaïlande. Au laboratoire, dix femelles sont retournées et plaquées sur une bande adhésive de telle manière que la partie antérieure dépasse largement du ruban (cf. Figure 21). Elles ont été conservées ainsi dans une enceinte dont le taux d'humidité était maintenu vers 70 % et la température vers 30°C, jusqu'à la ponte qui a commencé 3 semaines après le positionnement des tiques gorgées. Une dizaine de jours plus tard, toutes les tiques avaient fini de pondre. Les œufs de chaque tique ont été récupérés avec un pinceau propre et ont été disposés séparément dans 10 tubes en verre stériles dont l'embouchure a été obstruée avec un peu de coton. Les tubes ont été conservés dans une enceinte dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. L'éclosion des larves a débuté 18 jours après l'oviposition et s'est déroulée sur une semaine.



**Figure 21 : *Boophilus microplus* femelles en ponte (cliché T. Vergne)**

Pose des tiques sur les bovins : deux zones circulaires de 20 centimètres de diamètres ont été tondues sur chaque bovin au niveau de l'omoplate. Des petits sacs cylindriques en tulle ont été collés sur ces zones par une extrémité. Le lendemain, environ 200 larves de tiques écloses au moins une semaine auparavant ont été déposées sur chaque bovin, dans les sacs dont la deuxième ouverture a été fermée par un élastique (cf. Figure 22). Trois fois par semaine, les sacs sont contrôlés pour vérifier que la vache ne les a pas arrachés. L'état de gorgement des tiques est aussi évalué.



**Figure 22 : Sacs à tique posés sur le bovin (cliché T. Vergne)**

Infection des bovins : Environ 2 semaines après la pose des larves de tique sur les bovins, un rat préalablement infecté avec une souche de *T. evansi* isolée sur bovin, a été sacrifié et son sang récolté sur citrate. Les bovins ont alors été inoculés avec 5 ml de sang à  $10^6$  trypanosomes/ml directement dans le flux sanguin de la veine jugulaire. Leur parasitémie a été contrôlée tous les deux jours. Une semaine après l'inoculation les tiques gorgées ont commencé à se décrocher.

## Résultat

Une fois de plus, et ce malgré la splénectomie réalisée deux mois plus tôt, les trypanosomes n'ont pas produit de fortes parasitémies. Trois jours après l'inoculation, il était pourtant possible

d'en observer 1 à 2 par champs de microscope au grossissement 600 chez les deux animaux. Malheureusement, il y a ensuite eu une phase d'éclipse de 4 jours coïncidant avec le début de la collecte des tiques. La parasitémie est ensuite légèrement remontée permettant l'observation de 1 à 3 trypanosomes tous les 10 champs de microscope, ce qui reste très faible ( $10^3$  trypanosomes/ml). Les tiques gorgées que nous avons récupérées n'avaient donc qu'une faible probabilité d'héberger *T. evansi*. Près de 400 larves de *Boophilus microplus* ont été posées sur les 2 bovins et 87 femelles gorgées ont pu être collectées 3 semaines après la pose. En supposant que le ratio mâle/femelle était de 50 %, le rendement de collecte a donc été de 87/200 soit 43 % ce qui est nettement supérieur au taux de succès que l'on peut obtenir en l'absence de sacs, qui dépasse rarement les 10 %. Ce rendement aurait pu être supérieur si une des deux vaches n'avait pas réussi à retirer ses deux sacs 8 jours après la pose des tiques. Même si d'autres sacs ont été posés le lendemain, le nombre de tiques récoltées sur cette vache (9) a été plus faible que sur l'autre (78). La collecte a débuté vingt jours après la pose des larves et s'est déroulée sur sept jours avec quatre jours de collecte. Les résultats sont consignés dans le Tableau 1. Initialement, les tiques devaient servir à nourrir trois rats, trois souris et un bovin afin d'investiguer les transmissions des bovins aux rongeurs et entre bovins. Le petit nombre de tiques récupérées et la faible parasitémie ont conduit à adapter le protocole. Dans l'objectif d'explorer les liens épidémiologiques entre les cycles rongeur et grands herbivores, les tiques ont été uniquement utilisées pour nourrir trois rats dont la capacité à s'infecter par voie orale a été démontrée plus haut.

Date (nombre de jours après la pose des larves)	Identification du bovin	Parasitémie (nombre de parasites observés par champ au grossissement 600)	Nombre de tiques gorgées récoltées
20	1	nulle (éclipse)	19
	2	nulle (éclipse)	2
21	1	nulle (éclipse)	36
	2	nulle (éclipse)	4
23	1	0,3	20
	2	0,1	2
26	1	0,2	3
	2	0,1	1

Tableau 1 : Résultats de la collecte de tiques gorgées sur bovins infectés

### 2.3. Essai de transmission aux rongeurs

#### Matériel

Rongeurs : du fait du petit nombre de tiques collectées et de la faible parasitémie, le lot rongeur n'a été constitué que par 3 rats Wistar provenant d'un élevage indemne de trypanosomes. Les 3 souris ont donc été écartées. Les rats ont été logés dans une cage à l'abri de vecteurs de *T. evansi*.

Tiques : tiques de l'espèce *Boophilus microplus* gorgées sur animal infecté dont le protocole d'obtention a été expliqué plus haut. Les tiques ont été collectées alors qu'elles sont encore fixées sur le bovin. Elles ont donc été décrochées manuellement afin de maîtriser le délai entre le décrochement et l'ingestion par les rats.

#### Méthode

Les tiques ont été récoltées sur les bovins et introduites dans les 10 minutes qui suivent, dans la cage des rongeurs dont la litière a été retirée. Les rats les ont ingurgitées et leur parasitémie a été surveillée 3 fois par semaine pendant 4 semaines.

## Résultats

Repas de tiques : au cours du premier repas, les rongeurs ne consomment pas franchement les tiques. Ils les sentent, les croquent, les lèchent un peu et finissent par les avaler au bout d'une trentaine de minutes. Par la suite, l'ingestion est beaucoup plus rapide car dès le troisième repas, les tiques sont à peine introduites dans la cage que les rats s'en saisissent et les consomment.

Suivi de la parasitémie des rats : aucun des trois rats n'a présenté de parasites dans le sang tout au long du suivi qui a duré 4 semaines.

