

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ECOLOGIE

LABORATORY OF PARASITOLOGY AND ECOLOGY



**Essai d'accroissement de la résistance des glossines comme
méthode de lutte antivectorielle contre les trypanosomoses
africaines (THA et Nagana)**



THESE



Présentée en vue de l'obtention du Doctorat/Ph. D en Biologie des Organismes Animaux

Option : Parasitologie et Ecologie

Par :

NGAMBIA FREITAS FRANCOIS SOUGAL


Matricule : **09Q0757**

Master es-Sciences en Biologie des Organismes Animaux

Thèse soutenue publiquement le 28 Novembre 2022 devant le jury composé de :

BILONG BILONG Charles Felix, Professeur à l'Université de Yaoundé I..... Président
NJIOKOU Flobert, Professeur à l'Université de Yaoundé I..... Rapporteur
GEIGER Anne, Chargée de Recherche/HDR à l'IRD de Montpellier..... Rapporteur
FOMENA Abraham, Professeur à l'Université de Yaoundé I..... Membre
NTSAMA MBALA Claudine M. Epse ESSOMBA, Professeur à l'Université de Yaoundé I... Membre
NJAN NLOGA Alexandre Michel, Professeur à l'Université de Ngaoundéré..... Membre

Année : 2022

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF	

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 31 OCTOBRE 2022

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,
Maître de Conférences

Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS :
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	BOUDJEKO Thaddée	Professeur	En poste
3.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4.	FOKOU Elie	Professeur	En poste
5.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
6.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
7.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste

10	ATOUGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
15	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
16	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Doyen FS / UDs
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
26	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
27	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
28	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste

30	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
37	WILFRED ANGIE Abia	Chargé de Cours	En poste
38	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Chargée de Cours	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (51)			
1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
14	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ MINESUP</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
23.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
24.	NGUEGUIM TSOFACK Florence	Maître de Conférences	En poste
25.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
26.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
27	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
28	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
29	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
30	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Chargée de Cours	En poste
31	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
32	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
33	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
34	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
35	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
36	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste

37	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
38	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
39	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
41	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
42	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
43	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
44	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
46	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
49	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
50	MAPON NSANGOU Indou	Assistant	En poste
51	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)			
1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef DAARS /UYII</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste

10	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
11	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
12	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
13	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
14	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste
17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
26	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
27	KABELONG BANAHOU Louis- Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
28	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste

32	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
33	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (31)			
1.	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
3.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
4.	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
5.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
6.	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
7.	NENWA Justin	Professeur	En poste
8.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS Univ.Ngaoundere</i>
9.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
10.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
11.	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
15.	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
17.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste

18.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>CT/ MINPROFF</i>
19.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
20.	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
21.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
22.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
24.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
25.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
26.	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
27.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
28.	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
30.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
31.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (38)			
1.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
2.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
3.	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
8.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
15	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>

25	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
35	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
36	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
37	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste
5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur/MINFOPRA</i>
6.	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste

8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
15	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur adjoint ENSET. Ebolowa</i>
16	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
19	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
20	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
21	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
22	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)			
1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste

8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17.	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Uté Bertoua</i>
18.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
21.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
22.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
23.	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
24.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
25.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
26.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
27.	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28.	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste

30.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste
-----	-------------------------------	-----------	----------

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (22)			
1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE/FS/UJI</i>
3.	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste
4.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
8.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
10.	BODA Maurice	Chargé de Cours	En position d'absence irrégulière
11.	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
14.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
15.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
16.	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
17.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
18.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
19.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
20.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
21.	NKOUÉ TONG ABRAHAM	Assistant	En poste

22.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
-----	--------------------------------	------------	----------

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)			
1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
7.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
9.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
10.	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	BOYOMO Marthe	Maître de Conférences	<i>DA / ENSPY</i>
19.	ENYEGUE A NYAM épse	Maître de Conférences	En poste
20.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
21.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
22.	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
23.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste

24.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU DerbetiniAppolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UIYI</i>
30.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33.	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
34.	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35.	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36.	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	<i>Absente depuis Janvier 2022</i>
37.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
38.	DJOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	En poste
40.	TEYOU NGOUPOU Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Assistant	En poste
42.	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
43.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
44.	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)			
1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2.	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste

3.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4.	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
8.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
12.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
13.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Département /Uté Maroua</i>
14.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/ MINIMDT
15.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
17.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19.	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
20.	TCHAKOUNTE J. épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
21.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
22.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
23.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
24.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
25.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
26.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste

27.	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO LIONELLE ESTELLE	Chargé de Cours	En poste
31.	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
32.	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
33.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
34.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>CD/ Uté Maroua</i>
35.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
36.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
41.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (00)	14 (10)	15 (05)	02 (01)	39 (16)
BPA	14 (01)	12 (08)	21 (06)	04 (02)	51 (17)
BPV	06 (01)	10(01)	16 (09)	01 (00)	33 (11)
CI	09(01)	14(04)	08 (01)	00 (00)	31 (06)
CO	06 (01)	20 (04)	08 (03)	04 (01)	38(09)
IN	02 (00)	02 (00)	12 (01)	06 (00)	22 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	14 (01)	07 (01)	30 (02)
MIB	03 (01)	06 (02)	10 (03)	03 (02)	22 (08)
PHY	15 (01)	13 (02)	11 (03)	04 (00)	43 (06)
ST	07 (01)	16 (03)	18 (04)	01 (00)	42(08)
Total	71 (07)	115 (34)	133 (36)	32 (07)	351 (84)

Soit un total de 351 (84) dont :

- **Professeurs 71 (07)**
- **Maîtres de Conférences 115 (34)**
- **Chargés de Cours 133 (36)**
- **Assistants 32 (07)**

() = Nombre de Femmes 84

A cœur vaillant rien d'impossible.

(Jacques Cœur 1395-1456)

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes parents M. et Mme FREITAS

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Parasitologie et Ecologie de l'Université de Yaoundé I/ Cameroun, l'unité de Protozoologie Vétérinaire de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers/ Belgique et du laboratoire de l'Unité Mixte de Recherches Intertryp 177 de l'IRD-CIRAD de Montpellier/ France. Les recherches effectuées durant cette thèse ont bénéficié d'un financement du LabEx ParaFrap via son programme doctoral géré par l'IRD (2017-2020), de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA), ainsi que celui d'Infravec2 (Programme international de recherche interdisciplinaire fondé par la Commission Européenne pour l'Horizon 2020). J'exprime ma profonde reconnaissance envers ces organismes.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien et la participation multiforme de nombreuses personnes que je tiens humblement à remercier. Je pense particulièrement à/au :

- Pr **Flobert NJIOKOU**, pour m'avoir fait confiance et m'avoir accepté dans son équipe de recherche à l'issue de mon Master. En tant qu'enseignant, encadreur et aussi en tant que père, il a su m'encourager, m'orienter durant ce travail grâce à ses critiques constructives, ses grandes connaissances et sa rigueur scientifique. Tout cela a contribué à l'aboutissement du chercheur que je suis aujourd'hui. J'aimerais qu'il trouve en ces quelques mots l'expression de toute ma gratitude.
- Dr **Anne GEIGER**, ma directrice de thèse, j'aimerais lui dire merci de m'avoir donné l'occasion de réaliser ce travail. Elle a initié ce projet de thèse, n'a ménagé aucun effort et a multiplié des collaborations pour que je puisse effectuer ce travail dans de meilleures conditions. Je lui dis merci pour ses précieux conseils. Nos différentes interactions ont fortement impacté le scientifique que je suis aujourd'hui. Sa rigueur scientifique est pour moi un exemple à suivre.
- Aux Enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales, en particulier les professeurs **Charles Félix BILONG BILONG** (Chef de Département), **Abraham FOMENA**, **Rémy MIMPFOUNDI**, **Claudine NTSAMA ESSOMBA**, **Pierre NGASSAM**, **Moïse NOLA**, **Ruth MONY** et **Sévilor KEKEUNOU**, pour la qualité de leurs enseignements, qui ont fait de moi le parasitologue que je suis.
- Pr **Jan Van Den ABBEELE**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Anvers. Je suis reconnaissant pour toute l'attention portée à mon travail et pour ses précieux conseils.

- Dr **Linda De VOOGHT**, Post-doctorante durant cette période à l'IMT d'Anvers, qui a beaucoup contribué à ma formation sur les différentes techniques de modifications génétiques et de para-transgénèse. Je lui suis très reconnaissant.
- Dr **David BERTHIER**, Directeur adjoint de l'UMR 177, pour son accompagnement aussi bien administratif que scientifique, il a joué le rôle de référant durant la période d'expatriation de ma directrice de thèse. Merci pour sa grande disponibilité et pour l'encadrement reçu.
- Dr **Phillipe SOLANO**, Directeur de l'UMR 177, qui m'a ouvert les portes de cette unité et a facilité toutes les procédures administratives pour que je puisse mener à bien cette thèse. Merci pour ces riches échanges que nous avons eues à propos de ce travail. Je lui témoigne ma gratitude.
- Dr **Sophie RAVEL**, Chercheuse de l'UMR 177, qui a contribué à la réalisation de certaines expérimentations. Sa méticulosité et sa rigueur m'ont permis de m'améliorer aussi bien sur le plan technique qu'organisationnel. Je lui dis grandement merci.
- Pr **Patrick BASTIEN**, responsable du programme de doctorat du LabEx, pour son soutien, ses encouragements, les sessions de formations et mon accueil au sein de son laboratoire (UMR MIVEGEC- Département de Parasitologie et de Mycologie de Montpellier) pour que je puisse effectuer certaines expériences de laboratoire. Merci pour tous les efforts qu'il a effectués pour notre formation.
- Drs. **Maude LEVEQUE et Rosa MILLAGROS**, Chercheuses de l'UMR MIVEGEC, elles m'ont accompagné sur la paillasse durant mes expérimentations malgré les différentes responsabilités qu'elles avaient. Merci.
- M. **Guilhem SEMPERE**, pour son aide précieuse lors des analyses des données de séquençages bactériens. Merci.
- Pr **Bernard OLIVIER**, Chercheur IRD à l'Institut Méditerranéen d'Océanographie de Marseille durant mon stage, il m'a accueilli au sein de son unité (UMR110) et m'a initié à la culture et à l'études des bactéries en milieu anaérobie et micro-aérophile. Je lui suis reconnaissant.
- Tous les membres de l'UMR INTERTRYP, de l'IRD et du CIRAD, de l'UMR 110 de Marseille, de l'Unité de Protozoologie Vétérinaire d'Anvers, tous ceux que j'ai eu à côtoyer durant ces années de thèse, et dont les multiples échanges et discussions m'ont permis de peaufiner à chaque fois ce travail. Je leur dis merci !

- **MM Jean-Jacques BRAUN** et **Jean-Marc HOUGARD**, Représentants respectifs de l'IRD au Cameroun durant mes années de thèse, qui ont facilité toutes les procédures administratives lors de mes demandes de visas pour la France. Je leur suis reconnaissant.
- Aux aînés de laboratoire, Drs **Trésor Melachio**, **Guy Roger Njitchouang**, **Hugues Clotaire Nana Njeunga**, **Alvine Fokam**, **Judith Labou** et **Jean Marc Tsagmo Ngoune**, qui ont mainte fois examiné ce travail durant les présentations de laboratoire, et y ont apporté des corrections et suggestions. Je leur dis infiniment merci.
- A M. **Steve Feudio**, Mme **Carole Tchami** et Mme **Fadilatou Bakary** avec qui j'ai passé des moments de fous rires, de travail au laboratoire. Nos différentes discussions m'ont été bénéfiques. Je leur dis merci.
- A ma chère et tendre **Paola**, merci pour ton soutien. Ce travail est aussi le fruit de tes encouragements durant toutes ces années.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	xx
REMERCIEMENTS	xxi
SOMMAIRE	xxiv
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xxvii
LISTE DES FIGURES.....	xxviii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxx
RESUME	xxxii
ABSTRACT	xxxiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	6
I.1. Les Trypanosomoses.....	7
I.1.1. Historique.....	7
I.1.2. Taxonomie	8
I.1.3. Morphologie et structure.....	11
I.1.4. Cycle biologique des trypanosomes.....	15
I.2. Glossine.....	18
I.2.1. Description.....	18
I.2.2. Taxonomie	18
I.2.3. Distribution géographique	21
I.2.4. Biologie et cycle de développement	23
I.3. Contrôle de la transmission des trypanosomoses.....	25
I.3.1. Contrôle axé sur les parasites.....	25
I.3.2. Contrôle des populations de vecteurs.....	26
I.3.3. Stratégies alternatives	27

I.4. Interactions glossines-trypanosomes	29
I.4.1. Généralités	29
I.4.2. Facteurs extrinsèques influençant les interactions glossines-trypanosomes.....	30
I.4.3. Facteurs intrinsèques influençant les interactions glossines-trypanosomes	32
CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATERIEL ET METHODES.....	42
II.1. Cadre géographique.....	43
II. 2. Matériel et méthodes	44
II.2.1. Protocole d'échantillonnage	44
II.2.2 Identification, dissection et conservation des glossines	45
II.2.3. Recherche des trypanosomes par PCR	46
II.2.4. Identification des bactéries hébergées dans l'intestin des glossines.....	48
II.2.5. Evaluation de deux molécules potentiellement bloquantes de l'installation du trypanosome chez la mouche tsé-tsé.....	53
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	63
III.1. Résultats	64
III.1.1. Diversité biologique et densité apparente des glossines à Campo	64
III.1.2. Taxons de trypanosomes identifiés par PCR.....	64
III.1.3. Taxons bactériens identifiés dans l'intestin des glossines	65
III.1.4. Effets de deux molécules candidates sur l'installation du trypanosome dans l'intestin moyen des glossines.....	88
III.2. Discussion	96
III.2.1. Composition spécifique des glossines du foyer de trypanosomoses de Campo	96
III.2.2. Circulation des trypanosomes chez <i>Glossina palpalis palpalis</i> dans le foyer de Campo	97
III.2.3. Comparaison de la flore bactérienne entre glossines infectées et non infectées	98

III.2.4. Effet de la cécropine et de la <i>rTbgTCTP</i> sur l'établissement du trypanosome dans l'intestin moyen des glossines	102
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
PERSPECTIVES.....	108
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	109
ANNEXES	141

LISTE DES ABREVIATIONS

DAP : Densité Apparente par Piège et par jour

DDT : Dichlorodiphényltrichloroethane

dNTPs : Désoxyribonucléoside 5'-Triphosphates

EDTA: "Ethylene Diamine Tetraacetic Acid"

ITS : "Internal Transcribed Spacer"

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

M : Molaire (unité de mesure de la concentration d'une solution)

mM : millimolaire

ONG : Organisation Non Gouvernementale

pb : Paires de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PNLTHA : Programme National de Lutte contre la Trypanosomose Humaine Africaine

s. l. : « sensu lato »

SIT : « Sterile Insect Technique »

TAA : Trypanosomose Animale Africaine

Taq : *Thermus aquaticus*

TBE : Tris-Borate-EDTA

THA : Trypanosomose Humaine Africaine

Tris : Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane

VSG : "Variant Surface glycoprotein"

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des trypanosomes.....	10
Figure 2 : Ultrastructure de <i>Trypanosoma brucei</i> s. l. vu au microscope électronique.....	11
Figure 3 : Différentes formes de <i>Trypanosoma brucei</i> s.l. chez la glossine	13
Figure 4 : Différentes formes des trypanosomes du sous-genre <i>Trypanozoon</i>	14
Figure 5 : Cycle évolutif de <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	17
Figure 6 : Morphologie d'une glossine	18
Figure 7 : Classification des glossines	19
Figure 8 : Distribution des glossines sur le continent Africain	22
Figure 9 : Distribution géographique des glossines intégrant le couvert végétal.....	23
Figure 10 : Cycle de reproduction des glossines.....	25
Figure 11 : Principaux goulots d'étranglement affectant la transmission de <i>Trypanosoma brucei</i> par la mouche tsé-tsé.....	30
Figure 12 : Localisation des symbiotes dans l'intestin de la glossine.....	41
Figure 13 : Carte du foyer de trypanosomoses de Campo	44
Figure 14 : Schéma de construction des banques d'ADN à séquencer.....	51
Figure 15 : Courbes de raréfaction des taxons bactériens pour chaque glossine.	66
Figure 16 : Comparaison des diversités des microbiomes des glossines.	83
Figure 17 : Répartition des échantillons de mouches tsé-tsé en fonction de la composition de leurs microbiotes	85
Figure 18 : Comparaison des microbiomes des glossines infectées et des non infectées	86
Figure 19 : Relation entre les différentes glossines en fonction de leurs microbiomes	87
Figure 20 : Profil de migration des gènes codant pour les protéines étudiées	88
Figure 21 : Unités formant colonies après insertion du plasmide recombinant sur des TOP10.....	89
Figure 22 : Culture de <i>Sodalis glossinidius</i> compétent	90