## Discussion

L'ingestion par des rats de tiques gorgées sur des bovins infectés est un modèle qui pourrait expliquer le passage de *Trypanosoma evansi* chez les rongeurs qui vivent préférentiellement la nuit. Malheureusement, dans les conditions qui ont été celles de l'expérience précédemment décrite, aucune infection de rats n'a pu être mise en évidence. Cet échec est essentiellement du aux bovins infectés qui ne présentaient que de très faibles parasitémies. Malgré les splénectomies censées diminuer les réponses immunitaires de l'hôte, il n'a jamais été possible d'obtenir des parasitémies satisfaisantes. Pour répondre définitivement à la problématique, il serait donc nécessaire de renouveler cette expérience afin d'arriver à gorger des tiques sur des animaux réellement parasitétiques. Pour augmenter les chances de succès, il pourrait être envisagé de provoquer une immunosuppression chimique à la déexamethasone quelques jours avant l'infection expérimentale des bovins.

## 3. Transmission de *Trypanosoma evansi* par ingestion de tiques gorgées sur rongeurs infectés

### 3.1. Travaux préliminaires

Dans le but d'obtenir des tiques gorgées sur rongeurs infectés, le modèle lapin a été initialement utilisé. Deux lapins ont été inoculés par injection en intra-musculaire de 1 ml d'une souche cryopréservée de *T. evansi* isolée sur cerf. La parasitémie chez les deux lapins s'est révélée très faible et fluctuante pendant tout le mois de suivi. Il a donc été décidé de changer de souche pour travailler avec une souche isolée sur bovin. Les résultats chez deux nouveaux lapins n'ont pas été meilleurs. Les trypanosomes de cette dernière souche ont alors été cultivés *in vivo* sur souris afin d'augmenter leur nombre et leur vivacité. La parasitémie de deux nouveaux lapins s'est encore une fois révélée très faible tout au long du mois de suivi. Deux nouveaux lapins ont alors subi un protocole d'immunosuppression à la déexamethasone (DEXON A®) à raison d'une injection de 2 mg/kg en IM pendant cinq jours consécutifs. Ce protocole est celui que les chercheurs de l'université de Kasetsart utilisent habituellement pour l'immunosuppression des lapins. Les lapins ont ensuite été inoculés deux jours après la fin du protocole d'immunosuppression à partir de sang de souris parasitée. La parasitémie est restée faible. La race des lapins a alors été mise en cause, ce qui nous a amené à en changer. La parasitémie est à nouveau restée faible. Nous sommes alors passés sur un modèle cobaye qui, normalement, se révèle efficace pour la culture *in vivo* de *T. evansi* (Balis 1963), et avons inoculé deux animaux en intra-péritonéal avec  $10^6$  trypanosomes. Encore une fois, la parasitémie n'a jamais dépassé  $10^4$  trypanosomes/ml. Nous avons alors pris la décision d'utiliser le modèle rat avec lequel nous sommes sûrs que les trypanosomes se multiplient efficacement mais chez qui la pose des tiques et leur maintien pendant une semaine présageaient d'autres difficultés.

### 3.2. Production de tiques gorgées

#### Matériel

Tiques : ce sont des tiques adultes de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*. Des lots de 10 males et 40 femelles ont été réalisés.

Rats : il s'agissait de 6 rats Wistar mâles adultes

## Méthode

Pose des tiques sur les rats : les 6 rats ont été anesthésiés par injection intra-péritonéale de Zoletil à la dose de 50 mg/kg recommandée par le fabricant. Environ 10 minutes plus tard, les rats se sont assoupis. La zone du corps, cylindrique, comprise entre les membres antérieurs et les membres postérieurs a été tondue. Des petits vêtements adaptés aux dimensions des rats, ont été posés sur chacun. Ces vêtements, munis d'une fermeture éclair, entouraient l'abdomen du rat. Ils ont été fixés par de la colle (cf. Figure 23). Une fois les habits positionnés, la fermeture éclair a été ouverte et les 50 tiques (40 femelles et 10 males) ont été introduites dans le vêtement. Les rats, logés par trois, ont été remis dans leur cage (cf. Figure 24). L'eau leur a été fournie à volonté et la nourriture le leur a été à partir du lendemain.

Infection des rats : une souche cryopréservée de *T. evansi* isolée sur bovin a été utilisée pour l'inoculation des rats qui a eu lieu 3 jours après la pose des tiques. Elle a été faite en intra-péritonéal avec  $10^6$  parasites.



a



b



Figure 24 : Vêtements collés sur les rats

Figure 23 : Vêtements des rats pour protéger les tiques

a : vue extérieure. b : vue intérieure

## Résultat

Les rats, une fois complètement réveillés, sont redevenus très actifs et ont souvent essayé de retirer leur vêtement. De nombreuses tiques ont ainsi été perdues. La collecte des tiques a été réalisée sur deux jours. Le premier jour, 41 tiques ont été retirées de trois rats présentant alors entre 6 et 10 trypanosomes par champ de microscope au grossissement 600. Le deuxième jour, 74 tiques ont été récupérées sur les trois rats restants alors que 15 à 20 trypanosomes étaient visibles par champ de microscope au grossissement 600. Sur les 240 femelles déposées sur les rats dans le vêtement, seulement 115 ont donc pu être récoltées ce qui conduit à un rendement de 48 %. Le principal problème rencontré est que les vêtements ne permettaient que très laborieusement d'aller récupérer les tiques par la fermeture éclair. Il fallait alors retirer totalement l'habit pour décrocher les tiques gorgées (cf. Figure 25). Mais une fois que l'habit est retiré, il n'est plus possible de le remettre et les rats s'enlèvent les tiques. Il nous a donc fallu les décrocher toutes au même moment même si leur état de gorgement n'était pas identique. Les tiques récupérées n'étaient donc pas toutes gorgées au maximum. Encore une fois, la quantité de tiques récupérées, n'a pas été suffisante pour nourrir à la fois des rats, des souris et un bovin. Dans l'objectif d'explorer les liens épidémiologiques entre les cycles rongeur et grands herbivores, les tiques ont été uniquement utilisées pour nourrir un bovin. Cependant, un petit nombre a quand même servi à évaluer la durée de survie des trypanosomes dans la tique.



Figure 25 : Tiques gorgées fixées sur un rat infecté (cliché T. Vergne)

### 3.3. Survie de *Trypanosoma evansi* dans les tiques du genre *Rhipicephalus*

#### Matériel

Quatre tiques, de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*, gorgées sur un rat infecté 4 jours plus tôt avec une souche cryopréservée de *T. evansi*, ont été décrochées alors qu'elles présentaient un très bon état de gorgement. La parasitémie du rat était alors de  $10^6$  trypanosomes/ml.

#### Méthode

Les tiques ont servi à l'évaluation de la survie des trypanosomes jusqu'à 4 heures après décrochement. Une première tique a été utilisée pour tester la présence de *T. evansi*, 30 minutes après le décrochement. Par une aiguille fine, sa cuticule a été percée dans la région antérieure de l'abdomen et le contenu de la tique a été observé entre lame et lamelle pour chercher la présence de trypanosomes vivants. Quel que fut le résultat, le contenu de la tique a ensuite été injecté à une souris par voie intra-péritonéale. Des contrôles de parasitémie chez la souris ont été réalisés trois fois par semaine pendant 4 semaines ou jusqu'au moment où des parasites apparaissaient. Ces manipulations ont été renouvelées sur les 3 autres tiques à 1 heure, 2 heures et 4 heures après le décrochement.

#### Résultats

Evaluation de la survie des trypanosomes dans la tique à 30 minutes : de nombreux trypanosomes très mobiles ont été observés dans le contenu digestif de la tique. L'inoculation à la souris a provoqué une parasitémie qui est apparue 3 jours après l'injection.

Evaluation de la survie des trypanosomes dans la tique à 1 heure : là encore, de nombreux trypanosomes vivants ont pu être observés. Leur mobilité était un peu réduite, mais ils étaient encore vifs. L'inoculation à la souris a provoqué une parasitémie qui est apparue 3 jours après l'injection.

Evaluation de la survie des trypanosomes dans la tique à 2 heures : encore une fois, des trypanosomes vivants étaient présents en assez grand nombre. Cependant, leur vivacité était nettement diminuée, leurs déplacements beaucoup plus limités et leur forme changée. Le contenu cytoplasmique se concentrait dans la partie postérieure. L'inoculation à la souris a provoqué une parasitémie qui est apparue 4 jours après l'injection.

Evaluation de la survie des trypanosomes dans la tique à 4 heures : cette fois, aucun trypanosome n'a pu être observé au microscope. L'inoculation à la souris n'a pas provoqué de parasitémie tout au long du suivi.

#### Discussion

*T. evansi* est donc un parasite capable de survivre quelques heures dans les tiques du genre *Rhipicephalus*. Il a été démontré ici que des tiques gorgées sur un animal présentant une parasitémie, pouvaient héberger des formes infectantes du parasite au-delà de 2 heures après leur décrochement.

Il semble cependant qu'au-delà de 4 heures après la fin du gorgement, il n'y ait plus de trypanosomes vivants dans l'organisme de la tique. Il est bien évident que ces délais manquent de précision et d'exactitude mais il ne nous a pas été possible de travailler avec un nombre plus élevé de tiques. Quoi qu'il en soit, ces résultats nous amènent à conclure que si la transmission de *T. evansi* par ingestion de tiques contaminées est possible, elle ne peut intervenir que jusqu'à 2 à 3 heures après le décrochement de la tique. Il serait intéressant de renouveler cette expérience avec un nombre plus élevé de tiques et avec des pas de temps plus serrés entre 2 heures et 4 heures après le décrochage, de manière à augmenter la précision de la durée de la survie de *T. evansi* dans la tique.

### 3.4. Essai de transmission aux bovins

#### Matériel

Bovins : il s'agit d'un taurillon de type Holstein (97 %) âgé de 10 mois. Il est logé dans une étable pourvue de moustiquaires qui a été désinsectisée avant le début de l'expérience.

Tiques : il s'agit de tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus* gorgées sur des rats infectés et dont le protocole d'obtention a été expliqué plus haut. Les tiques sont collectées alors qu'elles sont encore fixées sur les rats. Elles sont donc décrochées manuellement afin de maîtriser le délai entre le décrochement et l'ingestion par le bovin.

#### Méthode

Les tiques ont été récoltées sur les rongeurs et mélangées à du granulé qui est placé dans l'auge du bovin dans les 10 minutes qui suivent l'arrachage des tiques. Il est bien vérifié qu'aucune tique n'est restée dans l'auge une fois que le bovin a consommé le granulé. La parasitémie du bovin est surveillée deux fois par semaine par observation du buffy coat après centrifugation du sang dans un tube à hématocrite et ce, pendant 4 semaines.

#### Résultats

Durant les 4 semaines de suivi, aucun trypanosome n'a pu être mis en évidence par observation directe de sang, ni même par observation du buffy coat. Afin de déceler une séroconversion témoignant d'une éventuelle parasitémie indétectable, des analyses sérologiques par la méthode ELISA ont été réalisées. Les résultats sont en attente.

#### Discussion

Dans cette expérience, le bovin a réellement consommé des tiques porteuses de trypanosomes vivants. Le taurillon a même consommé plus d'une centaine de tiques infectés ce qui est nettement supérieur par rapport à ce qu'il est possible de trouver dans la nature. Malgré cette très forte pression d'infection, le bovin n'a jamais présenté le moindre parasite dans le sang durant les 4 semaines de suivi. L'expérience réalisée ici n'a donc pas réussi à mettre en évidence un passage de *Trypanosoma evansi* de rongeur à bovin par ingestion de tiques contaminées. On peut donc émettre l'hypothèse que le parasite est incapable de traverser les muqueuses saines de bovins. Il serait intéressant de le vérifier en donnant au bovin directement du sang contaminé comme cela a été fait avec les rats et les souris ainsi que cela a été décrit plus haut.

### 4. Conclusion sur la transmission de *Trypanosoma evansi* par ingestion de tiques contaminées

Cette partie, très cohérente, n'a pas fourni l'ensemble des résultats escomptés. Il a été montré que les rats Wistar pouvaient s'infecter très rapidement (3 jours) en consommant du sang contaminé. De plus, la survie de trypanosomes infectieux dans l'organisme des tiques notamment du genre *Rhipicephalus* a été mise en évidence pendant des durées supérieures à 2 heures. Il était alors pleinement justifié d'émettre l'hypothèse que *T. evansi* pouvait se transmettre, au moins aux rats, par