Figure 23 : Bandes de vérification de l'expression des protéines d'intérêts	91
Figure 24 : Diagramme récapitulatif des micro-injections.....	92
Figure 25 : Box plot présentant le poids des pupes avant et après micro-injection de larves.	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Séquences des amorces pour l'amplification de l'ADN des taxons de trypanosomes	48
Tableau II : Séquences des amorces des gènes d'intérêt et de séquençage.....	54
Tableau III : Protocole de préparation de gels SDS-PAGE	59
Tableau IV : Diversité biologique des glossines capturées durant l'étude	64
Tableau V : Détail des paramètres entomologiques enregistrés dans les villages	64
Tableau VI : Nombre de mono-infection et d'infections mixtes.....	65
Tableau VII : composition des genres bactériens retenus	67
Tableau VIII : Variation de la composition bactérienne chez 10 glossines	71
Tableau IX : Distribution des bactéries en fonction du site de collecte	72
Tableau X : Fréquences des genres bactériens en fonction du statut infectieux	79
Tableau XI : Comparaison des fréquences de détection de 11 genres bactériens majoritaires du microbiome de l'ensemble des glossines en fonction du statut infectieux	82
Tableau XII : Taux d'installation des bactéries recombinantes chez les glossines ayant émergé.....	94
Tableau XIII : Taux de glossines hébergeant le trypanosome 21 jour après les infections expérimentales	95

RESUME

Les glossines (mouches tsé-tsé) sont des insectes hématophages, hôtes et vecteurs des espèces/ sous-espèces de trypanosomes africains responsables soit de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA)/ maladie du sommeil, soit de la Trypanosomose Animale Africaine (TAA)/ Nagana, sura, dourine... D'importance médicale/vétérinaire et agricole, ces diptères sont retrouvés dans 36 pays d'Afrique subsaharienne et transmettent des trypanosomes qui engendrent de lourdes répercussions à la fois sur la santé humaine (THA) et animale (TAA), et par ricochet sur l'économie des populations. En l'absence de vaccin, le contrôle de la maladie repose sur le diagnostic, la chimiothérapie, et principalement sur la lutte contre les insectes vecteurs. Étant partie intégrante du contrôle des populations vectrices et ceci dans le but de réduire la THA et la TAA, de nouvelles stratégies de lutte biologique visent à utiliser comme agent biologique *Sodalis glossinidius* (symbionte secondaire de la glossine). Ce symbionte a la particularité d'être transmis de manière verticale, de pouvoir être cultivé et modifié génétiquement en vue de délivrer, *in situ*, des molécules trypanocides dans le tractus gastro-intestinal des glossines. Bien que le caractère réfractaire des glossines soit déjà élevé, il n'en demeure pas moins qu'il pourrait être « renforcé » par des techniques de para-transgénése reposant sur une analyse approfondie du dialogue moléculaire des interactions glossine, symbionte et parasite. Ce travail a été divisé en deux axes.

Le premier axe visait à étudier certains facteurs impliqués dans la compétence vectorielle des mouches tsé-tsé, en analysant la diversité et l'abondance relative des différents genres bactériens habitant l'intestin moyen des glossines, en fonction du statut d'infection par le trypanosome. L'analyse méta-taxonomique de l'ADN provenant des intestins moyens des glossines appartenant à la sous-espèce *Glossina palpalis palpalis* a permis d'identifier 261 genres bactériens. Parmi ces bactéries, 114 ont franchi avec succès les deux filtres nécessaires à leurs descriptions, à savoir un seuil d'abondance relative supérieur ou égale à 0,01 % et la présence chez au moins 5 glossines. Le symbionte secondaire *Sodalis glossinidius* a été identifié chez 50% des glossines. Néanmoins, du fait de sa faible abondance relative, il n'a pas pu passer les filtres de sélection. Le symbionte primaire *Wigglesworthia* a présenté une abondance relative de 87%, parmi les 13% des genres bactériens restant, les genres *Spiroplasma*, *Tediphilus*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* étaient ceux majoritairement présents. De plus, il a été montré que la présence du trypanosome dans le tractus gastro-intestinal des glossines, dans le cas de *Trypanosoma congolense* type Savane, influait sur la distribution du microbiome ; il en était de même sur l'origine des glossines (site d'échantillonnage). Notre étude a mis en

exergue l'absence de 36 genres bactériens chez les glossines non infectées, ce qui pourrait suggérer leurs implications possibles dans le caractère réfractaire des glossines ; à l'exception du genre *Cupriavidus*, ces genres bactériens étaient cependant de faible abondance relative. Certains genres, y compris *Acinetobacter*, *Cutibacterium*, *Pseudomonas* et *Tepidiphilus*, bien que présents à la fois chez les glossines infectées et non infectées, se sont avérés être associés au statut non infecté des glossines. Par conséquent, leurs différents rôles méritent d'être évalués afin de déterminer si certains d'entre eux pourraient devenir de potentiels cibles pour le contrôle de la compétence des vecteurs et, par conséquent, pour la lutte contre la maladie du sommeil.

Le second axe consistait à l'analyse fonctionnelle *in vivo* par para-transgénèse de deux protéines (la cécropine et la rTbgTCTP) sur l'établissement de *Trypanosoma brucei gambiense*. Dans cette étude, nous avons réussi à cloner avec succès des gènes codant pour les protéines d'intérêts dans des souches de *Sodalis*. Ces *Sodalis* recombinants (rec*Sodalis*) ont été micro-injectés avec succès dans les stades larvaires L₃ des glossines. Il est aussi à noter que les gènes clonés étaient stables même après une 20^{ème} génération. Dans le cas des glossines hébergeant les rec*Sodalis* exprimant la cécropine, nous avons observé un taux inférieur de glossines, hébergeant les parasites, comparé à celui des différents témoins (témoin sans micro-injection et témoin micro-injecté avec de l'eau physiologique) bien que cela ne soit pas statistiquement significatif. Quant aux glossines hébergeant le rec*Sodalis* et exprimant la rTbgTCTP, il s'est avéré que cette protéine avait une action létale sur le développement des larves des glossines ; aucun effet de protection n'a été retrouvé chez celles ayant émergé. Notre étude fait partie de l'une des premières sur les essais de protéines pouvant moduler l'installation des trypanosomes sur *Glossina palpalis*. Les résultats obtenus ouvrent des voies à d'autres essais pouvant aboutir au blocage de la transmission des trypanosomes par les vecteurs.

Mots-clés : glossines, analyses méta-taxonomiques, paratransgénèse, trypanosome, microbiome

ABSTRACT

Glossins (tsetse flies) are bloodsucking insects host and vectors of species/ subspecies of African trypanosome responsible for either Human African Trypanosomiasis (HAT) / sleeping sickness or African Animal Trypanosomiasis (AAT) / Nagana, sura, dourine... Of medical/veterinary and agricultural importance, these Diptera are found in 36 countries in sub-Saharan Africa and have serious repercussions both on human (HAT) and animal health (AAT) and severely affect the economy of the populations of these regions. In the absence of a vaccine, the control of the disease is based on diagnosis, chemotherapy and mainly on the control of insect vectors. Being a part of the control of vector populations, new biological control strategies aim to use as a biological agent *Sodalis glossinidius* (secondary glossin's symbiont). This symbiont is transmitted to the progeny and has the particularity to be cultivated and genetically modified in order to deliver *in situ* anti-trypanosome molecules in the gut of glossins. Although the refractory nature of glossins is already high, it could be "supplemented" by para-transgenesis techniques based on an in-depth analysis of the molecular dialogue of glossin, symbiont and parasite interactions in order to block the chain transmission. This study was divided into two axes.

The first axis aimed to investigate factors involved in vector competence by analysing whether the diversity and relative abundance of the different bacterial genera inhabiting the fly's gut could be associated with its trypanosome infection status. Metabarcoding analysing of fly's gut identified a total of 261 bacterial genera were identified of which only 114 crossed two barriers: a threshold of 0.01% relative abundance and the presence at least in 5 flies. The secondary symbiont *Sodalis glossinidius* was identified in 50% of the flies but it was not considered since its relative abundance was much lower than the 0.01% relative abundance threshold. The primary symbiont *Wigglesworthia* displayed 87% relative abundance, the remaining 13% were prominently constituted by the genera *Spiroplasma*, *Tediphilus*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. Despite a large diversity in bacterial genera and in their abundance observed in microbiome composition, the statistical analyses of the 160 tsetse flies showed an association with flies' infection status and the sampling sites. Furthermore, tsetse flies harbouring *Trypanosoma congolense* Savannah type displayed a different composition of bacterial flora compared to uninfected flies. In addition, our study revealed that 36 bacterial genera were present only in uninfected flies, which could therefore suggest a possible involvement in flies' refractoriness; with the exception of *Cupriavidus*, they were however of low relative abundance. Some genera, including *Acinetobacter*, *Cutibacterium*, *Pseudomonas*

and *Tepidiphilus*, although present both in infected and uninfected flies, were found to be associated with uninfected status of tsetse flies. Hence their effective role deserves to be further evaluated in order to determine whether some of them could become targets for tsetse control of fly vector competence and consequently for the control of the disease.

The second axis consisted of *in vivo* functional analysis by para-transgenesis of cecropin and rTbgTCTP on the establishment of *Trypanosoma brucei gambiense*. In this study, we successfully cloned genes encoding our proteins of interest into *Sodalis* strains. These recombinant *Sodalis* (rec*Sodalis*) have been successfully micro-injected into the L3 larval stages of glossins. It should also be noted that the cloned genes were stable even after a 20th generation. In the case of glossins hosting rec*Sodalis* expressing cecropin, we observed a lower rate than the various controls (control without micro-injection and control micro-injected with physiological water) although this is not statistically significant. As for the glossins hosting the rec*Sodalis* expressing the rTbgTCTP, it turned out that this protein had a lethal action on the development of larvae; no protective effects were found in those that emerged. Our study is one of the first on protein assays that can modulate the installation of trypanosomes on *Glossina palpalis*. The results obtained are quite encouraging and open the way to other tests that may lead to the blocking of the transmission of trypanosomes by vectors.

Keywords: tsetse flies, metabarcoding analysis, paratransgenesis, trypanosome, microbiome.

INTRODUCTION

La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil et la Trypanosomose Animale Africaine (TAA) ou Nagana sont des maladies à transmission vectorielle causées par des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma* Gruby, 1843. Les mouches tsé-tsé (*Glossina* Wiedemann, 1830) sont les principaux vecteurs biologiques de la THA et de la TAA. D'importance médicale/vétérinaire et agricole, ces diptères hématophages sont retrouvés dans 36 pays d'Afrique subsaharienne, et engendrent de lourdes répercussions à la fois sur la santé humaine (THA) et animale (TAA) et sur l'économie des populations parmi les plus pauvres de la planète (Shaw *et al.*, 2013 ; Welburn et Maudlin, 2012).

Chez l'homme, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*Tbr*) Stephens & Fantham, 1910 et *T. brucei gambiense* (*Tbg*) Dutton, 1902 sont respectivement responsables de la forme aiguë de la THA qui sévit en Afrique de l'Est et du Sud, et de la forme chronique présente en Afrique de l'Ouest et Centrale. La forme aiguë représente environ 2% du total des cas de THA, et la forme chronique 98% des cas, avec moins de 3000 cas signalés en 2015 (Büscher *et al.*, 2017 ; Lindner *et al.*, 2020). Les animaux sauvages et domestiques peuvent être infectés par *Trypanosoma congolense* (*Tc*) Broden, 1904, *Trypanosoma vivax* (*Tv*) Zeimann, 1905 et d'autres sous-espèces de trypanosomes telles que *Trypanosoma brucei brucei* (*Tbb*) Plimmer et Bradford, 1899 (Nakayima *et al.*, 2012 ; Tessema *et al.*, 2014 ; Kato *et al.*, 2015). Ces animaux sont de potentiels hôtes réservoirs pour la THA (Njiokou *et al.*, 2006 ; Simo *et al.*, 2014).

Soixante-cinq millions de personnes vivent en zone d'endémie et demeurent à risque face à la THA, bien que le nombre de nouveaux cas soit actuellement le plus bas jamais enregistré depuis cinquante ans (OMS, 2019). Cette baisse du taux de nouveaux cas de maladies enregistrés s'est faite grâce à la surveillance entomologique/ lutte antivectorielle (LAV), au diagnostic médical et au traitement médicamenteux opérés par le Programme National de Lutte contre la THA (PNLTHA) et l'OMS. Sur la base de cette tendance prometteuse, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis sur pied une feuille de route visant l'élimination des maladies tropicales négligées, à l'instar de la THA due à *Tbg*, comme problème de santé publique pour 2020 et à l'interruption de la transmission (zéro cas) pour 2030 (Franco *et al.*, 2018).

Il est important de noter qu'au cours du siècle dernier, au milieu des années 60, la THA avait également été sur le point d'être éliminée, mais plusieurs flambées ont été enregistrées dans les années 1970 à la suite d'un « relâchement » de la surveillance épidémiologique (Brun *et al.*, 2010). Bien que l'incidence de la maladie soit aujourd'hui faible, il existe toujours un

risque de résurgence de la THA comme dans le passé ou encore tel qu'observé en 2016 en Guinée Conakry durant l'épidémie à Ebola. Cette épidémie a entraîné un relâchement des campagnes de dépistages et de traitements de la trypanosomose entraînant le dépistage de 200 nouveaux cas l'année d'après (Camara *et al.*, 2017).

De nombreuses méthodes de réduction des populations de mouches tsé-tsé ont connu plus ou moins du succès comme l'utilisation de la Technique de l'Insecte Stérile (TIS) dans l'île de Zanzibar qui a abouti à l'élimination du vecteur et donc de la maladie (Mogi & Teji, 1991), ou encore l'utilisation de mini écrans de couleur bleu et noir imprégnés d'insecticides, appelé « tiny targets », l'immersion des bovins dans des bains d'insecticides, le piégeage des glossines par utilisation de phéromones et l'épandage d'insecticides dans des zones infestées par ces dernières ce qui a considérablement réduit la transmission de la maladie (Mahamat *et al.*, 2017). A ce jour, aucun cas de résistance aux insecticides par les glossines n'a été signalé, et malgré le succès rencontré avec cette approche, nous ne pouvons ignorer l'impact négatif de l'utilisation des insecticides sur la diversité de la faune entomologique, sur l'écosystème et les conséquences écologiques dues à une utilisation généralisée et à grande échelle (Kariithi *et al.*, 2018) ; quant à l'utilisation de la TIS, le coût élevé de l'opération sur le continent est une limite majeure d'une part et, d'autre part, les insectes stériles restent des vecteurs potentiels de trypanosomes.

Le développement de méthodes pouvant interférer avec la capacité des mouches tsé-tsé à abriter des trypanosomes semble plus approprié que leur éradication complète, au demeurant impossible. En effet, de plus en plus de preuves ont montré que l'utilisation d'ingénierie génétique (para-transgénèse par exemple) (De Vooght *et al.*, 2018) est une approche prometteuse permettant de bloquer la transmission des parasites. En outre, le microbiome des vecteurs pourrait également moduler/interférer avec l'installation, la survie et la croissance du parasite dans la mouche tsé-tsé, donc sur sa transmission d'un hôte à l'autre (Abraham *et al.*, 2017 ; Weiss et Aksoy, 2011).

Des études récentes utilisant le microbiome d'insecte dans le but de contrôler et de prévenir des maladies vectorielles (Carrington *et al.*, 2018 ; Hoffmann *et al.*, 2011 ; Bian *et al.*, 2010) soutiennent l'intérêt d'explorer davantage cette stratégie. Cette approche est conforme au concept « One Health » de l'OMS qui reconnaît que la santé des humains et celle des animaux sont étroitement liées en raison de leurs interactions et de leur environnement commun. Pour ce faire, l'utilisation de glossines dont les symbiotes seraient génétiquement modifiés pour leur permettre de devenir résistantes à l'infection par les trypanosomes pourrait être un bon moyen de bloquer la chaîne de transmission et pourrait s'avérer être un précieux outil

complétant les stratégies de contrôle déjà existantes (Coutinho-Abreu *et al.*, 2010). Les mouches tsé-tsé ne peuvent pas être transformées en lignée germinale en raison de leur viviparité, ce qui est un frein à l'utilisation de la transgénèse (Attardo *et al.*, 2006). La propagation rapide des gènes intéressés dans la population est un élément clé poussant à l'emploi de la paratransgénèse. L'utilisation de symbiotes génétiquement modifiés offre une meilleure alternative car ils pourraient être transmis à la progéniture ce qui n'affectera pas la condition physique de l'insecte comme l'on peut le voir lors de la modification du génome de l'insecte par Cooley *et al.* (1988).

Parmi les symbiotes de la mouche tsé-tsé, *Sodalis glossinidius* (symbiote secondaire) a fait l'objet d'études approfondies notamment parce qu'il peut être cultivé *in vitro* et peut être génétiquement modifié (Cheng et Aksoy, 1999 ; Beard *et al.*, 1993 ; Welburn *et al.*, 1987). Sa transmission à la progéniture et le fait qu'il peut avoir à la fois une localisation inter- et intracellulaire dans l'intestin de la glossine, dans les différents muscles, dans le corps gras, dans les glandes lactées et glandes salivaires (Cheng et Aksoy, 1999), ont fait de cette bactérie « le meilleur vecteur *in vivo* » pour le largage *in situ* de composés d'intérêt permettant de contrôler la trypanosomiase humaine ou animale.

À ce jour, la seule façon d'avoir une colonisation stable des glossines et de leur progéniture par des souches recombinantes de *Sodalis* (*recSodalis*) est l'utilisation de la méthode de micro-injection chez des larves de troisième stade. Dans ce contexte, l'étude du dialogue moléculaire tripartite (glossine, microbiome et parasite) a permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans l'immunité de la mouche tsé-tsé (Tsagmo *et al.*, 2017 ; Geiger *et al.*, 2015). Plusieurs protéines, sur-exprimées ou sous-exprimées, ont été mises en évidence suivant le statut (infecté ou non) de la mouche tsé-tsé. Deux types de molécules « candidates », la *TbgTCTP* (protéine tumorale sécrétée par le parasite) et la Cécropine (peptide anti-microbien) ont suscité notre intérêt. La *rTbgTCTP* (*TbgTCTP* recombinante), tel que démontré par Bossard *et al.* (2017), a un effet *in vitro* sur le développement de plusieurs bactéries isolées de l'intestin moyen de glossines ; la cécropine, quant à elle a eu un effet sur *Trypanosoma cruzi* parasite responsable de la maladie de Chagas.

Hypothèse :

Cette étude vise à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'expression de la cécropine ou de la rTbgTCTP par *Sodalis glossinidius*, à l'intérieur du tractus gastro-intestinal des glossines, pourrait inhiber l'installation des trypanosomes. Comme observé sur *Trypanosoma cruzi*, l'ingestion de *Rhodococcus rhodnii*, symbionte de *Rhodnius rhodnii*, génétiquement modifié (exprimant la cécropine) par *Rhodnius prolixus* (vecteur de la maladie de Chagas) a conduit à une élimination complète du parasite après 104 jours, chez 65 % des vecteurs ayant ingéré un repas sanguin infectieux (Durvasuala *et al.*, 1997). Ces derniers ont noté une diminution significative du taux de parasites chez les 35 % restants de réduves infectées par *T. cruzi*. De même, la rTbgTCTP pourrait moduler le microbiome des tsé-tsé dans le but d'inhiber l'installation des trypanosomes en effectuant un contact prématuré et prolongé de cette protéine par la micro-injection du *Sodalis* recombinant, l'exprimant, au stade larvaire.

Objectif général :

Contribuer à la lutte contre les trypanosomiasés, en évaluant l'action de deux types de molécules « candidates », la TbgTCTP et la Cécropine sur l'installation du parasite dans l'intestin des glossines. Le but de ce travail est de moduler la compétence vectorielle des glossines afin de bloquer la transmission des trypanosomes.

Plus spécifiquement, il s'est agi pour nous :

- i- d'étudier la corrélation entre la composition taxonomique et l'abondance relative des taxons bactériens hébergés par *Glossina palpalis palpalis* et le statut infectieux des glossines à *Trypanosoma* sp. ainsi que les sites d'échantillonnage sur le terrain
- ii- d'évaluer l'action de la Cécropine et de la TbgTCTP recombinante comme molécules potentiellement bloquantes sur l'installation de *Trypanosoma brucei gambiense* dans le tractus gastro-intestinal de *Glossina palpalis gambiensis*.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Les Trypanosomoses

I.1.1. Historique

La maladie du sommeil a été découverte en 1374 par le philosophe Ibn Khaldoun à l'occasion de la mort de Mansa Djata, sultan du Mali, suite à une longue maladie se caractérisant par un état de somnolence prolongée le jour (Collomb, 1958). Plus tard en 1901 le trypanosome, agent causal de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA), fut observé dans le sang d'un patient par Forde ; ce parasite sera nommé *Trypanosoma gambiense* par Dutton en 1902 ; à la même époque, Castellani en 1903 rapporta la présence du trypanosome dans le liquide céphalo-rachidien. Ces deux localisations du trypanosome amenèrent ces auteurs à proposer qu'il s'agirait de deux espèces de trypanosomes distinctes, l'une (présente dans le sang) peu pathogène et l'autre « vraie » responsable de la maladie car causant la mort des patients. En 1903, Bruce & Nabarro observèrent que les trypanosomes sanguicoles, présents dans les zones où sévit la maladie, ne sont pas morphologiquement différents de ceux présents dans le liquide céphalo-rachidien ; ils en déduisirent que la présence des trypanosomes dans le sang faisait office de premier stade de la maladie. La même année, suspectant la mouche tsé-tsé d'être le vecteur de cette maladie, Bruce *et al.* (1909) en fournit la preuve expérimentale en réussissant la transmission des trypanosomes aux animaux via des glossines sauvages gorgées sur des « sommeilleux ». Des cas sévères de maladie du sommeil et d'évolution rapide vers la mort ont été signalés très tôt en Afrique de l'Est, mais ce n'est qu'en 1910 que Stephens et Fantham prouvèrent que le trypanosome de la forme dite « aigue » diffère de *Trypanosoma gambiense* ; il est alors appelé *Trypanosoma rhodesiense* du fait de son origine, la Rhodésie actuel Zimbabwe (Penchenier & Laveissière, 2000).

Une variante de cette maladie affectant les animaux, sous le nom de Trypanosomose Animale Africaine (TAA) ou Nagana, fut décrite pour la première fois dans le papyrus vétérinaire de Kahun à l'époque des pharaons (Griffith, 1898). La première observation du parasite, sur une grenouille, a été faite en 1843 par le médecin Hongrois Gruby. Il nomma le parasite *Trypanosoma* (Haag *et al.*, 1998). Quelques années plus tard en 1880, Griffith Evans, aux Indes, mit en évidence le parasite chez des chevaux et chameaux, nommé plus tard *Trypanosoma evansi* Balbiani, 1888, provoquant la maladie alors nommée “surra”, montrant ainsi la pathogénicité du protozoaire. En 1894, Bruce trouva des trypanosomes dans le sang de bovins souffrant de « Nagana » ; il réussit ensuite à infecter des chevaux avec des glossines

infectées. En 1895, il identifie le parasite *Trypanosoma brucei* comme l'agent responsable de la « Nagana ». A la même époque (1904-1905), deux autres trypanosomes pathogènes pour les animaux furent découverts : *Trypanosoma congolense* Broden, 1904 et *Trypanosoma vivax* Ziemann, 1905. Ces découvertes successives concernant la maladie, le parasite, le vecteur et l'existence d'un réservoir de parasites chez les animaux sauvages et domestiques, ont permis de mettre en évidence les facteurs influençant le cycle de transmission et, de ce fait, ont permis de créer un premier modèle épidémiologique.

I.1.2. Taxonomie

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés sanguicoles exo-érythrocytaires. On les retrouve dans le sang, la lymphe ou le système nerveux central (Penchenier & Laveissière, 2000). D'après la classification de Hoare (1972) revue par Lévine *et al.* (1980), les trypanosomes appartiennent au Phylum des Sarcomastigophora, à la classe des Zoomastigophora Calkins, 1909, à l'ordre des Kinetoplastida Höniberg, 1963, à la famille des Trypanosomatidae Döflein, 1901 et au genre *Trypanosoma* Gruby, 1843 (figure 1). Au sein du genre *Trypanosoma* on retrouve huit sous-genres classés en deux groupes selon le mode de développement et le mode de transmission du parasite par le vecteur à l'hôte mammifère (Hoare, 1972 ; Levine *et al.*, 1980) :

- le groupe des Stercoraria chez qui la transmission est postérograde ; le parasite, transmis par les fèces du vecteur, pénètre de manière active à travers la peau de l'hôte à la faveur de lésions cutanées provoquées lors du grattage de la zone de piqûre. Ce groupe comprend trois sous-genres, *T. Herpetosoma*, *T. Megatrypanum* et *T. Schizotrypanum* ; seul ce dernier sous-genre abrite une espèce de trypanosome pathogène pour l'homme, *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, responsable de la maladie de Chagas en Amérique Latine ; son vecteur est une réduve du genre *Triatoma* ;
- le groupe des Salivaria chez qui la transmission est antérograde ; il comprend tous les autres trypanosomes transmis par les glossines. Chez ces derniers, la transformation du parasite débute dans le tube digestif de la glossine pour se terminer dans ses glandes salivaires ou pièces buccales en fonction de l'espèce du parasite. Les trypanosomes sont injectés dans le sang des mammifères par la piqûre de la glossine. Ce groupe comprend de nombreuses espèces et sous-espèces de trypanosomes africains ; toutefois seules deux d'entre elles, appartenant à l'espèce *Trypanosoma brucei* Plimmer & Bradford, 1899 sont infectieuses pour l'être humain. Il s'agit de *Trypanosoma brucei rhodesiense*,

transmis par des glossines du groupe *Glossina morsitans*, responsable de la maladie du sommeil à évolution aiguë en Afrique Orientale et Australe et de *Trypanosoma brucei gambiense* responsable de la maladie du sommeil à évolution chronique en Afrique de l'Ouest et Centrale. Ce dernier parasite est transmis par des glossines du groupe *Glossina palpalis*. La sous-espèce *Trypanosoma brucei brucei*, responsable de la maladie appelée « Nagana » chez les animaux domestiques et sauvages, non pathogène pour l'homme, est transmise par les glossines du groupe *Glossina morsitans*. Les espèces *T. vivax* (sous-genre *T. Duttonella*) Ziemann, 1905, *T. congolense* Broden, 1904, et *T. simiae* (sous-genre *T. Nannomonas*) sont également responsables de la trypanosomose animale. Ces espèces causent d'importants dégâts au sein du bétail.

Dans la suite de ce manuscrit, seuls les trypanosomes du groupe des Salivaria infectant l'homme ou les animaux en Afrique seront traités.

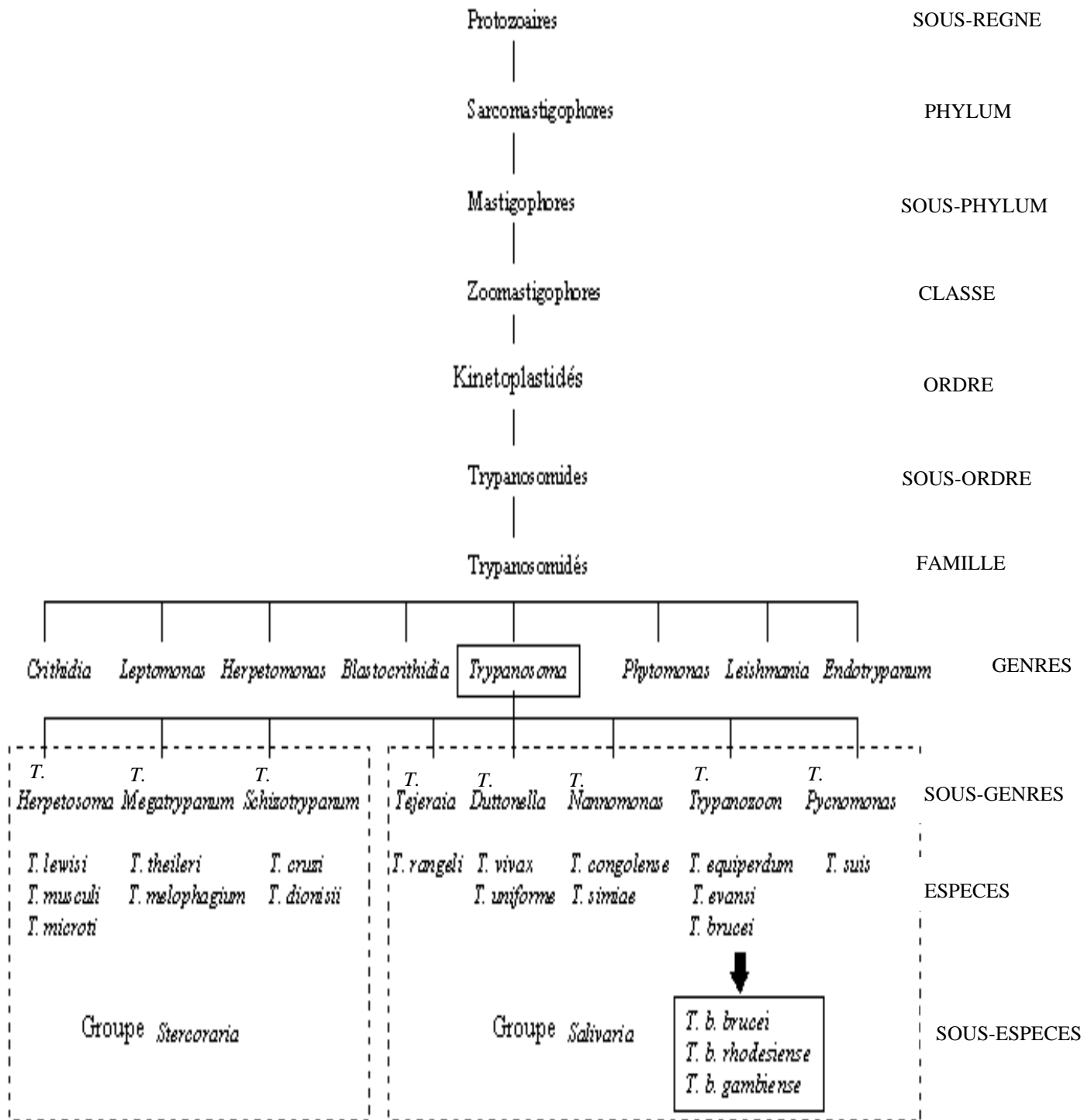


Figure 1 : Classification des trypanosomes (Hoare, 1972 modifiée).

I.1.3. Morphologie et structure

Les trypanosomes africains sont fusiformes, allongés et flagellés ; ils présentent une grande variété de tailles selon les espèces/ les sous-espèces et selon les phases de leur cycle cellulaire. Ils mesurent 20 à 30 micromètres (μm) de long sur 2 à 3 μm de large. Leur forme est définie par un cytosquelette hautement polarisé qui conserve l'intégrité des organites uniques ainsi que celle de la cellule entière au cours du cycle cellulaire (Robinson *et al*, 1995). Les trypanosomes salivaires ont une surface entièrement recouverte d'un manteau de glycoprotéines, appelé VSG (Variant Surface Glycoprotein) ou glycoprotéines variantes de surface, permettant au trypanosome de se maintenir chez l'hôte mammifère au cours de son développement (Horn, 2014). Au microscope optique, le trypanosome apparaît après coloration au May-Grunwald Giemsa (MGG) comme un élément allongé avec trois structures caractéristiques : un noyau central ; un kinétoplaste dans la partie postérieure et un flagelle s'enroulant autour du corps cellulaire (Kennedy, 2013).

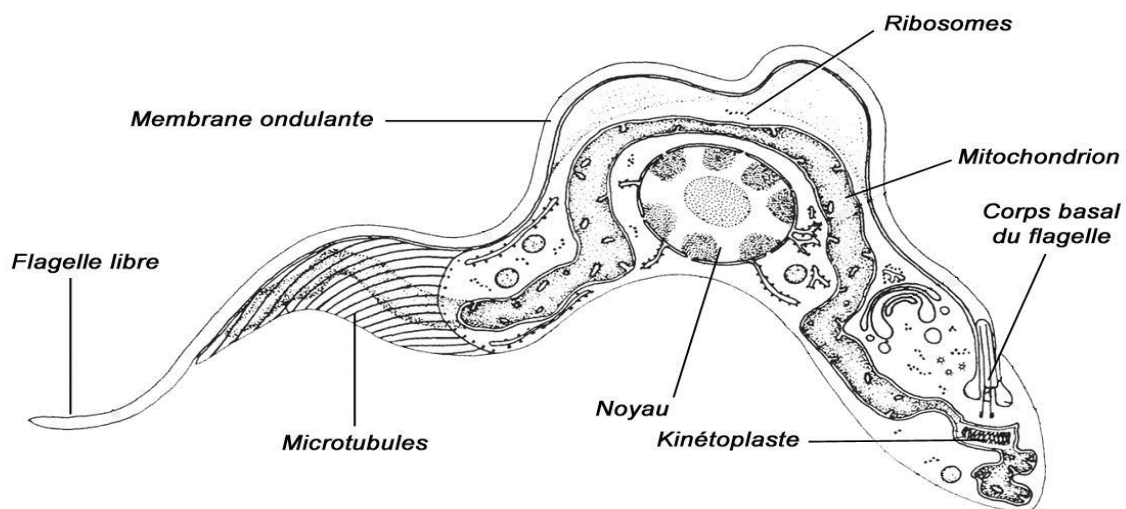


Figure 2 : Ultrastructure de *Trypanosoma brucei* s. l. vu au microscope électronique (Mulligan, 1970).