ingestion de tiques contaminées. Malheureusement, les bovins ayant servi à produire des tiques gorgées contaminées ne présentaient pas de parasitoses élevées, comme il est parfois possible d'en rencontrer dans la nature. La transmission aux rats n'a donc pas pu être mise en évidence. Il était aussi initialement prévu de produire des tiques gorgées contaminées sur des rats infectés puis de les faire consommer par d'autres rats sains afin de tester une éventuelle transmission du parasite entre rongeurs par ingestion d'ectoparasites. Cette expérience n'a pas pu être réalisée pendant le stage, car trop peu de tiques gorgées ont pu être récoltées sur les rats infectés. Ces tiques ont été entièrement destinées à la consommation par le bovin. Afin de récupérer suffisamment de tiques gorgées sur des rats, la production comme décrite précédemment va être renouvelée mais la confection des vêtements des rats sera changée. Ils seront plus larges de manière à ce que la collecte des tiques gorgées puisse se faire plus aisément et sur plusieurs jours. Ainsi, les essais de transmission de rongeur à rongeur vont pouvoir être menés. Les essais de transmission de rongeurs à bovins réalisés ici, n'ont pas permis de mettre en évidence un passage du parasite. Pourtant les tiques données à manger au bovin étaient réellement porteuses de *T. evansi* vivants. Il serait intéressant de renouveler cette expérience afin de confirmer les conclusions énoncées ici. En définitive, bien qu'aucune transmission par ingestion de tiques contaminées n'ai été mise en évidence, ce modèle semble tout à fait plausible du fait de la survie pendant quelques heures du parasite au sein des tiques notamment chez les *Rhipicephalus*, et de sa capacité à traverser les muqueuses digestives notamment chez les rats Wistar. Tout en évitant les écueils déjà rencontrés, il serait très intéressant de renouveler les essais de transmission de bovins à rongeurs et surtout de mettre en place ceux de rongeurs à rongeurs.

## Conclusion générale

L'objectif de cette étude était d'éclaircir les liens épidémiologiques qui existent entre les petits rongeurs et les grands herbivores concernant la trypanosomose à *Trypanosoma evansi*. Dans l'hypothèse de passages naturels du parasite entre ces deux types d'animaux, et considérant que les petits rongeurs ne sont quasiment jamais en contact avec les vecteurs classiquement impliqués dans la transmission du parasite chez les grands herbivores (tabanides et stomoxes), nous avons essayé de vérifier deux modèles de transmission pouvant expliquer ce passage : la transmission par morsure par l'intermédiaire de sangsues vectrices et la transmission pérorale (passage transmuqueux) par consommation de tiques gorgées sur animaux infectés.

L'ensemble des expériences menées pour apprécier le rôle de la sangsue *Hirudinaria manilliensis* dans l'épidémiologie de *T. evansi* mène à la conclusion que cette espèce de sangsue est probablement un cul de sac épidémiologique. En effet, bien que de l'ADN du parasite ait été retrouvé à l'état naturel dans l'organisme de certains spécimens, *T. evansi* s'est avéré incapable de quitter le contenu digestif de la sangsue après le repas sanguin, et il y mourrait même assez rapidement. Aucun des essais de transmission, qu'ils aient été réalisés immédiatement après le repas infectant de la sangsue, ou selon différents délais allant jusqu'à 30 jours, n'a permis de mettre en évidence un passage du parasite. Les stades avancés de la sangsue *Hirudinaria manilliensis* semblent donc ne pas être capables de transmettre *T. evansi*. Il conviendra toutefois de vérifier que des stades plus jeunes n'en sont pas capables, dans l'hypothèse où, à l'instar des glossines, les sangsues plus jeunes seraient plus réceptives que les stades avancés utilisés dans cette étude. L'existence de trypanosomes vivants, morphologiquement compatibles avec *T. evansi*, trouvés dans le tube digestif d'une sangsue de terrain quelques jours après sa récolte, appelle toutefois à la prudence dans ces conclusions (l'identification d'espèce n'ayant pu être apportée par PCR). Une autre espèce de sangsue commune en Asie (la sangsue « aiguille ») pourra également faire l'objet d'investigations complémentaires.

L'étude de la transmission du parasite par ingestion de tiques contaminées nous a conduits à mener des expériences préliminaires démontrant que les rats peuvent s'infecter en consommant du sang contaminé. De plus, la durée de survie des trypanosomes dans l'organisme de la tique a pu être déterminée comme comprise entre 2 et 4 heures. Malheureusement, aucun des essais de transmission, que ce soit de rongeur à bovin ou de bovin à rongeur, n'a permis de mettre en évidence le passage du parasite. Cependant, à cause de certaines limites (parasitémie trop faible et/ou tiques gorgées trop peu abondantes) dans les conditions des expériences, il ne nous est pas possible de conclure que cette transmission n'est pas possible. Des essais de transmission de rongeurs à rongeurs par ingestion de tiques doivent être réitérés.

L'ensemble de l'étude présentée ici sert essentiellement à investiguer les relations qui existe entre les grands herbivores et les petits rongeurs. Cependant, les modalités de transmission à l'intérieur même de la population des petits rongeurs sont encore inconnues. Les expériences de transmission par consommation de tiques contaminées ont néanmoins jeté les bases d'une possible contamination entre rongeurs par consommation d'ectoparasites comme les tiques voire les puces. Il serait aussi possible d'envisager une transmission directe du parasite par l'intermédiaire de blessures, de morsures, de léchage... Enfin, la transmission par voie vénérienne pourrait aussi permettre d'expliquer un maintien du parasite chez les rongeurs. Toutes ces nouvelles voies de contamination, encore non évaluées, pourraient permettre d'expliquer l'existence et la persistance de *T. evansi* chez les rongeurs, même en l'absence des vecteurs classiquement impliqués dans la transmission du parasite comme les Tabanidés. Des travaux menés dans le cadre d'un autre stage, confirmant par PCR la présence de *T. evansi* chez plusieurs rats sauvages capturés sur le site de l'université, suggèrent la pérennité et l'efficacité de ce réservoir. Il conviendra donc de poursuivre ces investigations, en particulier chez le rat qui semble plus réceptif que la souris.