L'ultrastructure des trypanosomes montre (Figure 2) :

- une paroi cellulaire ou périplasme constituée de trois couches : une membrane périplasmique, un réseau de microtubules servant de cytosquelette et un manteau de glycoprotéines constitué presque exclusivement de VSG ;
- un flagelle qui assure la motilité du parasite chez l'hôte mammifère et son attachement dans le système digestif du vecteur. Il est composé d'un axonème (formé de 9 paires de microtubules périphériques et d'une paire centrale), d'une tige paraflagellaire formée par un réseau de filaments et d'une membrane (semblable à la membrane plasmique) qui permet au parasite d'adhérer aux épithéliums de la glossine par le biais des hémidesmosomes (Vaughan & Gull ; 2003 ; Ralston & Hill, 2008) ;
- un corps basal auquel le flagelle est lié par le biais de microtubules. Il ressemble à des centrioles des cellules animales et est lié par une série de filaments au génome mitochondrial du kinétoplaste ;
- une poche flagellaire d'où sort le flagelle. Elle est le seul point d'échange entre le parasite et son hôte par endo/exocytose (Overath & Engstler, 2004) ;
- le noyau qui renferme l'information génétique dans une enveloppe formée de deux feuillettes accolées et parsemées de pores. Il est central chez *T. congolense* et légèrement excentré vers l'arrière chez *T. brucei* ;
- le réticulum endoplasmique (RE) lié à l'enveloppe nucléaire, à l'appareil de Golgi et à la mitochondrie. La synthèse des protéines se fait au niveau du RER (RE rugueux) et le repliement de peptides au niveau de REL (RE lisse) avant leur acheminement vers l'appareil de Golgi ;
- l'appareil de Golgi qui constitue le lieu de maturation et d'adressage des protéines ;
- le kinétoplaste situé à proximité du corps basal ; il forme un ensemble continu avec la mitochondrie s'étendant sur toute la longueur du corps cellulaire (Vickerman, 1969 ; Vickerman *et al.*, 1993). Il contient 10 à 20% de l'ADN du parasite. L'ADN kinétoplastique est constitué d'un réseau complexe de cercles d'ADN double brin de tailles différentes (maxi et mini-cercles). Les maxi-cercles codent pour les gènes

mitochondriaux et les mini-cercles pour les ARN guides essentiels à l'édition des ARN messagers (ARNm) (El-Sayed *et al.*, 2000) ;

- la mitochondrie, très développée et ramifiée chez les formes procycliques, permet de métaboliser différentes sources de carbone à l'instar de la proline (abondante chez le vecteur). Chez le mammifère, la mitochondrie ne joue pas un grand rôle dans le métabolisme énergétique. La production énergétique dépend du catabolisme du glucose par glycolyse (Michels *et al.*, 2021) ;
- les glycosomes, compartiments apparentés aux péroxysomes spécifiques des Kinetoplastidae, permet les sept premières étapes de la glycolyse mais aussi d'autres voies métaboliques telles que la voie des pentoses phosphates, la néoglucogénèse et le métabolisme des purines. Leur composition et l'activité des enzymes qu'ils contiennent changent au cours du cycle évolutif des trypanosomes (Gualdron-Lopez *et al.*, 2012 ; Opperdoes & Borst 1977).

On distingue plusieurs formes du parasite tant chez l'insecte vecteur que chez l'hôte vertébré.

Chez le vecteur

Les trypanosomes se présentent sous la forme procyclique (a), dans l'intestin moyen, épimastigote (b) dans le proventricule et trypomastigote métacyclique (c) dans les glandes salivaires (Figure 3).

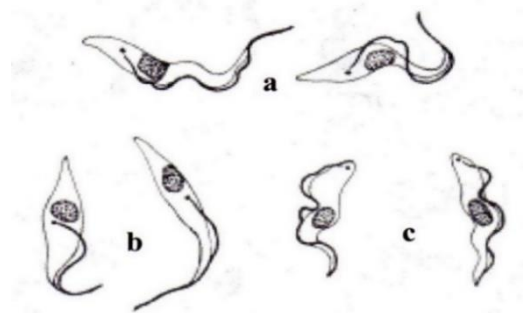


Figure 3 : Différentes formes de *Trypanosoma brucei* s.l. chez la glossine (Penchenier & Laveissière, 2000).

Dans la forme procyclique (a) le trypanosome, allongé et à kinétoplaste situé à mi-chemin entre l'extrémité postérieure et le noyau, est dépourvu de son enveloppe glycoprotéique de surface.

Dans la forme épimastigote (**b**), le trypanosome possède un flagelle allongé, une membrane ondulante courte, un kinétoplaste et un noyau juxtaposés. Dans la forme métacyclique (**c**), le trypanosome est sous forme infectante et possède un kinétoplaste situé derrière le noyau, une enveloppe glycoprotéique de surface mais est dépourvu de flagelle libre.

Chez l'hôte vertébré (mammifère)

Les trypomastigotes sanguicoles (Figure 4) peuvent se présenter sous une forme grêle (a), intermédiaire (b) ou trapue (c) (Figure 4).

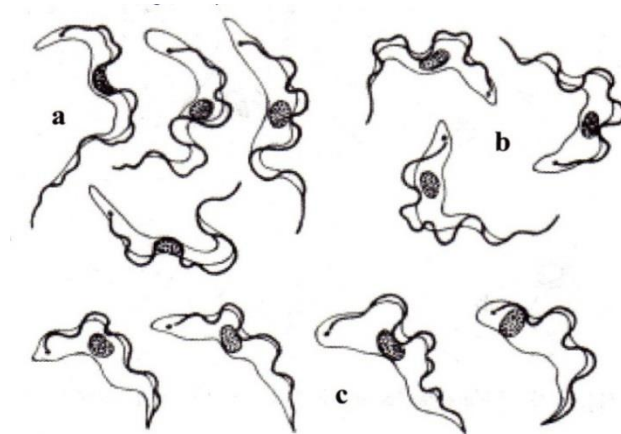


Figure 4 : Différentes formes des trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon*
a : forme grêle, b : forme intermédiaire, c : forme trapue (Penchenier & Laveissière, 2000).

La forme grêle ou allongée ou « Slender » (**a**), dont la taille moyenne est de 23 à 30 μm , peut dépasser 40 μm . Le trypanosome possède un flagelle libre, une membrane ondulante bien développée, un noyau et un kinétoplaste subterminal. La forme intermédiaire (**b**), où le trypanosome mesure 20 à 25 μm , possède un flagelle court, une extrémité postérieure plus arrondie et un kinétoplaste plus proche de l'extrémité antérieure que chez les formes allongées. C'est une forme de passage entre la forme allongée et la forme courte. La forme trapue ou courte ou « Stumpy » (**c**), dont le trypanosome est court et massif mesure 12 à 20 μm . Dépourvu de flagelle, le trypanosome a un kinétoplaste plus proche de l'extrémité postérieure et un noyau arrondi.

I.1.4. Cycle biologique des trypanosomes

Le cycle des trypanosomes africains implique des étapes successives chez l'hôte mammifère et chez la glossine à l'exception de *T. equiperdum*, adapté à la transmission vénérienne, et de *T. evansi* transmis mécaniquement. Chacune de ces étapes se caractérise par une série de transformations morphologiques et physiologiques engendrant différentes formes de parasites en fonction de l'hôte.

I.1.4.1. Cycle chez le vertébré (mammifère)

Chez l'hôte mammifère, l'infection débute par l'injection intradermique des trypanosomes (formes métacycliques trypomastigotes) par une glossine (*Glossina* spp.) infectée (Englund *et al.*, 1982). Ces parasites localisés pendant quelques jours au point d'inoculation entraînent une réaction inflammatoire locale encore appelée chancre d'inoculation ; ces derniers se multiplient activement par division binaire. Par voie lymphatique, les trypanosomes migrent vers le ganglion de drainage et sont détectables dans la lymphe afférente de ce ganglion quelques jours avant leur détection dans le sang (Bengaly *et al.*, 2001). C'est la première phase de la maladie (héματο-lymphatique) pendant laquelle les symptômes sont non spécifiques (Dumas & Bouteille, 1996). En fonction de l'espèce/ sous-espèce de trypanosome, de la souche de trypanosome, du nombre de trypanosomes injectés et de l'état immunitaire de l'hôte, la durée de la période d'incubation (de l'inoculation à la détection du parasite dans le sang) varie généralement de 1 à 3 semaines (Clausen *et al.*, 1992). Dans le cas de *T. brucei*, les trypanosomes de forme trypomastigote, longs et fins (long-slender), évoluent en se divisant activement pour donner des formes trypomastigotes intermédiaires puis des formes trypomastigotes courtes et trapues (short stumpy) qui arrêtent de se diviser de manière irréversible (Shapiro *et al.*, 1984). Cette dernière forme est infectante pour la glossine, chez qui elle se différenciera en formes procycliques (Figure 5).

Ces trypanosomes évoluent dans le sang par « vagues parasitémiques » correspondant à des phénomènes d'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte (Barry & McCulloch, 2001) contrôlés par la VSG recouvrant le trypanosome (Vickerman, 1978 ; Pays & Steinert, 1988 ; Horn, 2014). Sur une période plus ou moins longue, en fonction du parasite et de l'immunité de l'hôte, certains trypanosomes finissent par traverser la barrière hémato-encéphalique puis envahissent le système nerveux central. Ce stade correspond à la seconde phase de la maladie (méningo-encéphalitique) et se caractérise habituellement par l'apparition

de troubles neurologiques : troubles du comportement, de la conscience, de la motricité ; sans traitement, l'issue est en générale fatale (Welburn & Maudlin, 1997). Les mécanismes qui permettent le passage des trypanosomes dans le système nerveux central ne sont pas bien connus ; on soupçonne, cependant, que le franchissement de la barrière hémato-encéphalique par le trypanosome serait lié à l'activation, dans les cellules endothéliales microvasculaires, d'un signal. Cette activation est provoquée par l'intervention de cystéine protéases du parasite, dont deux formes (cathepsine B-like et L-like enzymes), aussi appelées brucipaines, sont présentes chez *T. brucei*. L'interféron gamma pourrait aussi faciliter la traversée de la barrière hémato-encéphalique (Rodgers, 2010).

I.1.4.2. Cycle chez le vecteur

L'amorce du cycle chez la glossine débute dès l'absorption des trypomastigotes de forme courte et de formes allongée via un repas de sang sur un hôte infecté. Les formes courtes sont plus adaptées à l'intestin de la glossine et seraient les seules à pouvoir maintenir l'infection (Welburn & Maudlin, 1999). Un seul parasite suffirait pour maintenir l'infection chez les glossines sensibles (Welburn *et al.*, 1989). Dans l'intestin de la glossine, les parasites subissent une série de transformations complexes nécessaires à leur adaptation à leur nouvel environnement : température froide, effet des enzymes digestives de l'hôte, ainsi que les molécules effectrices du système immunitaire de ce dernier. Dans les 2 à 4 heures qui suivent la prise du repas infectant, les trypanosomes viables perdent la « VSG », se transforment en trypomastigotes procycliques qui expriment à leur surface, un nouveau manteau de glycoprotéines invariables : la procycline. Ces formes prolifèrent et colonisent l'intestin afin de générer une infection procyclique persistante ; c'est la phase d'installation de l'infection chez l'insecte vecteur. Au bout d'un certain temps, les formes procycliques arrêtent de se diviser et deviennent les formes mésocycliques dont certaines quittent l'espace ectopéritrophique et se dirigent vers le proventricule et l'œsophage puis deviennent des formes post-mésocycliques. Les formes post-mésocycliques migrent soit vers les glandes salivaires (*T. brucei* spp.), soit vers les parties buccales de la glossine (*T. congolense*) où elles se différencient ; c'est la phase de maturation. Elles se transforment alors en formes épimastigotes longues puis en formes épimastigotes courtes qui sont des formes pré-métacycliques attachées toutes les deux à l'épithélium des glandes salivaires. Les formes pré-métacycliques donneront des formes métacycliques infectantes transmissibles à un hôte mammifère lors d'un repas de sang de la glossine (Figure 5).

In vivo, seule une petite proportion de glossines ayant acquis le parasite sera le siège de la transformation de la forme procyclique en la forme mature transmissible à l'hôte mammifère, à l'occasion d'un nouveau repas de sang pris par la glossine vecteur (Welburn *et al.*, 1994). Cette capacité à acquérir le parasite, à permettre sa maturation et à le transmettre à un hôte mammifère est définie comme la « compétence vectorielle » de la glossine. Elle dépend à la fois de l'espèce du parasite et de l'espèce de la glossine-vecteur. Cependant, plusieurs facteurs impliqués dans l'installation du parasite dans l'intestin de la glossine sont encore ignorés.

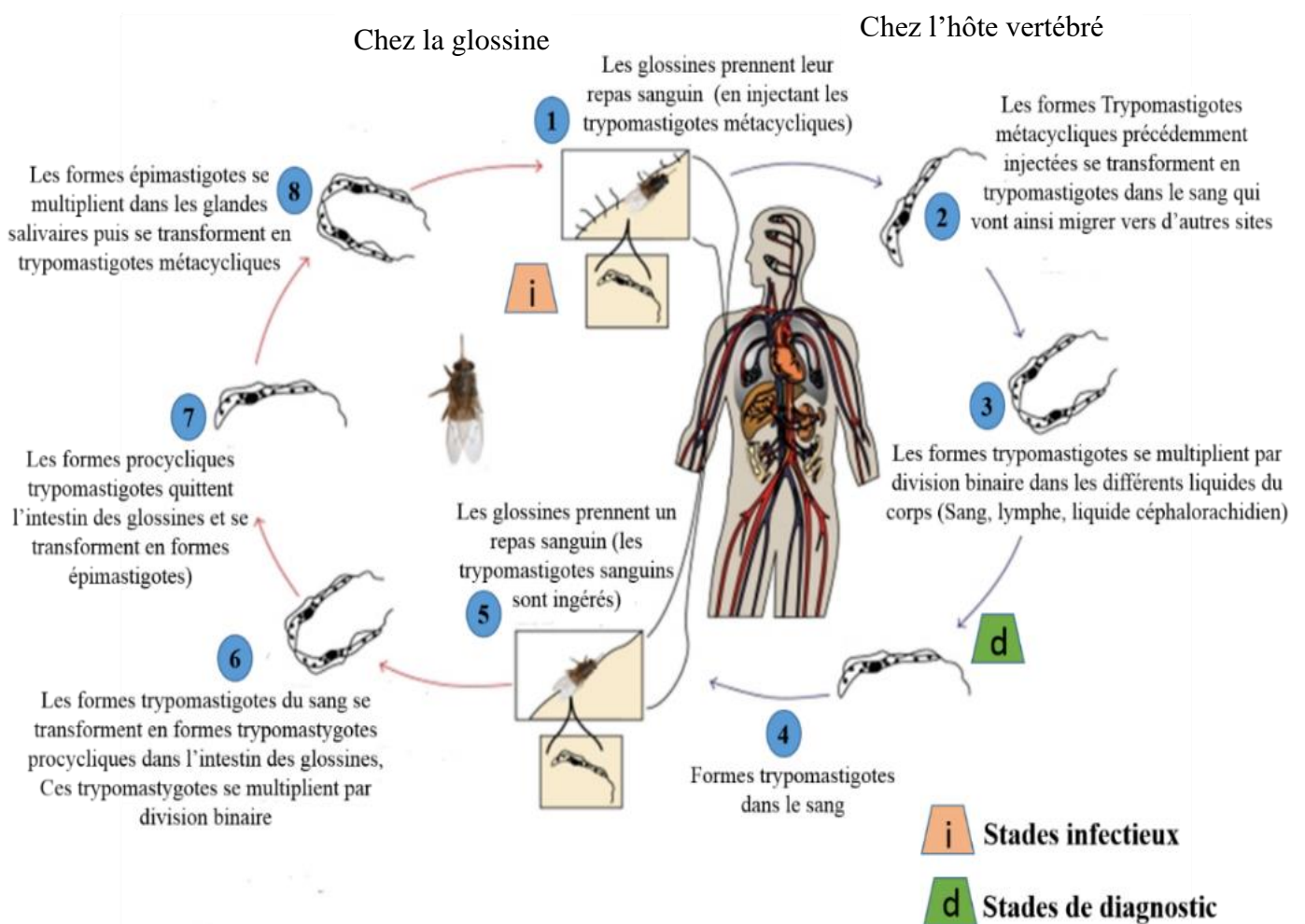


Figure 5 : Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei gambiense*

(Source : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm>. Consulté le 20-09-2018)

I.2. Glossine

I.2.1. Description

Du terme grec « *Glossina* » qui signifie « langue » en référence à ses pièces buccales de forme allongée, la glossine ou mouche tsé-tsé est un insecte hématophage responsable de la transmission des trypanosomes causant la mort de nombreuses personnes et la perte de plusieurs animaux. Ayant l'allure générale des Muscidae, les glossines se reconnaissent aisément au repos par leurs ailes croisées sur le dos qui portent une « cellule en H » caractéristique (Figure 6), ce qui les différencie des Muscidae. Leur trompe proéminente est située horizontalement dans le prolongement de la tête (Kettle, 1995). Sans la trompe (proboscis), elles présentent des tailles allant de 6 à 16 mm de longueur en fonction des espèces. Le mâle est généralement plus petit que la femelle, et contrairement aux moustiques, ils se nourrissent tous deux du sang des vertébrés et sont donc tous les deux capables de transmettre des pathogènes dont les trypanosomes. Leur coloration peut varier de brun noirâtre à brun testacé mais jamais métallique (Itard, 1988 ; Krinsky, 2019).



Figure 6 : Morphologie d'une glossine

(Source : Umr-intertryp.cirad.fr)

I.2.2. Taxonomie

Les glossines sont des insectes diptères cyclorraphes (l'adulte à sa sortie de la puppe découpe un opercule circulaire près de l'extrémité du puparium d'où le terme cyclorraphe), appartenant à la famille des Glossinidae qui ne comporte qu'un seul genre, le genre *Glossina* Wiedemann, 1830 et une trentaine d'espèces et de sous-espèces. Seules quelques-unes transmettent effectivement le parasite responsable de la maladie du sommeil chez l'homme (Figure 7).

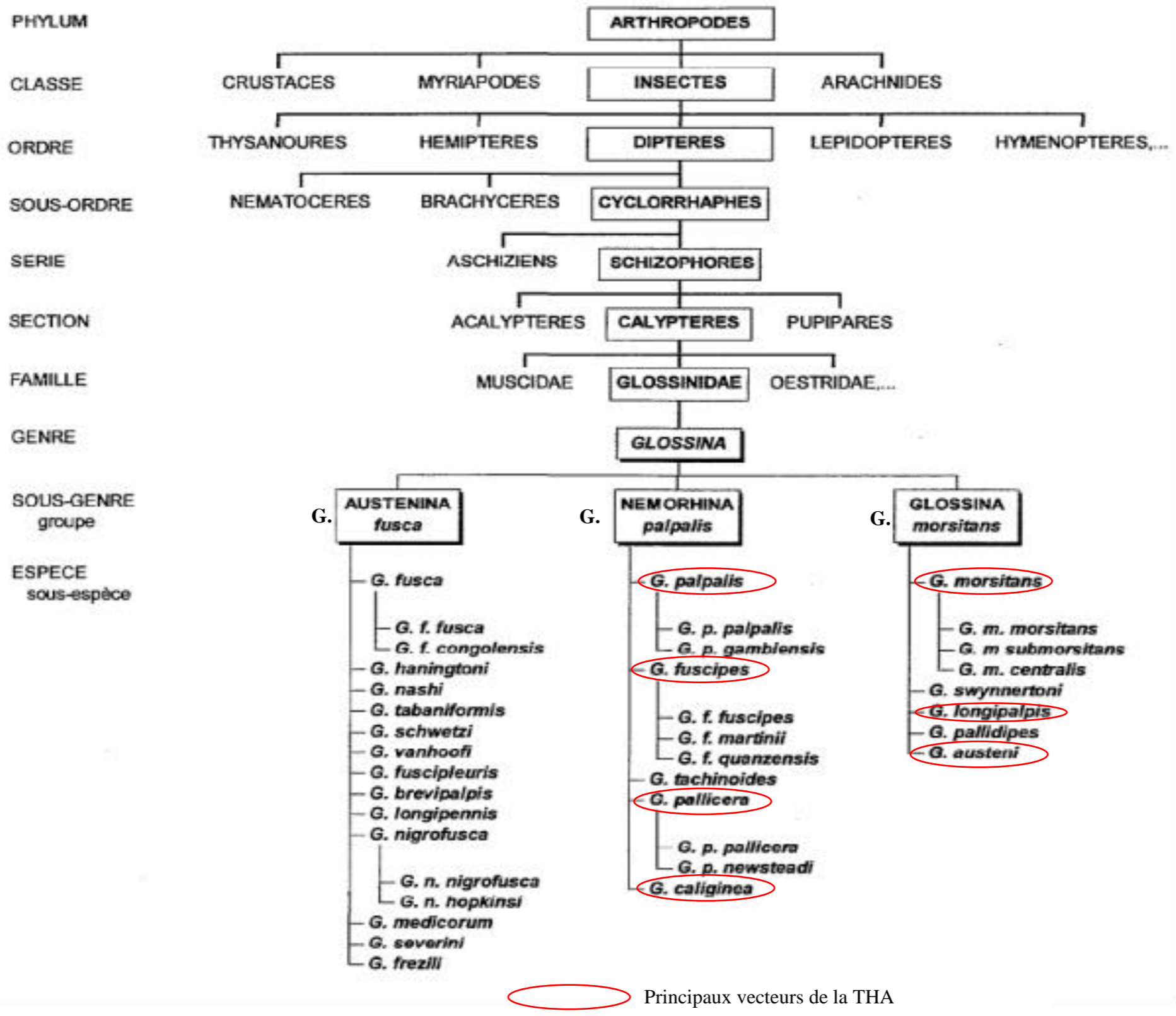


Figure 7 : Classification des glossines (Brunhes *et al.*, 1998)

Les espèces du genre *Glossina* sont regroupées en trois sous-genres, ce qui est dû à des analogies morphologiques, bioécologiques et même génétiques qu'elles partagent. On distingue ainsi :

- le sous-genre *G. Nemorhina* Robineau-Desvoidy, 1830 (groupe palpalis), qui regroupe des glossines de petite taille rencontrées essentiellement en zone forestière humide d'Afrique centrale et occidentale. Deux de ses espèces sont les principaux vecteurs de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*, notamment *Glossina fuscipes* Newstead, 1910 et *Glossina palpalis* (cette dernière espèce ayant deux sous-espèces dont *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy, 1830 et *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank, 1949). Cependant, *G. fuscipes* assure également la transmission de *Trypanosoma brucei rhodesiense* en Afrique orientale, dans les zones de savane ;

- le sous-genre *G. Glossina* Zumpt, 1935 (groupe morsitans) regroupe des glossines savanicoles, de taille moyenne : les espèces *G. morsitans* Westwood, 1850 (avec trois sous-espèces : *G. morsitans morsitans* Wiedemann, 1850, *G. morsitans submorsitans* Newstead, 1911 et *G. morsitans centralis* Machado, 1970), *G. pallidipes* Austen, 1903 et *G. swynnertoni* Austen, 1923, assurent la transmission de *Trypanosoma brucei rhodesiense* ;

- le sous-genre *G. Austenina* Townsend, 1921 (groupe fusca) regroupe des glossines de grande taille, typiques des zones forestières denses. Elles sont très sensibles aux modifications de leurs habitats à l'exception de *Glossina longipennis* Corti, 1895 et *Glossina brevipalpis* Newstead, 1911 qui peuvent s'adapter à des variations d'habitats plus ou moins importantes. Les glossines de ce sous-genre se nourrissent sur les animaux sauvages et sont sans intérêt médical ou vétérinaire connu.

Van der Planck (1949), Challier *et al.* (1982) et Bouyer (2006) ont évoqué l'existence possible d'espèces cryptiques sur la base des ressemblances morphologiques, génétiques et géographiques ou encore de la capacité vectorielle et d'une certaine stérilité chez les hybrides entre sous-espèces. Ils ont proposé d'élever des sous-espèces au rang d'espèces, notamment en ce qui concerne *G. palpalis* s.l. et *G. fuscipes* s.l. Par exemple, l'espèce *G. palpalis* comporte les sous-espèces *G. palpalis palpalis*, et *G. palpalis gambiensis* (Figure 7). Ces deux sous-espèces sont allopatriques ; aux frontières de leurs aires de répartition, elles s'hybrident sur une bande d'une dizaine de kilomètres (Van der Planck, 1949 ; Challier *et al.*, 1982). La F1 hétérogamétique (mâle) est totalement stérile (Gooding, 1997 ; Orr, 1997), ce qui selon Bouyer (2006) devrait en faire deux espèces vraies, que l'on devrait appeler *G. palpalis* et *G.*

gambiensis. Il est possible que sous les phénotypes « *gambiensis* » et « *palpalis* » se cachent encore d'autres espèces cryptiques, difficilement différenciables morphologiquement. Cette hypothèse est d'autant plus forte que des essais de croisement entre individus de *G. palpalis palpalis* originaires du bas-Zaïre (RDC) et du Nigeria ont également donné une descendance mâle stérile (Gooding *et al.*, 2004). De plus, des différences morphologiques au niveau de la tête ont été démontrées entre des souches de *G. palpalis palpalis* de Côte d'Ivoire et celles du Congo (Gouteux & Dagnogo, 1985).

Puisque les équipes de recherche qui s'intéressent à cette question sont peu nombreuses, il y a peu de chances que de grands changements interviennent dans les prochaines années, à moins que des outils novateurs fassent leur apparition et permettent de voir sous un jour nouveau les relations entre les espèces de tsé-tsé (OMS, 2013).

I.2.3. Distribution géographique

Presque exclusivement africaine, la répartition des glossines s'étend sur près de 10 millions de km², se limitant au niveau de l'Afrique subsaharienne (Figure 8), entre les latitudes 15° nord et 29° sud (Penchenier & Laveissière, 2000). Elles sont absentes des îles situées à l'est du continent africain, sauf sur l'île d'Unguja au Zanzibar où *Glossina austeni* Newstead, 1912 était présente jusqu'à son éradication, avec la dernière capture de glossines sauvages en 1996 (Vreysen *et al.*, 2000). Quelques spécimens de *G. morsitans* Wiedemann, 1850 et *G. fuscipes* Newstead, 1911 ont été également retrouvés dans le sud-ouest de l'Arabie saoudite (Elsen *et al.*, 1990).

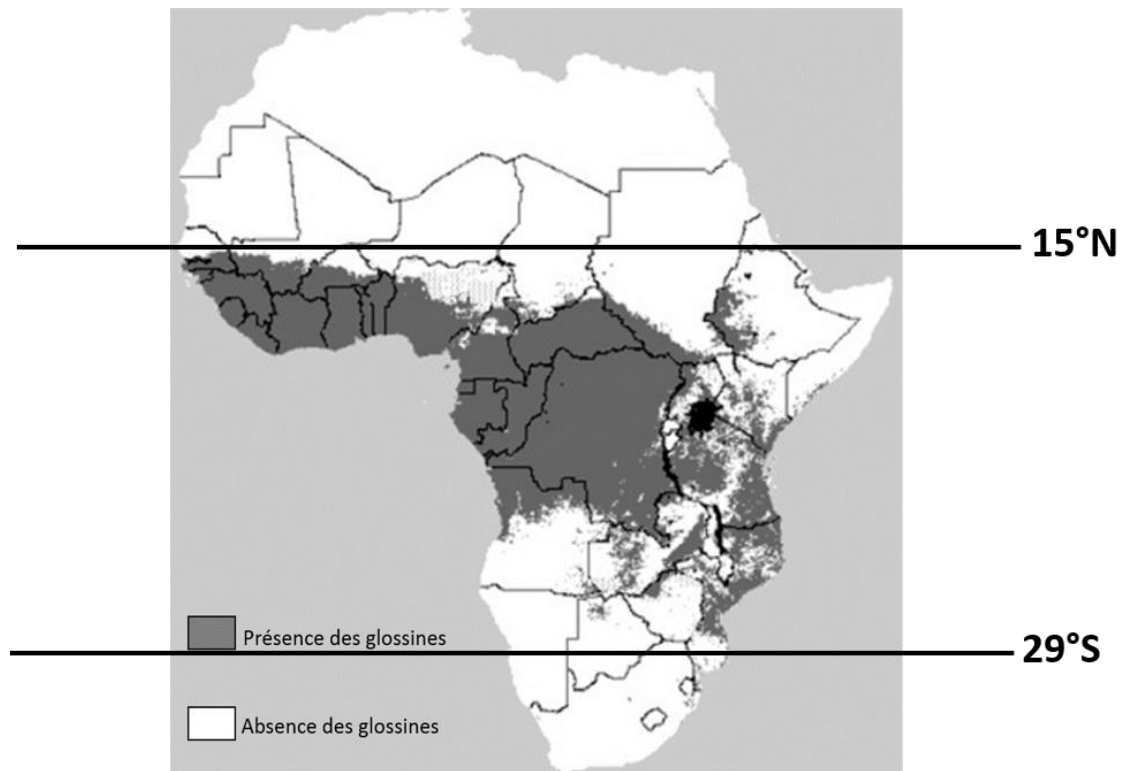


Figure 8 : Distribution des glossines sur le continent Africain (Abd-Alla *et al.*, 2013).

La localisation africaine des glossines serait liée à leurs exigences en matière de température et d'humidité. Leur répartition est fonction des niches écologiques favorables à leur développement. Elles se concentrent dans des zones de particularités écologiques distinctes. On les trouve principalement dans la végétation au bord des cours d'eau et des lacs (*G. palpalis*), des forêts (*G. fusca*) et des grandes étendues de savane arbustive (*G. morsitans*) (Walshe *et al.*, 2009). Lorsque la température moyenne est trop élevée, les glossines se réfugient dans des zones localement plus fraîches où elles peuvent survivre, par exemple, le long des berges fluviales que recouvrent les galeries forestières (Figure 9). On ne les retrouve habituellement pas au-delà de 1200 mètres d'altitude.

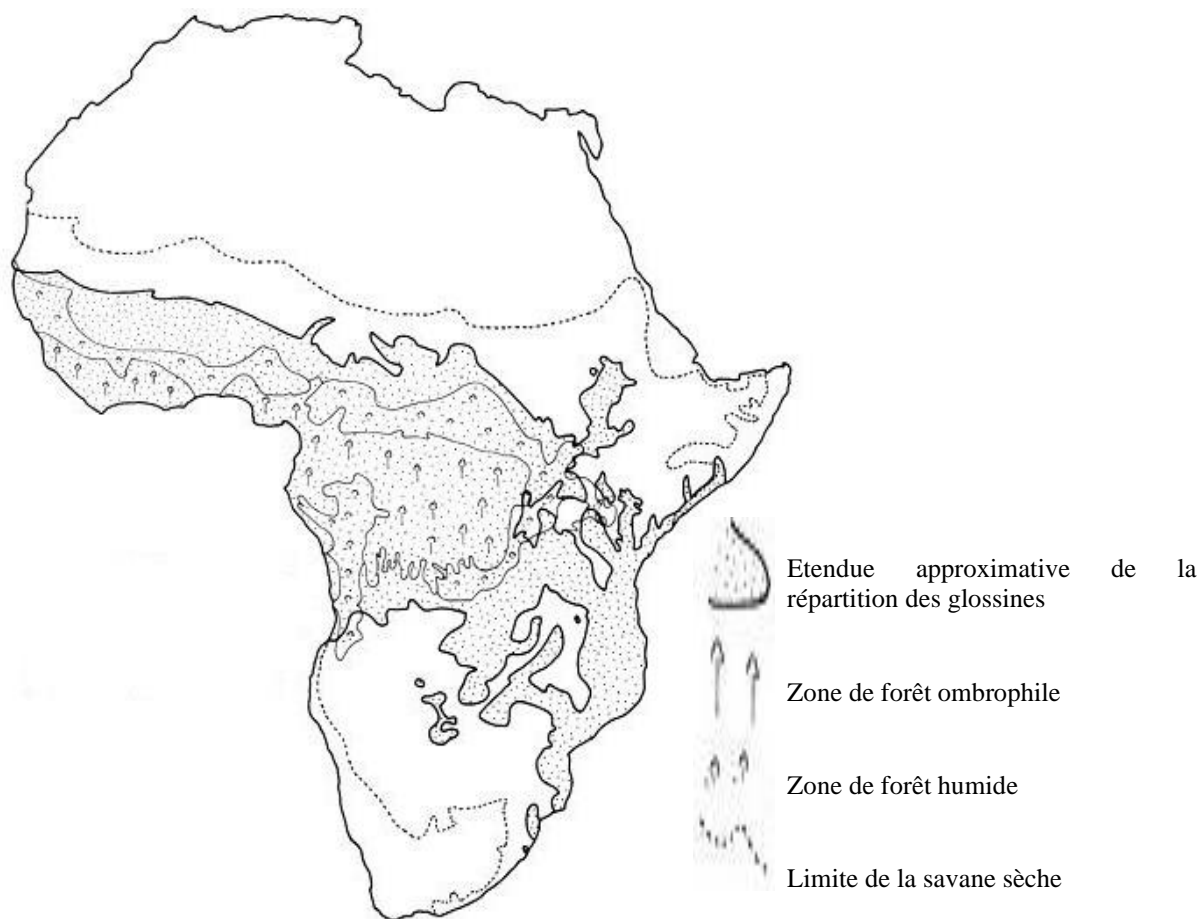


Figure 9 : Distribution géographique des glossines intégrant le couvert végétal

(Source : <http://www.fao.org/docrep/009/p5178f/P5178F06.htm> . Consulté le 16-11-2017)

I.2.4. Biologie et cycle de développement

- Biologie de l'insecte

La glossine à sa sortie de la pupa, par déhiscence circulaire, doit sa survie au reste d'énergie provenant de ses réserves lipidiques qui lui permettront de voler à la recherche d'un hôte nourricier, d'un abri favorable pour son repos et, pour le mâle, d'un partenaire sexuel. Ces déplacements à basse altitude sont de nature linéaire (0,5m environ) sur de courtes périodes (environ 5 secondes) espacées de périodes de repos plus ou moins longues. Les glossines

reconnaissent leur(s) hôte(s) nourricier(s) par des moyens visuels et olfactifs (Chalier *et al.*, 1977 ; Vale, 1980). Bien que les facteurs visuels soient prépondérants (attraction par la forme, la taille, le mouvement et le contraste de couleur), les facteurs olfactifs demeurent très importants car ils potentialisent les stimuli visuels pour la pose et la piqure (Pollock, 1982). Hématophages, les glossines (mâles et femelles) ont une préférence pour les grands mammifères ; cependant, il est à noter qu'en plus des repas sur une grande variété de vertébrés, y compris les reptiles (Njiokou *et al.*, 2004, 2006 ; Simo *et al.*, 2008 ; Farikou *et al.*, 2010), les glossines seraient capables de se nourrir du nectar des fleurs en cas de raréfaction d'hôte(s) (Solano *et al.*, 2015).