## Références

- Abdel-Gadir, E., 2008. *In vivo* study of drug resistant *Trypanosoma evansi* isolated from naturally infected camels in Soudan. *Journal of Camel Practice and Research* 15: 89-93.
- Antoine-Moussiaux, N., Cornet, A., Cornet, F., Glineur, S., Dermine, M. and Desmecht, D., 2009. A non-cytosolic protein of *Trypanosoma evansi* induces CD45-dependent lymphocyte death. *PLoS ONE* 4: e5728.
- Balis, J., 1963. Recherche sur les facteurs nécessaires à la culture in vitro de *Trypanosoma evansi*. *Rev. El. Méd. vét. Pays Trop.* 16: 151.
- Balis, J. and Richard, D., 1977a. [Trypanocidal effect of isometamidium chloride hydrochlorate on *Trypanosoma evansi* and treatment attempt of trypanosomiasis in dromedary]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 30: 369-72.
- Balis, J. and Richard, D., 1977b. Note sur la toxicité de l'Isométamidium par injection intraveineuse chez quelques mammifères domestiques et spécialement chez le dromadaire. *Rev El Med Vét Pays Trop* 30: 373-375.
- Borst, P., Fase-Fowler, F. and Gibson, W.C., 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol Biochem Parasitol* 23: 31-8.
- Bouchard, N. and Dick, P., 1962. Quelques cas de trypanosomiase du cheval en Afrique de l'ouest. Essais de traitement. *Revue Serv. biol. vét. Armées*: 39-44.
- Burreson, E.M., Hayes, P.M., Smit, N.J., Seddon, A.M., Wertheim, D.F., Davies, A.J., Karlsbakk, E., Haugen, E., Nylund, A., Hemmingsen, W., Jansen, P.A. and Mackenzie, K., 2007. Hemoflagellates of Oregon marine fishes with the description of new species of *Trypanosoma* and *Trypanoplasma*
- A new fish haemogregarine from South Africa and its suspected dual transmission with trypanosomes by a marine leech
- Morphology and aspects of growth of a trypanosome transmitted by the marine leech *Johanssonia arctica* (Piscicolidae) from Northern Norway
- Crabs, leeches and trypanosomes: an unholy trinity?
- A trypanosome of Atlantic cod, *Gadus morhua* L., transmitted by the marine leech *Calliobdella nodulifera* (Malm, 1863) (Piscicolidae). *J Parasitol* 93: 1442-51.
- Cuisance, D., Itard, J., Desquesnes, M., Frézil, J.L. and De La Rocque, S., 2003. Trypanosomoses: épidémiologie. In : *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail ; Europe et régions chaudes; Lefèvre, P-C, Blancou, J. Chermette, R.; Ed Tec & Doc et EMI; Lavoisier* 2: 1627-1650.
- Curasson, G., 1943. *Trypanosoma vivax* et variétés. in: *Traité de protozoologie vétérinaire et comparée Tome 1 Trypanosomes*, Ed Vigot Frères, Paris: 270-278.
- da Silva, A., Ceolin, L., Oliveira, C., Monteiro, S. and Doyle, R., 2007. Oral infection by *Trypanosoma evansi* in rats and mice. *Ciencias Rural* 37: 897-900.
- Derheims, J.L., 1825. Histoire naturelle des sanguines.
- Desquesnes, M., 2004. *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. CIRAD-EMVT publication, OIE, Paris, ISBN 92-9044-634-X.
- Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungrana, A. and Dávila, A.M.R., 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.* 31: 610-614.
- Desquesnes, M., Dia, M., Acapovi, G. and Yoni, W., 2005. Les vecteurs mécaniques des trypanosomoses animales ; généralités, morphologie, biologie, impacts et contrôle. Identification des espèces les plus abondantes en Afrique de l'Ouest. Edition CIRAD & CIRAD: 68 pages.
- Desquesnes, M.C., G, 2007. The first outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in camels is reported in Aveyron, Metropolitan France, October 2006. *Réunion annuelle du*

- groupe ad hoc de l'OIE sur les Trypanosomoses Animales Non Transmises par les Glossihnes OIE*, Paris, Mai 2007.
- Dia, M. and Desquesnes, M., 2007. Infections expérimentales de bovins par *Trypanosoma evansi*: pathogénicité et efficacité du traitement au Cymelarsan®. *Rev Af Santé Prod Anim.* 5: 37-41.
- Dia, M.L., Aminetou, M., Diop, C., Thiam, A., Jacquiet, P. and El Mabrouk, A., 1997b. Auto-guérison chez un chamelon (*Camelus dromedarius*) expérimentalement infecté par *Trypanosoma evansi*. *Revue Méd. Vét.* 148: 713-716.
- Dirie, M.F., Wallbanks, K.R., Aden, A.A., Bornstein, S. and Ibrahim, M.D., 1989. Camel trypanosomiasis and its vectors in Somalia. *Vet Parasitol* 32: 285-91.
- Dudgeon, D., 1999. The zoobenthos : a systematic review. In : *Tropical Asian streams : Zoobenthos, ecology and conservation*: 118-127.
- Dunn, L., 1932. Experiments in the transmission of *Trypanosoma hippicum* Darling with the vampire bat *Desmodus rotundus murinus* Wagner, as a vector in Panama. *J. Prevent. Med.* 6: 415.
- El Kady, G.A., 1998. Protozoal parasites in tick species infesting camels in Sinai Peninsula. *J Egypt Soc Parasitol* 28: 765-76.
- El Rayah, I.E., Kaminsky, R., Schmid, C. and El Malik, K.H., 1999. Drug resistance in Sudanese *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 80: 281-7.
- Fermonde, M.C., 1854. Monographie des sangsue.
- Foil, L.D., Adams, W.V., McManus, J.M. and Issel, C.J., 1987. Bloodmeal Residues on Mouthpart of *Tabanus fuscicostatus* and the potential for mechanical transmission of pathogens. *J Med Entomol* 24: 613-616.
- Fox, R., 2003. Invertebrate anatomy : *Haemopis marmorata* and *Hirudo medicinalis* leeches. <http://webs.lander.edu/rsfox/invertebrates/haemopis.html>.
- GIBSON, W.C., DUKES, P. and GASHUMBA, J.K., 1988. Species-specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitology* 97: 63-73.
- Gutierrez, C., Corbera, J.A., Morales, M. and Buscher, P., 2006a. Trypanosomosis in goats: current status. *Ann N Y Acad Sci* 1081: 300-10.
- Gutierrez, C., Corbera, J.A., Juste, M.C., Doreste, F. and Morales, I., 2005. An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the Canary Islands. *Vet Parasitol* 130: 163-8.
- Gutierrez, C., Corbera, J.A., Juste, M.C., Doreste, F. and Morales, I., 2006b. Clinical, Hematological, and Biochemical Findings in an Outbreak of Abortion and Neonatal Mortality Associated with *Trypanosoma evansi* Infection in Dromedary Camels. *Ann N Y Acad Sci* 1081: 325-7.
- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gidley, J., Holz, P. and Gibson, W.C., 2005. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology* 35: 431-443.
- Hayes, P.M., Smit, N.J., Seddon, A.M., Wertheim, D.F. and Davies, A.J., 2006. A new fish haemogregarine from South Africa and its suspected dual transmission with trypanosomes by a marine leech. *Folia Parasitol (Praha)* 53: 241-8.
- Herrera, H.M., Abreu, U.G., Keuroghlian, A., Freitas, T.P. and Jansen, A.M., 2008. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. *Parasitol Res* 103: 619-24.
- Herrera, H.M., Davila, A.M., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., D'Andrea, P.S. and Jansen, A.M., 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 125: 263-75.
- Hoare, C.A., 1965. Vampires bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes. *Acta Trop* 22: 204-209.
- Hoare, C.A., 1972. The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. *Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.*: 749p.