Tout comme chez la plupart des insectes, les glossines femelles vivent plus longtemps que les mâles, en général de 5 à 7 mois en conditions naturelles selon l'espèce et parfois jusqu'à 12 mois en conditions de laboratoire. Cette longévité est fortement corrélée aux facteurs climatiques : elle est optimale en saison des pluies (4 à 5 mois), diminue lorsqu'il fait froid (3 à 4 mois) et est particulièrement brève en période de forte chaleur (1 à 2 mois). Les jeunes mouches tsé-tsé sont plus sensibles que les adultes aux variations climatiques et malgré une sexe-ratio proche de 1 à la naissance, les femelles sont généralement plus nombreuses dans les populations en raison de leur plus grande longévité (Penchenier & Laveissière, 2000).

La densité apparente des populations de glossines dépend des facteurs environnementaux biotiques et abiotiques ; elle varie beaucoup d'un lieu à un autre et est principalement liée au taux d'éclosion des pupes et à la longévité des imagos, facteurs qui dépendent eux-mêmes des conditions climatiques et de la disponibilité des hôtes (Penchenier & Laveissière, 2000).

- Cycle de développement (Figure 10)

Les glossines présentent un cycle de développement assez long, qui peut durer de 40 à 100 jours (De La Roque & Cuisance, 2005). L'émergence des femelles survient en moyenne 2 à 3 jours avant celle des mâles ; ce phénomène permet à ces dernières, pour la plupart à jeun, d'atteindre leur pic de production de phéromones et ainsi d'attirer les mâles pour l'accouplement (Vincendeau *et al.*, 1992). Dix-huit jours environ après introduction du spermatophore par le mâle dans l'utérus de la femelle larvipare survient l'émission de la première ponte d'une larve de troisième stade puis presque tous les 10 jours. Cette larve sans se nourrir s'enfouit dans le sol et se transforme en pupa. La pupaison peut durer 20 à 80 jours suivant l'espèce de glossine, la température et l'humidité du sol ; mais en général, elle est en

moyenne de 30 jours (Penchenier & Laveissière, 2000). Après ce temps, l'imago émerge par une déchirure circulaire du puparium, et s'envole à la recherche d'un hôte nourricier. Avant la prise du premier repas de sang, la glossine possède un corps mou car sa cuticule et ses muscles thoraciques ne sont pas encore solidifiés ; elle est alors qualifiée de ténérale (mot qui vient de « tener » qui veut dire tendre).

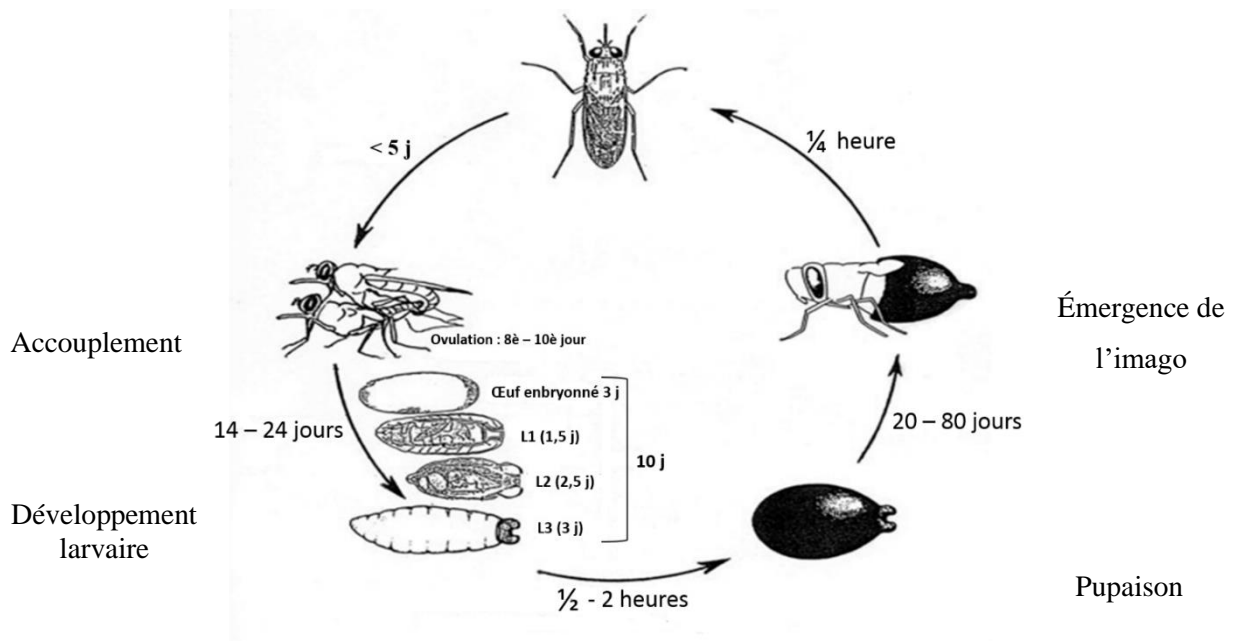


Figure 10 : Cycle de reproduction des glossines

(Cuisance, 1989).

I.3. Contrôle de la transmission des trypanosomoses

I.3.1. Contrôle axé sur les parasites

La difficulté d'établir un diagnostic précoce chez le vertébré durant le stade hémato-lymphatique (phase 1) provient de la faible densité parasitémique circulante, ce qui ne provoque aucun symptôme spécifique chez le sujet atteint ou patient (Dumas & Bouteille, 1996) ; cette faible parasitémie entraîne une absence de réaction lors des tests classiques d'agglutination (Truc *et al.*, 1998; Magnus *et al.*, 1978). Certaines infections dues à des souches de *T. brucei gambiense* produisent des antigènes inhabituels (Dukes *et al.*, 1992) à l'origine de diagnostics faux-négatifs. De plus, les anticorps ciblés par les tests mis en œuvre peuvent persister longtemps après l'élimination du parasite (Diallo *et al.*, 1996) ; l'examen parasitologique, qui

présente l'inconvénient d'être peu sensible pour permettre la détection de l'ensemble des parasitémies, demeure le diagnostic de certitude.

La phase neurologique ne peut qu'être diagnostiquée par un examen microscopique après extraction du suc ganglionnaire par ponction lombaire. Cette ponction est très délicate et douloureuse pour le patient. Le diagnostic de cette phase 2 peut également être réalisé par des analyses de biologie moléculaire, ceci en recherchant des espèces de trypanosomes par amplification des portions bien connues de leur génome (utilisant des couples d'amorces spécifiques).

L'absence de vaccin contre les trypanosomoses africaines fait de la chimiothérapie le seul moyen de lutter contre ces agents pathogènes. Le traitement des patients diffère selon le stade de la maladie : la pentamidine est utilisée pour traiter les malades en phase 1 (forme chronique), et le mélarsoprol en phase 2. Dans le cas de la forme aiguë, la pentamidine et la suramine sont utilisées dans la première phase et le mélarsoprol en deuxième phase (Holmes, 2013). Le mélarsoprol est un dérivé de l'arsenic qui a de nombreux effets indésirables dont le plus grave est l'encéphalopathie réactive observée chez 10% des patients traités dont la moitié, généralement, décède (Kennedy, 2008). Une résistance accrue à ce dernier médicament a été observée dans plusieurs foyers (Holmes *et al.*, 2004). Les difficultés de mise au point de nouveaux médicaments pouvant concilier efficacité et faible coût demeurent. En 2009, un nouveau traitement, combinant le nifurtimox et l'éflornithine, a été mis à la disposition des programmes de lutte des pays endémiques pour la THA, mais il ne donne pas davantage satisfaction (Baker *et al.*, 2013). L'administration de ce traitement est plus simple que celle de l'éflornithine en monothérapie ; malheureusement ce traitement combinant le nifurtimox et l'éflornithine n'est pas efficace contre la trypanosomiase à *T. brucei rhodesiense*. Actuellement, le Fexinidazole est en cours d'utilisation (OMS, 2019).

I.3.2. Contrôle des populations de vecteurs

De nombreuses stratégies de lutte ont été testées depuis des décennies pour éradiquer les glossines. Ces techniques mises en œuvre sont basées sur leurs captures par piégeage, la destruction de leurs réservoirs et habitats ou l'installation de panneaux imbibés de substances insecticides ou répulsives visant à éloigner les vecteurs. La pulvérisation d'insecticides (DDT, endosulfan, dieldrin) à vaste échelle a aussi eu ses heures de gloire ; cette technique a permis l'élimination de *G. morsitans submorsitans*, *G. palpalis palpalis* et *G. tachinoides* sur 200.000

km² de savane dans le nord Nigeria (Jordan, 1986). Cette pratique a cependant d'énormes conséquences sur l'écosystème et favoriserait l'apparition de formes de résistance vis-à-vis des pesticides. Ces dernières années ont vu naître de nouvelles perspectives de lutte qui intègrent le contrôle de la transmission par manipulation génétique du vecteur et/ou de son symbionte (Aksoy *et al.*, 2001).

I.3.3. Stratégies alternatives

La lutte génétique, basée sur la technique des insectes stériles « SIT en anglais », a aussi été implémentée (Abd-Alla *et al.*, 2013 ; Van Den Abbeele *et al.*, 2013 ; Vreysen *et al.*, 2013). Cette technique consiste en la production en masse de mâles rendus stériles par irradiation γ dans des centres spécialisés, suivie de lâchés systématiques dans une zone bien déterminée. La Technique de l'Insecte Stérile vise avant tout à réduire les populations de glossines. Les mâles stériles, après lâchage, vont entrer en compétition avec les mâles sauvages et s'accoupler avec des femelles « naïves » ; c'est le premier accouplement qui est important car cette action n'entraînera aucune fécondation d'ovocyte d'où pas de descendance (Dyck *et al.*, 2005). Le but ultime serait l'éradication des glossines autochtones. L'île de Zanzibar en est le parfait exemple (Vreysen *et al.*, 2000). Néanmoins, l'utilisation de cette technique requiert comme condition *sine qua non* des populations de glossines isolées (Vreysen & Robinson, 2011).

De plus, l'utilisation des symbiontes des glossines comme stratégies alternatives, à l'instar des bactéries du genre *Wolbachia*, permettent d'éradiquer les populations de glossines ceci par réduction au fur et à mesure des densités de ces dernières jusqu'à éradication complète. Les bactéries de ce genre génèrent un certain nombre d'anomalies de la reproduction chez les insectes qui en sont infectés ; parmi lesquelles, le phénomène d'incompatibilité cytoplasmique (Alam *et al.*, 2011). Ce phénomène est à l'origine d'un arrêt du développement de l'embryon de la glossine, de la réduction du nombre de larves puis d'adultes et donc de la population de glossines.

Par ailleurs, la réduction des populations des glossines par lâché massif de mâles stériles ou de glossines infectées par *Wolbachia* spp. entraîne par la même occasion une augmentation du nombre de vecteurs car ces derniers conservent leurs compétences vectorielles. Pour pallier cela, l'addition de trypanocides tels que l'isométymidium chlorure, à 10 mg/ml, au repas de sang avant le lâché des glossines a été testée. Ce traitement minimise la capacité de transmission de

T. brucei brucei et de *T. congolense* par les glossines en laboratoire (Van Den Bossche *et al.*, 2006). Cependant Bouyer (2008) a montré que l'utilisation de ce traitement dans le cadre des campagnes de terrain de « SIT » n'empêche pas complètement la transmission des trypanosomes par les mâles stériles. Dans ce cas, l'utilisation de glossines ayant un phénotype de résistance aux trypanosomes rendrait la technique du « SIT » éthiquement acceptable pour en-tirer parti dans les zones d'endémie des trypanosomoses.

L'approche transgénèse a également été envisagée dans le cadre du contrôle de la transmission des parasites par les arthropodes vecteurs. Elle consiste en l'introduction d'un gène d'intérêt (De Vooght *et al.*, 2012), sous le contrôle d'un promoteur bien défini, dans le génome du vecteur (Caljon *et al.*, 2013). Cette approche a déjà servi pour transformer des lignées germinales de deux espèces de moustiques des genres *Anopheles* et *Aedes* par la technique du transposon (Coates *et al.*, 1998 ; Jasinskiene *et al.*, 1998 ; Nolan *et al.*, 2002). La technique de transgénèse n'est cependant pas applicable sur le long terme aux glossines, du fait de leur viviparité (les embryons et les larves se développent *in utero*), en ceci que le caractère induit chez la glossine ne peut pas être transmis à sa descendance (Hagan, 1951). Pour surmonter cette limite, il serait pratique de se servir des organismes transmis verticalement des parents à leur descendance. C'est dans cette optique que les symbiotes des glossines génétiquement modifiés pourraient tenir lieu d'alternatives pour exprimer des gènes étrangers pouvant interférer avec le développement des trypanosomes et/ou la durée de vie des insectes. Cette méthode de lutte est appelée la paratransgénèse (Aksoy *et al.*, 2008). *Sodalis glossinidius*, symbiote secondaire des glossines, s'est avéré être un candidat intéressant pour le développement de cette technique pour plusieurs raisons : (1) il est cultivable *in vitro* et donc adapté à la manipulation génétique ; (2) il peut être réintroduit dans les glossines ; (3) dans l'intestin de ces insectes, ce symbiote réside à proximité étroite des trypanosomes qui sont donc exposés directement à ses protéines effectrices ; (4) il est transmis verticalement à la descendance de la glossine et peut transmettre le caractère manipulé d'une génération de vecteur à une autre ; (5) en raison d'une érosion à large échelle de son génome, il dépend de la glossine au niveau métabolique, ce qui suggère ainsi que c'est un bon candidat pour les expériences de para-transgénèse.

L'objectif final du projet dans lequel s'insère cette thèse est le développement de glossines résistantes à l'infection par les trypanosomes ; ce qui pourrait permettre après d'autres études une production en masse et une dissémination de ces dernières dans des régions endémiques en

vue d'éliminer la THA et la TAA. La réussite d'une telle méthode de contrôle nécessite de disposer des effecteurs adéquats pouvant conférer le caractère résistant à l'infection des glossines.

I.4. Interactions glossines-trypanosomes

I.4.1. Généralités

Le cycle des trypanosomes passe chez la glossine par deux étapes clés : l'installation du parasite dans l'intestin de l'insecte suivie par la phase de maturation durant laquelle les formes parasitaires migrent dans les pièces buccales (*T. congolense*) ou dans les glandes salivaires (*T. brucei*) pour donner les formes infectantes (Roditi & Clayton, 1999). Les parasites ingérés avec le repas sanguin subissent, dans l'intestin moyen de la glossine, l'action des enzymes protéolytiques sécrétées par les cellules intestinales (Gibson & Bailey, 2003 ; Dyer *et al.*, 2013). Peu de parasites arrivent à surmonter cette étape. Dans la plupart des cas, 99% des parasites ingérés par le vecteur sont éliminés en phase initiale de leur développement, dans les parties antérieure et postérieure de l'intestin moyen de la glossine ; les formes longues (formes sanguicoles « long slender ») sont détruites plus rapidement que les formes courtes ou formes sanguicoles « short stumpy » (Van Den Abbeele *et al.*, 1999 ; Walshe *et al.*, 2009). Parmi les formes courtes, certaines parviennent à survivre et à se différencier en formes procycliques (Van Den Abbeele *et al.*, 1999). Au bout de deux à quatre heures, les formes procycliques commencent à se multiplier de manière exponentielle. Chez *T. brucei*, l'infection réussie se traduit par l'invasion de l'espace ectopéritrophique en contournant ou en traversant directement la membrane péritrophique. Les parasites subissent le processus de maturation après la migration dans les glandes salivaires de la glossine ; ils s'y différencient en formes métacycliques infectantes, recouvertes par un manteau de « VSG ». Ces formes métacycliques seront inoculées au cours du repas sanguin ultérieur de la glossine. L'acquisition du parasite est une condition nécessaire mais non suffisante pour assurer son évolution chez à un hôte en aval. En effet, à chacune des étapes de leur développement chez la glossine, les différentes formes de trypanosomes font face à divers obstacles qui compromettent leur survie (Figure 11). De manière générale, les glossines sont naturellement résistantes à l'infection aux trypanosomes (Welburn & Maudlin, 1999). Il est rare de trouver, sur le terrain, des glossines qui présentent des infections matures dans les glandes salivaires ou dans les pièces buccales, malgré la forte incidence de la maladie en Afrique sub-saharienne. Les taux d'infection des glossines n'excèdent guère 15% (Haines, 2013). La compétence vectorielle de la glossine dépend de

plusieurs facteurs dont ceux liés aux interactions entre les symbiontes, la glossine et le trypanosome. Ces différents facteurs peuvent être classés en deux catégories : les facteurs extrinsèques et les facteurs intrinsèques.

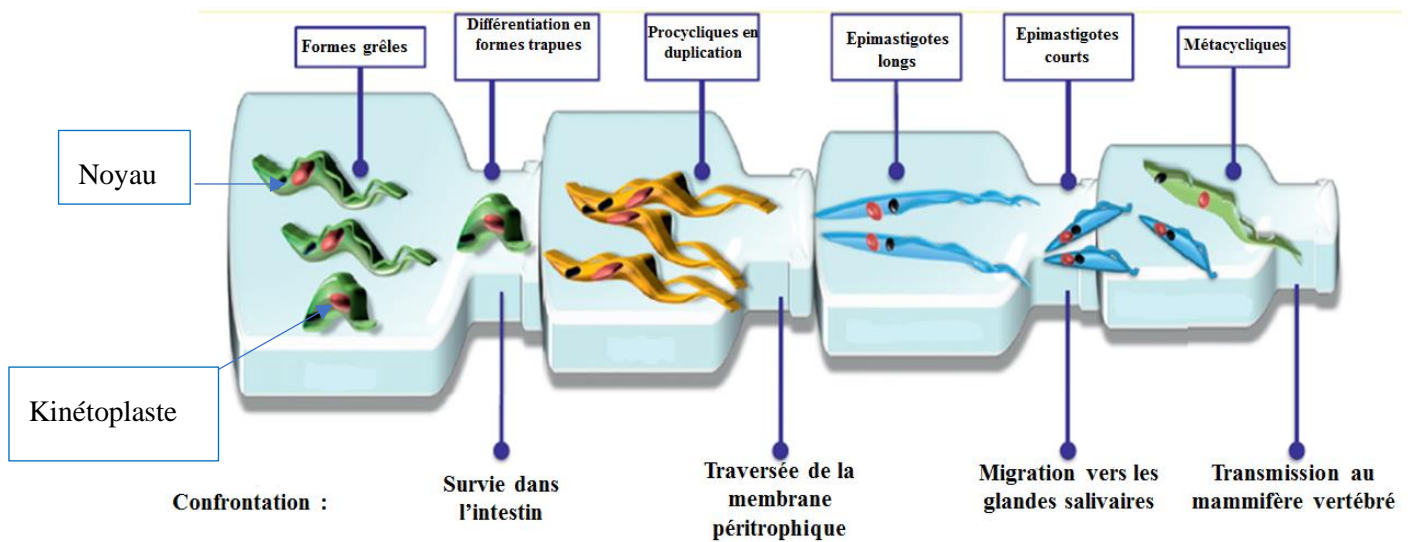


Figure 11 : Principaux goulets d'étranglement affectant la transmission de *Trypanosoma brucei* par la mouche tsé-tsé (Dyer *et al.*, 2013).

I.4.2. Facteurs extrinsèques influençant les interactions glossines-trypanosomes

Ils sont nombreux ; nous n'en détaillerons que les principaux dans cette section.

I.4.2.1. Température

La température fait partie des facteurs environnementaux qui influent le plus sur le développement des glossines et leur rôle dans la transmission des trypanosomes. Des études ont montré l'existence d'une corrélation positive entre la sensibilité des glossines à l'infection et la température de leur maintien en laboratoire. Il a été démontré que des glossines appartenant à l'espèce *G. morsitans*, qui émergent des pupes incubées à 30°C, génèrent des taux d'infection à *T. b. rhodesiense* (Burtt, 1946) ou à *T. congolense* (Ndegwa *et al.*, 1992) plus élevés que ceux des insectes issus de pupes incubées à des températures de 23 à 25°C. Sur le terrain, il existe une corrélation positive entre l'augmentation dans certaines limites de la température

atmosphérique moyenne annuelle et l'augmentation du taux d'infection des glossines collectées (Ford & Leggate, 1961). D'autres études soutiennent que l'exposition des glossines à une température basse de (0 à 5°C) après la prise du repas infectant impacte positivement le taux d'infection de l'intestin mais pas le taux d'infection mature des glossines mâles (Otieno *et al.*, 1983). Pour MacLEOD *et al.* (2007), une brève réfrigération n'aurait pas d'effet sur le taux d'infection de l'intestin mais augmenterait le taux de maturation parasitaire uniquement chez les femelles. Ces divergences montrent qu'en définitive, l'effet de la température sur la sensibilité des glossines au parasite reste un facteur assez mal connu ; on s'accorde néanmoins sur le fait qu'elle exerce une influence certaine sur l'infection causée par les trypanosomes et sur la compétence vectorielle des glossines.

I.4.2.2. Repas de sang pris sur l'hôte vertébré

L'origine du repas de sang infectant influe sur la différenciation (Nguu *et al.*, 1996) et la multiplication des trypanosomes dans l'intestin de la glossine (Olubayo *et al.*, 1994 ; Mihok *et al.*, 1995). Olubayo *et al.* (1994) ont aussi démontré que le sang de chèvre favorisait, plus que celui du buffle, l'établissement de *T. congolense* chez *G. morsitans morsitans*. Cette différence serait perceptible jusqu'à 3 jours après le repas infectant et indépendamment de la nature et de l'origine du repas d'entretien. Pour certains auteurs, l'origine du repas d'entretien consécutif à l'infection aurait un impact sur le devenir des parasites dans l'intestin. Cette hypothèse pourrait se justifier chez *T. brucei* qui met au minimum 8 jours avant de migrer vers les glandes salivaires. Les glossines se nourrissent généralement une fois, toutes les 24-48h. Dans ces conditions l'installation de *T. brucei* dans l'intestin d'une glossine pourrait coïncider avec la digestion de 3 à 4 repas de sang d'origines différentes. Il a été démontré que le sérum du sang contient des fractions à effets trypanocides (Reduth *et al.*, 1994 ; Muranjan *et al.*, 1997). Muranjan *et al.* (1997) ont aussi estimé que la première cause du phénomène d'attrition, observé dans le cas de *T. brucei brucei* chez la glossine, serait liée à l'inhibition de la glycolyse par le peroxyde d'hydrogène produit par la xanthine oxydase présente dans le sérum. Toutefois, l'effet de la xanthine ne semble pas expliquer à lui seul ce caractère trypanocide car des études menées auparavant sur du sang provenant d'autres mammifères contenant de la xanthine oxydase ont été peu convaincantes. Reduth *et al.* (1994) et Black *et al.* (1999) ont par la suite avancé que le complément contiendrait aussi des fractions thermolabiles qui pourraient jouer un rôle dans la mortalité des trypanosomes intestinaux.

I.4.2.3. Génotype du trypanosome

Les différents trypanosomes réagissent de façon variable à l'environnement hostile du tractus digestif de l'insecte vecteur. Certaines espèces ou sous-espèces de trypanosomes ont la capacité de faciliter leur installation en inhibant partiellement les enzymes protéolytiques de l'intestin de la glossine. Cette propriété a été mise au jour *in-vitro* chez *T. brucei brucei* (Imbuga *et al.*, 1992). Il est de plus connu que *T. brucei brucei* produit des taux d'infection, de l'intestin moyen et des glandes salivaires, supérieurs à ceux de *T. brucei rhodesiense* (Welburn *et al.*, 1995).

I.4.3. Facteurs intrinsèques influençant les interactions glossines-trypanosomes

I.4.3.1. Sexe

Les glossines des deux sexes se nourrissant de sang, elles peuvent s'infecter suite à un repas pris sur un hôte infecté. Les glossines femelles présentent des taux de protéases digestives supérieurs à ceux des spécimens mâles (Gooding, 1977). Cependant, si certaines études ont indiqué que les femelles présentent des taux d'infection de l'intestin moyen plus élevés (Mwangelwa *et al.*, 1987 ; Mihok *et al.*, 1992), d'autres soulignent que les taux d'infection mature des mâles sont supérieurs à ceux des femelles (Welburn & Maudlin, 1991 ; Dale *et al.*, 1995). L'influence du sexe des glossines sur la compétence vectorielle demeure sujette à controverses. Kazadi *et al.* (1991) n'ont trouvé aucune différence significative de taux d'infection entre les insectes des deux sexes infectés en laboratoire. Le fait que les femelles vivent plus longtemps que les mâles leur donnent plus de possibilités de se nourrir sur un hôte infecté et de pouvoir permettre l'accomplissement du cycle des trypanosomes.

I.4.3.2. Âge de la glossine à la prise du premier repas et rôle de la membrane péritrophique

De nombreux chercheurs se sont penchés sur ce sujet ; Van Hoof *et al.* (1937) avaient observé que les glossines de la sous-espèce *G. fuscipes fuscipes*, nouvellement émergées, étaient plus sensibles à l'infection par *T. brucei gambiense* lors d'un premier repas infectant. Ce résultat a été confirmé chez *G. palpalis palpalis* Wijers (1958). Welburn & Maudlin (1992) ont aussi admis que les glossines n'ayant ingéré aucun repas de sang après leur éclosion sont

plus sensibles à l'infection par *Trypanosoma brucei* spp. que les glossines plus âgées. Cette idée a été confirmée chez les glossines ténérales d'autres espèces infectées par *T. congolense* (Kazadi *et al.*, 1991). Toutefois, pour certaines combinaisons d'espèces de glossines et de trypanosomes cette relation n'est pas clairement établie (Moloo *et al.*, 1994). De fait, plusieurs auteurs ont basé leur hypothèse sur le rôle de la membrane péritrophique, qui sépare la lumière intestinale en deux compartiments : un espace endopéritrophique contenant le repas de sang et un espace ectopéritrophique situé entre la membrane et l'intestin moyen. Cette membrane péritrophique est composée de chitine, de glycosaminoglycanes, de péritrophine et d'autres glycoprotéines (Hegedus *et al.*, 2009). Sa chitination augmente avec l'âge de l'individu. Pour atteindre l'intestin moyen, les trypanosomes doivent d'abord franchir cette membrane qui constitue une barrière physique pour eux et jouent un rôle de limitation ; seuls quelques parasites traversent cette membrane (Harmsen, 1973). La sensibilité accrue des glossines ténérales à l'infection par les trypanosomes serait due à la fluidité de cette membrane. Un premier repas infectant permettrait aux trypanosomes un accès facile pour poursuivre leur évolution dans l'espace ectopéritrophique (Lehane *et al.*, 1996).

I.4.3.3. Longévité de la glossine

Le développement du trypanosome chez son hôte vecteur dure 15 à 45 jours selon l'espèce. *Trypanosoma brucei* met en moyenne 20 à 30 jours pour arriver à maturité (Kazadi *et al.*, 2000). Dans ces conditions, seules les glossines qui parviennent à vivre suffisamment longtemps peuvent développer une infection mature et jouer un rôle dans la transmission des trypanosomes.

I.4.3.4. Taxons de glossine

La sensibilité des glossines à l'infection par les trypanosomes dépend de la combinaison "espèce de glossine- espèce de trypanosome". À âge égal, les glossines femelles de la sous-espèce *G. palpalis palpalis* ont une sensibilité à *T. brucei brucei* plus élevée que celle de la sous-espèce *G. morsitans morsitans* (Walshe *et al.*, 2009). De manière générale, on estime que les glossines du groupe *morsitans*, exception faite de *G. austeni*, sont plus compétentes que toutes les autres espèces. Celles du groupe *palpalis* sont décrites comme ayant une faible compétence vectorielle (Ndegwa *et al.*, 1992), même si elles jouent une part importante dans la transmission des trypanosomes chez l'homme, cas de la transmission de *T. brucei gambiense* (Gouteux *et al.*, 1993). La variation de la sensibilité des glossines aux trypanosomes a aussi été

observée chez les glossines élevées en laboratoire (Baker *et al.*, 1990; Maudlin *et al.*, 1990). Welburn *et al.* (1994) ont obtenu chez *G. morsitans morsitans* un taux d'infection de 100% par une souche de *T. congolense*, tandis qu'avec le même stock de trypanosomes, on enregistre rarement des taux d'infection aussi élevés chez *G. palpalis palpalis*. Une des réponses de la glossine à l'invasion par les trypanosomes est l'agglutination des parasites ; cette réaction peut aussi être fonction de l'espèce de vecteur. Chez *G. palpalis palpalis*, 50% des trypanosomes de la sous-espèce *T. brucei rhodesiense* ont été agglutinés et tués 60h après leur ingestion alors que chez *G. morsitans morsitans* ce taux de mortalité du même parasite n'est atteint que 170h après ingestion (Welburn *et al.*, 1989).

I.4.3.5. Génotype de la glossine

Les bases génétiques de la compétence vectorielle sont mal connues. Gooding & Mooloo (1994) ont montré que malgré l'existence d'une variabilité génétique entre les différentes souches de *G. morsitans morsitans*, cette variabilité n'a aucun effet significatif sur leur sensibilité à *T. congolense*, contrairement aux souches de *G. pallidipes* (Mooloo, 1993). Lorsque des souches de *G. morsitans morsitans* sensibles à *T. congolense* ont été croisées avec celles résistantes de la même sous-espèce, il a été remarqué que le phénotype sensible ou résistant des parents de sexe masculin n'affectait pas la progéniture. On en a déduit que la sensibilité des glossines serait due à un facteur extra-chromosomique transmis par les femelles à leur progéniture (Maudlin, 1982). Ce facteur extra-chromosomique est apparu représenté par les « RLOs » (« *Rickettsia* Like Organisms ») présents dans l'intestin de la glossine (Maudlin & Ellis, 1985). Par la suite, Welburn & Maudlin (1991) ont établi, pour la première fois, que les glossines présentant des fortes densités de « RLOs » étaient plus sensibles à l'infection. On sait désormais que ces « RLOs » sont en réalité le symbionte secondaire de la glossine, *S. glossinidius*, dont la présence chez l'insecte vecteur augmente sa sensibilité à l'infection (Farikou *et al.*, 2010a).

I.4.3.6. Fréquence des repas

Le statut nutritionnel de la glossine lors de la prise de son premier repas infestant influe considérablement sur sa compétence vectorielle (Kubi *et al.*, 2006). En effet, une période de jeûne plus ou moins longue, soit 3 à 4 jours pour les adultes, entraîne une baisse de l'hostilité de l'intestin vis-à-vis des trypanosomes. Cette donnée suggère que les facteurs physiologiques mis en jeu dans l'établissement de la barrière aux trypanosomes se trouvent supprimés ou

diminués en cas de stress nutritionnel. Chez la glossine, un repas de sang infecté déclenche la synthèse de peptides antimicrobiens par le système immunitaire de l'insecte (Boulanger *et al.*, 2002). Les tissus adipeux de la glossine représentent ses réserves énergétiques, la clé du métabolisme et du contrôle biochimique de la réponse immunitaire innée. Le déclenchement de la machinerie de défense entraîne une importante dépense d'énergie. Ainsi, lorsque la glossine est exposée à un stress nutritionnel d'un niveau qui puisse engendrer l'appauvrissement de cette réserve, la conséquence est la diminution de l'hostilité de l'environnement intestinal aux trypanosomes ingérés, notamment par la baisse de la sécrétion de lectines (Welburn & Maudlin, 1992), et la baisse des niveaux de peptides de type attacine et cécropine, ce qui peut contribuer à une sensibilité accrue aux trypanosomes (Akoda *et al.*, 2009).