- Holland, W.G., My, L.N., Dung, T.V., Thanh, N.G., Tam, P.T., Vercruyse, J. and Goddeeris, B.M., 2001. The influence of *T. evansi* infection on the immuno-responsiveness of experimentally infected water buffaloes. *Vet Parasitol* 102: 225-34.
- Holland, W.G., Do, T.T., Huong, N.T., Dung, N.T., Thanh, N.G., Vercruyse, J. and Goddeeris, B.M., 2003. The effect of *Trypanosoma evansi* infection on pig performance and vaccination against classical swine fever. *Vet Parasitol* 111: 115-23.
- Hussein, K.S. and Gasmir, G.S., 1993. Presence of ketones in the serum of *Trypanosoma evansi* infected camels (*Camelus dromedarius*) in the Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 46: 578-9.
- Hyson, J.M., 2005. Leech therapy: a history. *J Hist Dent* 53: 25-7.
- Itard, J., 1981. Les trypanosomoses animales africaines. In: TRONCY, P.M. ITARD, J. et MOREL, P.C.: *Précis parasitologie vétérinaire tropicale*. Ministère de la coopération et du développement, institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des pays tropicaux: 717p.
- Itard, J. and Frézil, J.L., 2003. Trypanosomoses : symptômes et lésions. In : *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail ; Europe et régions chaudes*; Lefèvre, P-C, Blancou, J. Chermette, R.; Ed Tec & Doc et EMI; Lavoisier 2: 1695-1724.
- Jakes, K.A., O'Donoghue, P.J. and Adlard, R.D., 2001. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. *Parasitology* 123: 483-7.
- Jittapalapong, S., Inpankaew, T., Saraphan, N., Herbreteau, V., Hugot, J.P., Morand, S. and Stich, R.W., 2008. Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents of Thailand. *Infect Genet Evol* 8: 445-9.
- Johnson, C.M., 1936. Further studies on the transmission of *Trypanosoma hippicum* Darling by the vampaire bat *Desmodus rotundus murinus* Wagner. *Amer. J. Trop. Med.* 16: 163.
- Johnson, J.R., 1825. Further observations on the medicinal leech.
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A., Jannin, J. and Truc, P., 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am J Trop Med Hyg* 73: 491-5.
- Karlsbakk, E., Haugen, E. and Nylund, A., 2005. Morphology and aspects of growth of a trypanosome transmitted by the marine leech *Johanssonia arctica* (Piscicolidae) from Northern Norway. *Folia Parasitol (Praha)* 52: 209-15.
- Kraneveld, F. and Mansjoer, M., 1954. Intra-uterine infection in Surra. *Hemera Zoa* 61: 97-108.
- Lai, D.H., Hashimi, H., Lun, Z.R., Ayala, F.J. and Lukes, J., 2008. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1999-2004.
- Luckins, A.G., 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol Today* 4: 137-42.
- Lun, Z.-R., Min, Z.-P., Huang, D., Liang, J.-X., Yang, X.-F. and Huang, Y.-T., 1991. Cymelarsan in the treatment of buffaloes naturally infected with *Trypanosoma evansi* in South China. *Act Trop.* 49: 233-236.
- Mamadou, A., 2006. Evaluation sur le terrain et sur souris de la résistance des trypanosomes des bovins du plateau de l'Adamaoua au Cameroun à l'acéturate de diminazène et au chlorure d'isométhamidium. *Revue Elev Méd vét Pays trop*: 11-16.
- Mandal, M., Laha, R. and Sasmal, N.K., 2008. First report of Establishment of *Trypanosoma evansi* Infection in Pigeon Nestlings (*Columba Livia*). *J Parasitol*: 1.
- Mdachi, E., Kagira, M., Murilla, A. and VanGool, F., 2008. Efficacité et tolérance locale du Cymelarsan ND chez des chevaux infectés par *Trypanosoma evansi*. <http://www.au-ibar.org/isctr/28Meeting/en/presentations/004g.html>.
- Morenas, L. and Roman, E., 1937. Transmission héréditaire de *Trypanosoma brucei* chez le rat. *Bull. Soc. Pathol. exot.* 30: 376-379.
- Muhammad, G., Saqib, M., Sajid, M. and Naureen, A., 2007. *Trypanosoma evansi* infections in Himalayan black bears (*Selenarctos thibetanus*). *J. Zoo & Wildlife Med.* 38: 97-100.

- Munshi, Y., Ara, I., Rafique, H. and Ahmad, Z., 2008. Leeching in the history--a review. *Pak J Biol Sci* 11: 1650-3.
- Musa, M.M., Abdoon, A.M., Nasir, B.T., Salim, Y.I., Abdel-Rahman, A.Y. and Shommein, A.M., 1994. Efficacy of Cymelarsan in the treatment of natural chronic *Trypanosoma evansi* infection in camels in the Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 47: 397-400.
- Olsson, T., Bakhet, M., Edlund, C., Hojeberg, B., Van der Meide, P.H. and Kristensson, K., 1991. Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8+ T cells: a trypanosome-released factor triggers interferon-gamma production that stimulates parasite growth. *Eur J Immunol* 21: 2447-54.
- Onah, D.N., Hopkins, J. and Lunckins, A.G., 1996. Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitol Res* 82: 659-663.
- Onah, D.N., Hopkins, J. and Luckins, A.G., 1998. Increase in CD5+ B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet Immunol Immunopathol* 63: 209-22.
- Onah, D.N., Hopkins, J. and Luckins, A.G., 2000. Effects of the depletion of CD8(+) T cells and monocytes on the proliferative responses of peripheral blood leucocytes from *Trypanosoma evansi*-infected sheep. *Vet Parasitol* 92: 25-35.
- Onderkirk, J.P., Bekhor, D., Turett, G.S. and Murali, R., 2004. Aeromonas meningitis complicating medicinal leech therapy. *Clin Infect Dis* 38: e36-7.
- Oyieke, F.A., 1987. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* (Steel) by hematophagous flies. In : 8th Annual Medial Scientific Conference, Nairobi, Kenya 1987: 131-134.
- Pholpark, S., Pholpark, M., Sarataphan, S., Khunpasi, S. and Taboran, P., 1984. Trypanosoma evansi infection in buffalo in Northeast Thailand. 2. Experimental study. *11th Ann. Conf. Thai Vet. Med. Assoc., Thailand*: 44-45.
- Rademaker, V., Herrera, H.M., Raffel, T.R., D'Andrea, P.S., Freitas, T.P., Abreu, U.G., Hudson, P.J. and Jansen, A.M., 2009. What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop.*
- Raina, A.K., Rakesh-Kumar, Rajora, V.S., Sridhar and Singh, R.P., 1985. Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. *Vet Parasitol* 18: 67-69.
- Reid, S., Husein, A., Hutchinson, G. and Copeman, D., 1999. A possible role for rusa deer (*Cervus timorensis russa*) and wild pigs in spread of *Trypanosoma evansi* from Indonesia to Papua New Guinea. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 195-7.
- Reid, S.A., 2002. *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia. *Trends Parasitol* 18: 219-24.
- Reveron, I., Aso, P.M., Herrera, E.A., Giardina, S., Sanso, B. and Badaracco, M.T., 1992. Isolation and serological study of *Trypanosoma evansi* from capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). In: Premier séminaire international sur les Trypanosomoses animales non transmises par les glossines; Annecy, France 14-16 octobre 1992 Fondation Mérieux: 44.
- Rodhain, F. and Perez, C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Eds Maloine, Paris: 458p.
- Rottcher, D., Schillinger, D. and Sweygarth.E., 1987. Trypanosomiasis in the camel. *Rev Sci Techn Off Int Zpiz* 6: 463-470.
- Saleh, M.A., Al-Salahy, M.B. and Sanousi, S.A., 2009. Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 162: 192-9.
- Sawyer, T., Lepont, F., Stuart, K. and Kramer, P., 1981. Growth and reproduction of the giant glossiphoniid leech *Haementeria ghilianii*. *Biol. Bull.* 160: 322-331.
- Schillinger, D. and Röttcher, D., 1986. Traitement de l'infection cameline due à *Trypanosoma evansi* (surra). *Revue mondiale de Zootechnie*: 26-32.
- Shahsavandi, S., Salehizadeh, M., Esmail-nia, K. and Ebrahimi, M.M., 2001. Evaluation of humoral response to foot-and-mouth disease vaccination in experimentally infected guinea pigs with *Trypanosoma evansi*. *Arch. Razi Ins.* 52: 9-18.

- Sharma, D.K., Chauhan, P.P. and Agrawal, R.D., 2000. Interaction between *Trypanosoma evansi* and *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet Parasitol* 92: 261-7.
- Singh, D.P., 1998. Epidemiological study on *Trypanosoma evansi* infection among free living wild animals in India. *J. Protozool. Res.* 8: 139-143.
- Sirivan, C., Pramoolsinsap, T. and Pernayodhin, P., 1995. Effect of diminazene aceturate and isometamidium chloride on the control of *Trypanosoma evansi* in naturally infected sow. *Thai J. Health Research*: 44.
- Tager-Kagan, P., Itard, J. and Clair, M., 1989. Essai de l'efficacité du Cymelarsan ND sur *Trypanosoma evansi* chez le dromadaire. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 42: 55-61.
- Toure, S., 1973. Notes on the trypanocidal activity of Isometamidium administrated intravenously. *Bull epizoot Dis Afr* 21: 1-3.
- Tubangui, M.A., 1932. Observations on the possible transmission of surra by the land leech *Haemadipsa zeylanica*. *Philipp. J. Sci.* 48: 115-126.
- Tuntasuvan, D. and Luckins , A., 1998. Status of Surra in livestock in Thailand. *J. Protozool. Res.* 8: 162-170.
- Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, P., Pays, A., Joshi, P.P., Katti, R., Jannin, J.G. and Pays, E., 2006. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. *N Engl J Med* 355: 2752-6.
- Ventura, R.M., Takeda, G.F., Silva, R.A., Nunes, V.L., Buck, G.A. and Teixeira, M.M., 2002. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *Int J Parasitol* 32: 53-63.
- Vitet, L., 1809. Traité de la sanguine médicinale.
- Vittoz, R., 1955. Prophylaxie du surra en Asie. *Bull Off int Epiz* 44: 83-106.
- Whitlock, M.R., O'Hare, P.M., Sanders, R. and Morrow, N.C., 1983. The medicinal leech and its use in plastic surgery: a possible cause for infection. *Br J Plast Surg* 36: 240-4.
- Woo, P.T.K., 1969. The haematocrit centrifuge technique for the detection of Trypanosomes in blood. *Can J Zool* 47: 921-923.
- Yantis, M.A., O'Toole, K.N. and Ring, P., 2009. Leech therapy. *Am J Nurs* 109: 36-42; quiz 43.
- Zhang, Z., Giroud, C. and Baltz, T., 1992. *In vivo* and *in vitro* sensitivity to *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* to diminazene, suramin, MelCy, quinapyramine and isometamidium. *Acta Trop* 50: 101-110.
- Zhou, J., Shen, J., Liao, D., Zhou, Y. and Lin, J., 2004. Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China. *Acta Trop* 90: 271-5.

## Annexes

### Annexe 1 : Protocole Geneaid d'extraction d'ADN à partir de sang congelé.

#### **Etape 1 (lyse cellulaire) :**

- Placer 200 µl de sang décongelé dans des tubes à microcentrifugation de 1,5 ml. Si l'échantillon ne fait pas 200 µl, compléter avec un volume approprié de PBS.
- Ajouter 30 µl de protéinase K (10 mg/ml) et remuer brièvement. Laisser incuber le mélange à 60°C pendant 15 minutes.
- Ajouter 200 µl de GB Buffer et mixer par vortex.
- Incuber le mélange à 70 °C dans un bain-marie pendant 15 minutes. Pendant l'incubation, remuer les tubes toutes les trois minutes.
- Préchauffer le volume désiré d'*elution buffer* (200 µl/échantillon) à 70°C dans un bain-marie (cette solution sera utilisée lors de la quatrième étape, élution de l'ADN).

#### **Etape 2 (liaison de l'ADN) :**

- Ajouter 200 µl d'éthanol pur au produit de l'étape 1 et mélanger au vortex immédiatement pendant 10 secondes. Si un précipité apparaît, le casser en pipetant.
- Placer une GD colonne dans un tube collecteur de 2 ml.
- Y transférer le mélange (incluant un quelconque précipité).
- Centrifuger à la vitesse maximale pendant 5 minutes.
- Jeter le tube et son contenu et placer la GD colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml.

#### **Etape 3 (lavage) :**

- Ajouter 400 µl de W1 buffer dans la GD colonne et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes.
- Jeter le contenu du tube et placer de nouveau la GD colonne dans le tube collecteur de 2 ml.
- Ajouter 600 µl de Wash buffer dans la GD colonne et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes.
- Jeter le contenu du tube et placer de nouveau la GD colonne dans le tube collecteur de 2 ml. Centrifuger à la vitesse maximale pendant 3 minutes pour sécher le filtre de la colonne.

#### **Etape 4 (élution de l'ADN) :**

- Transférer la GD colonne sèche dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml propre.
- Ajouter 100 µl de *Elution buffer* préchauffé à 70°C au centre du filtre de la colonne.
- Laisser reposer 3 à 5 minutes jusqu'à ce que l'Elution buffer soit absorbé par le filtre.
- Centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes pour récupérer l'ADN purifié.

## ***Annexe 2 : Protocole Geneaid d'extraction d'ADN à partir de tissu.***

### **Etape 1 (dissociation tissulaire) :**

- Couper 30 mg de tissu et transférer le prélèvement dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml.
- Utiliser le broyeur pour dissocier les tissus.
- Ajouter 200 µl de GT buffer et continuer à homogénéiser l'échantillon de tissu avec le broyeur.

### **Etape 2 (lyse cellulaire) :**

- Ajouter 20 µl de protéinase K et mixer par vortex.
- Mettre l'échantillon à incuber à 60°C pendant 30 minutes. Pendant l'incubation, remuer les tubes toutes les 5 minutes.
- Ajouter 200 µl de GBT buffer et mixer par vortex pendant 5 secondes.
- Mettre l'échantillon à incuber à 70°C pendant 20 minutes. Pendant l'incubation, remuer les tubes toutes les 5 minutes.
- Préchauffer le volume désiré d'elution buffer (200 µl/échantillon) à 70°C dans un bain-marie (cette solution sera utilisée lors de la quatrième étape, élution de l'ADN).
- S'il reste du matériel insoluble suite à la précédente incubation, centrifuger l'échantillon pendant 2 minutes à la vitesse maximale et transférer le surnageant dans un nouveau tube à microcentrifugation de 1,5 ml.

### **Etape 3 (liaison de l'ADN) :**

- Ajouter 200 µl d'éthanol pur au produit de l'étape 1 et mélanger au vortex immédiatement pendant 10 secondes. Si un précipité apparaît, le casser en pipetant.
- Placer une GD colonne dans un tube collecteur de 2 ml.
- Y transférer le mélange (incluant un quelconque précipité).
- Centrifuger à la vitesse maximale pendant 2 minutes.
- Jeter le tube et son contenu et placer la GD colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml.

### **Etape 4 (lavage) :**

- Ajouter 400 µl de W1 buffer dans la GD colonne et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes.
- Jeter le contenu du tube et placer de nouveau la GD colonne dans le tube collecteur de 2 ml.
- Ajouter 600 µl de Wash buffer dans la GD colonne et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes.
- Jeter le contenu du tube et placer de nouveau la GD colonne dans le tube collecteur de 2 ml. Centrifuger à la vitesse maximale pendant 3 minutes pour sécher le filtre de la colonne.

### **Etape 5 (élution de l'ADN) :**

- Transférer la GD colonne sèche dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml propre.
- Ajouter 100 µl de Elution buffer préchauffé à 70°C au centre du filtre de la colonne.
- Laisser reposer 3 à 5 minutes jusqu'à ce que l'Elution buffer soit absorbé par le filtre.
- Centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes pour récupérer l'ADN purifié.

### ***Annexe 3 : Protocole d'amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 11 µl contenant 1 µl d'ADN extrait des échantillons à tester et 10 µl de solution réactive. Cette solution était constituée du tampon (buffer 10x), du MgCl<sub>2</sub>, de la taq-polymérase (Taq DNA Polymerase, Recombinant, Invitrogen), des nucléotides (dNTP Set, Fermentas), du couple d'amorces (Biodesign), d'eau distillée et de DMSO (uniquement lors de l'amplification avec les amorces TRYP1).

Les amplifications en elles-mêmes ont été réalisées dans deux thermocycleur (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation ; Biorad, Mycycler) dont les caractéristiques d'amplification (nombre de cycles, température et durée de dénaturation de l'ADN, température et durée d'hybridation de l'ADN...) étaient programmées pour chaque amorce utilisée, selon les recommandations des auteurs. Les 11 ml de produit d'amplification mélangés à 2 µl de solution aqueuse (glycérol 40 % et bleu de bromophénol 0,25 %) ont ensuite subi une migration dans un gel d'agarose à 2 % (Agarose D1 Low EEO, Pronadisa, Condia) dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE 1x (Tris base 0,89 mol/L, acide borique 1,54 mol/L, EDTA sel dissodique 0,025 mol/L). Le courant électrique, de tension 120 V et d'intensité 500 mA, a été maintenu pendant une heure. Suite à cette migration, le gel est plongé pendant 5 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (0,3 mg/L) afin de marquer l'ADN, puis est rincé dans de l'eau distillée pendant 15 minutes. La lecture du gel se fait sous éclairage UV ( $\lambda = 302$  nm, DyNA Light, Labnet).

## ***Annexe 4 : Protocole d'un repas sanguin de sangsue sur rat et sur souris***

### **Repas sur rat :**

Les poils du rat sont coupés le plus court possible au ciseau au niveau de la cuisse. Sa contention est réalisée manuellement : le rat est fermement attrapé par la peau du cou et est plaqué sur le ventre. Une sangsue est mise dans un tube Falcon de 15 ml rempli d'eau. Le tube Falcon est retourné hermétiquement sur le rat au niveau de la zone tondue. Selon des délais variant de 1 à 12 min, la sangsue fixe sa ventouse antérieure sur la peau du rat et rejette sa ventouse postérieure assez haut dans le tube. La région céphalique de la sangsue forme alors un coude caractéristique à l'observation duquel, on peut considérer le repas sanguin commencé. Au bout de la durée nécessaire à l'expérience, la sangsue est retirée manuellement en tirant sur le corps ou en insérant une fine spatule entre la peau du rat et la ventouse. La plaie est alors lavée à grande eau.

### **Repas sur souris :**

La contention de la souris est aussi réalisée manuellement : l'animal est maintenu sur le dos par la peau du cou et par la base de la queue. Le tube Falcon est retourné hermétiquement sur l'abdomen de la souris. La sangsue se fixe alors selon les mêmes délais que pour les rats et elle est ensuite retirée par les mêmes techniques que celles décrites précédemment.