I.4.3.7. Rôle des protéases intestinales

Les glossines ont une alimentation majoritairement constitué de sang des mammifères ; elles tirent la majorité de leurs ressources par dégradation des protéines du sang. La digestion du repas de sang est assurée par un répertoire d'enzymes protéolytiques, une chymotrypsine et des trypsines apparentées (« trypsines-like ») localisées dans la partie postérieure de l'intestin où a lieu la digestion (Yan *et al.*, 2001). Ces enzymes ont une action destructrice sur les trypanosomes intestinaux comme chez d'autres vecteurs. Les trypanosomes ingérés via le repas de sang sont alors exposés à un environnement physiologiquement hostile et seuls quelques spécimens y survivent et maintiennent l'infection. Paradoxalement, Mihok *et al.*, (1992) ont montré que les glossines infectées et non infectées ne présentent pas de taux de protéases différents. Le vrai rôle des protéases intestinales dans les interactions glossines-trypanosomes demeure mal connu. Cependant, elles semblent faire partie des facteurs qui contribuent à l'élimination des formes sanguicoles longues (« long slender ») et à l'induction de la transformation des formes sanguicoles courtes (« short stumpy ») en formes procycliques (Hunt *et al.*, 1994 ; Abubakar *et al.*, 2006).

I.4.3.8. Rôle des lectines intestinales

Les lectines sont des agglutinines sécrétées par les cellules de l'intestin moyen probablement en réponse au sang ingéré et/ou à l'infection par des trypanosomes. Elles seraient des glycoprotéines d'origine non immune, spécifiques pour certaines configurations de carbohydrates. Des études ont montré qu'un repas de sang infecté dépourvu de sérum réduisait le taux d'infection dans l'intestin (Gingrich *et al.*, 1982 ; Maudlin *et al.*, 1984). Ces auteurs ont

conclu que le sérum serait l'inducteur de la sécrétion des lectines qui représenteraient la première ligne de défense des glossines contre les trypanosomes (Maudlin & Welburn, 1987 ; Welburn & Maudlin, 1997). Elles sont inhibées par des sucres de type D + glucosamine qui, ajoutés au repas de sang, augmenteraient le taux d'infection à plus de 90% chez les glossines ténérales (Maudlin & Welburn, 1987). L'augmentation du taux d'infection induite par l'ajout de sucres inhibiteurs de lectines est fonction de l'espèce de glossine et de trypanosome. Le taux d'infection de l'intestin de *G. morsitans morsitans* par *T. congolense* est supérieur à celui obtenu chez *G. palpalis palpalis* ou *G. pallidipes* infecté par *T. brucei rhodesiense* (Welburn *et al.*, 1994). L'ajout d'antioxydants tels que l'acide ascorbique, l'acide urique, le glutathion et le N-acétyl-cystéine au repas de sang augmenterait le taux d'infection de *G. morsitans morsitans* par *T. brucei brucei* (MacLEOD *et al.*, 2007). L'induction de la migration des trypanosomes de l'intestin vers les glandes salivaires semble cependant nécessiter la présence des signaux de type oxyde nitrique et L-cystéine (Macleod *et al.*, 2007).

I.4.3.9. Rôle de la protéine EP des glossines

Chandra *et al.*, (2004) ont caractérisé, dans l'intestin de la glossine, la présence d'une protéine EP formée par l'enchaînement de 59 unités d'acide glutamique et de proline. Cette protéine serait identique à la protéine EP présente sur la membrane des formes procycliques des trypanosomes et serait surexprimée chez les glossines infectées par des bactéries (Haines *et al.*, 2005) ou par les trypanosomes (Haines, 2009). L'inhibition de l'expression du gène de la protéine EP des glossines par « RNA interférent » (« RNAi ») favoriserait l'installation des trypanosomes dans l'intestin du vecteur (Haines *et al.*, 2010). On observe que les glossines ténérales ainsi que les glossines aposymbiotiques présentent des taux de la protéine EP inférieurs à ceux des glossines adultes (Weiss *et al.*, 2013).

I.4.3.10. Rôle du système immunitaire de la glossine

Le système immunitaire des insectes repose sur une batterie de mécanismes de réponse allant de la phagocytose à l'activation des cascades protéolytiques (coagulation et mélanisation) auxquelles s'ajoute la production de peptides antimicrobiens (Barillas-Mury *et al.*, 2000; Dimopoulos *et al.*, 2001). La réponse humorale innée de la glossine et des insectes en général repose sur deux voies : la voie d'immunodéfiance (IMD) et la voie Toll (Lehane *et al.*, 2003). Les voies Toll et IMD répondent aux différentes catégories de microbes et sont exprimées différemment dans divers tissus de l'insecte (De Gregorio, 2002). La voie IMD est

principalement impliquée dans la régulation des réponses immunitaires épithéliales et est plus fortement activée par des infections des bactéries Gram négatif. La voie Toll intervient dans les réponses immunitaires systémiques et est activée par la plupart des infections fongiques et par des bactéries Gram positives (Hu & Aksoy, 2005). La réponse épithéliale semble être la plus impliquée dans l'élimination des trypanosomes procycliques, qui s'établissent dans l'intestin de la glossine à proximité des cellules épithéliales de l'hôte (Dyer *et al.*, 2013). Le proventricule est impliqué dans la production d'espèces d'oxygène réactif, telles que le NO et le H₂O₂, qui serviraient de signaux immunologiques assurant la communication entre les différents compartiments chez la glossine mais aussi servant de signal pour la production de peptides antimicrobiens (AMPs) par les corps gras (Hao *et al.*, 2001). L'activité de l'enzyme "Nitric oxyde synthase" est directement corrélée à la production d'oxyde nitrique qui a un effet trypanocide (Bogdan, 2001).

Le rôle des AMPs dans l'inhibition de l'établissement des trypanosomes chez la glossine a été mis en exergue lors des études menées sur l'attacine, la defensine, la cécropine et la diptericine. Des niveaux initiaux élevés de transcrits d'attacine ont été observés dans le proventricule et l'intestin des espèces de glossines résistantes. Ces niveaux augmentent considérablement dans les corps gras 6 heures après le repas infectant des glossines (Nayduch & Aksoy, 2007). Hu & Aksoy (2005) ont également montré que ce peptide est plus actif et efficace contre les trypanosomes lorsqu'il est introduit dans le repas de sang infectant et administré tôt avant l'établissement des parasites. Ainsi, il est plus facile de réduire de façon significative les taux d'infection chez des glossines ténérales (0%) et des glossines âgées (12%). En revanche, lorsque les glossines sont déjà infectées, l'administration de ces peptides n'entraîne qu'une réduction de 50% des taux d'infection. La réponse immune chez la glossine est spécifique car elle établit une différence entre les bactéries et les trypanosomes et entre les formes sanguicoles et procycliques des trypanosomes. En effet, les trypanosomes de forme sanguicole ne stimulent pas la production d'attacine et de defensine (Hu et Aksoy, 2005) ; la transcription de ces peptides se met en place à partir du moment où les formes sanguicoles se différencient en forme procycliques. Chez les glossines qui développent l'infection, la transcription des gènes des peptides antimicrobiens, attacine et défensine, induite par les formes procycliques, reste élevée pendant une vingtaine de jours. Ce niveau diminuerait chez les glossines qui ont éliminé le parasite (Hao *et al.*, 2001). Pour Hu et Aksoy (2005), le retard observé dans le déclenchement de l'immunité innée pourrait également expliquer son manque d'efficacité vis-à-vis des trypanosomes. La spécificité de la réponse immunitaire envers les

formes de trypanosomes sanguicoles comparées aux formes procycliques pourrait également s'expliquer par les différences au niveau de leur revêtement de surface. En effet, les formes sanguicoles sont recouvertes de VSG alors que la procycline est présente chez les formes procycliques (Hao *et al.*, 2001). Pour Lehane *et al.*, (2004), l'inefficacité de la réponse immunitaire innée viendrait du fait que les AMPs sont excrétées dans l'hémolymphe et ne traverseraient pas la paroi intestinale pour atteindre l'espace ectopéritrophique où s'établissent les trypanosomes. Il existe, certes, des preuves de l'action trypanocide des « AMPs » *in vitro*, mais leur mode d'action dans l'inhibition du développement des trypanosomes *in vivo* semble difficile à prouver.

I.4.3.11. Rôle des récepteurs de peptidoglycane (« PGRP »)

La PGRP est une protéine spécialement exprimée dans le bactériome et les glandes lactées de la glossine. Elle intervient dans la détection et le clivage des peptidoglycans bactériens et également dans la détection et l'élimination des trypanosomes dans l'intestin (Wang *et al.*, 2009). La PGRP piège le peptidoglycane bactérien puis agit sur l'immunité de la glossine en bloquant la synthèse de peptides antimicrobiens ; l'inhibition de son expression induit une hypersensibilité dans la réponse immunitaire et une forte expression d'attacine. Comme on le verra plus loin, le symbiote primaire, *Wigglesworthia glossinidia*, qui réside dans le bactériome semble contrôler l'expression de la protéine PGRP pour se protéger contre le système immunitaire de l'hôte (Wang *et al.*, 2009).

I.4.3.12. Rôle des symbiotes dans la compétence vectorielle

Les micro-organismes endosymbiotiques jouent un rôle vital dans les processus métaboliques de l'hôte, dans sa fécondité et dans le développement du système immunitaire (Douglas, 2011). Ces symbiotes sont dans leur large majorité représentés par des bactéries, qui apportent à leurs hôtes les compléments nutritionnels absents de leur alimentation et qu'ils ne sont pas en mesure de synthétiser. Les glossines hébergent trois microorganismes symbiotiques transmis verticalement par les femelles à toutes leurs descendances lors de la vie intra-utérine des larves (Figure 12). *Wigglesworthia glossinidia* est le symbiote primaire de la glossine. Il fait partie de la famille des Entérobactéries, classe des γ -protéobactéries. C'est une bactérie intracellulaire qui vit dans les cellules spécialisées (les bactériocytes) et forme le bactériome dans la partie antérieure de l'intestin des glossines (Pais *et al.*, 2008 ; Balmand *et al.*, 2013). *Wigglesworthia glossinidia* intervient dans l'approvisionnement en certaines

vitamines et en métabolites comme la biotine, le thiazole, l'acide lipoïque, le FAD (riboflavine, B2), l'acide folique, le pantothénate, la thiamine (B1), la pyridoxine (B6), le protohème, et le nicotinamide, qui sont manquantes ou présentes en faibles quantités dans le régime alimentaire sanguicole des glossines. La caractérisation phylogénétique des bactéries de ce genre à partir de quatre groupes de glossines (*fusca*, *morsitans*, *palpalis* et *austeni*) a mis en évidence une longue histoire évolutive de 50 à 80 millions d'années entre ce genre symbiotique et ses hôtes respectifs. La présence de *Wigglesworthia* spp. est essentielle pour la reproduction des glossines car son élimination par des antibiotiques (tétracycline ou rifampicine) rend les femelles stériles (Aksoy, 2003). L'administration aux glossines d'un cocktail de vitamines en même temps que des antibiotiques semble compenser son absence et restaurer la fertilité des glossines. Le rôle de *Wigglesworthia* spp. va au-delà du simple apport nutritionnel. Ces symbiontes doivent être présents durant les stades larvaires immatures des glossines afin que leur système immunitaire se développe et devienne fonctionnel à l'âge adulte (Weiss *et al.*, 2011). En effet, il a été montré que des glossines de la sous-espèce *G. morsitans morsitans*, dépourvues du symbionte, étaient fortement immunodéprimées par rapport à leurs homologues de type sauvage (Weiss *et al.*, 2011). Mise en présence de trypanosomes, un certain pourcentage de glossines dépourvues de symbionte développent des infections intestinales alors que celles possédant le symbionte se révèlent hautement résistantes à l'infection et éliminent efficacement le parasite (Pais *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009). L'implication de *Wigglesworthia* spp. dans la compétence vectorielle des glossines est cependant complexe. Des analyses des gènes de *Wigglesworthia glossinidia*, issus de *G. morsitans morsitans* et de *G. brevipalpis*, ont révélé des capacités métaboliques distinctes concernant la disponibilité d'une voie de synthèse du shikimate (Rio *et al.*, 2012). Ces investigations suggèrent que les différences observées au niveau des génomes des symbiontes chez les deux taxons de glossines contribuent aux différences observées dans la synthèse du chorismate, phénylalanine et du folate. Ceci pourrait expliquer la plus grande compétence vectorielle de *G. morsitans morsitans* dont le symbionte synthétise ces composés, comparée à celle de *G. brevipalpis*. En effet, les trypanosomes africains sont auxotrophes pour la phénylalanine et le folate. Leur génome code cependant les transporteurs pour le folate et le chorismate qui permettent au parasite de récupérer ces molécules chez la glossine.

Sodalis glossinidius est un symbionte secondaire de la glossine, il appartient à la famille des Enterobacteriaceae, classe des γ -protéobactéries, et est phylogénétiquement proche d'*Escherichia coli* et de *Salmonella* sp. (Aksoy *et al.*, 2003). *Sodalis glossinidius* a un large tropisme dans l'organisme ; il est localisé à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Il

est principalement rencontré dans les tissus de l'intestin mais peut être retrouvé à l'état libre dans l'hémolymphe, certains muscles, les glandes lactées ainsi que dans les glandes salivaires de certaines espèces de glossines (Cheng & Aksoy, 1999). *Sodalis glossinidius* serait impliqué dans la sensibilité des glossines à l'infection trypanosomienne (Geiger *et al.*, 2005, 2007 ; Farikou *et al.*, 2010a). Le mécanisme par lequel *Sodalis glossinidius* agit sur la compétence vectorielle n'est pas clairement élucidé. Cependant, Dale & Welburn (2001) ont constaté une diminution du taux d'infection par *T. brucei rhodesiense* lors de l'élimination du symbiote secondaire chez la glossine. Selon Welburn & Maudlin (1999), le symbiote secondaire agirait sur la compétence vectorielle en réduisant l'activité des lectines via la production d'un sucre inhibiteur, le N-acétylglucosamine. Ce sucre, qui résulte de l'hydrolyse de la chitine de la puppe de la glossine par l'endochitinase de *S. glossinidius*, est utilisé comme principale source de carbone nécessaire à la vie *in vivo* de la bactérie. Ce sucre a également le pouvoir de bloquer l'action létale de la lectine sur la forme procyclique des trypanosomes (Dale & Maudlin, 1999) ; il réduit de ce fait l'hostilité de l'intestin de la glossine vis-à-vis des trypanosomes.

A ces deux symbiotes s'ajoute une bactérie parasite du genre *Wolbachia* Hertig, 1936, transmise verticalement par la glossine à sa descendance. Le genre *Wolbachia* fait partie de la famille des Rickettsies et de la classe des α -protéobactéries. Il est présent dans les tissus de l'ovaire de la glossine. Ce taxon bactérien a été plusieurs fois décrit comme responsable des troubles de la reproduction chez les insectes infectés par lui. Le trouble le plus important est l'incompatibilité cytoplasmique (IC) qui entraîne une mort précoce des embryons de glossines infectés (Alam *et al.*, 2011). La prévalence des infections à *Wolbachia* est élevée dans les colonies de glossines élevées en laboratoire (Cheng *et al.*, 2000). En revanche, la prévalence de ces bactéries dans les populations de terrain est très variable et certaines espèces de glossines en sont très peu ou pas infectées (Doudoumis *et al.*, 2013 ; Symula *et al.*, 2013). Des gènes de *Wolbachia* sp. ont été transférés horizontalement dans le génome des glossines (Doudoumis *et al.*, 2013) ce qui suggère l'existence d'une coévolution entre *Wolbachia* sp. et certaines espèces de glossines. Récemment, il a été montré que la présence de *Wolbachia* sp. chez les insectes pouvait prévenir l'infection par les trypanosomes. Des taux de prévalence de *Wolbachia* sp. élevés dans les populations naturelles de glossines pourraient indiquer une diminution du risque d'infection par les trypanosomes. Chez *Aedes* sp., la présence de *Wolbachia* sp. diminue la sensibilité à l'infection par le virus de la dengue (Moreira *et al.*, 2009). Les phénotypes de résistance des hôtes associés aux infections par *Wolbachia* sp. pourraient donc être exploités dans le cadre de nouvelles méthodes de lutte appliquées aux glossines, afin de prévenir leur

infection par les trypanosomes. A l'évidence, la diversité du microbiome et les interactions hôte-microbiome pourraient affecter la compétence vectorielle des insectes. En plus des trois symbiontes décrits ci-dessus, d'autres bactéries colonisent le système digestif des glossines, par exemple une nouvelle espèce bactérienne du genre *Serratia* a été décrite et nommée *Serratia glossinae* (Geiger *et al.*, 2010) ; toutefois, son implication dans la compétence vectorielle des glossines n'a pas encore été clairement démontrée.

Le rôle de ces bactéries chez la glossine reste à élucider. Depuis la découverte du rôle de *Sodalis glossinidius* dans la sensibilité à l'infection trypanosomienne, l'étude de la flore bactérienne revêt un intérêt majeur.

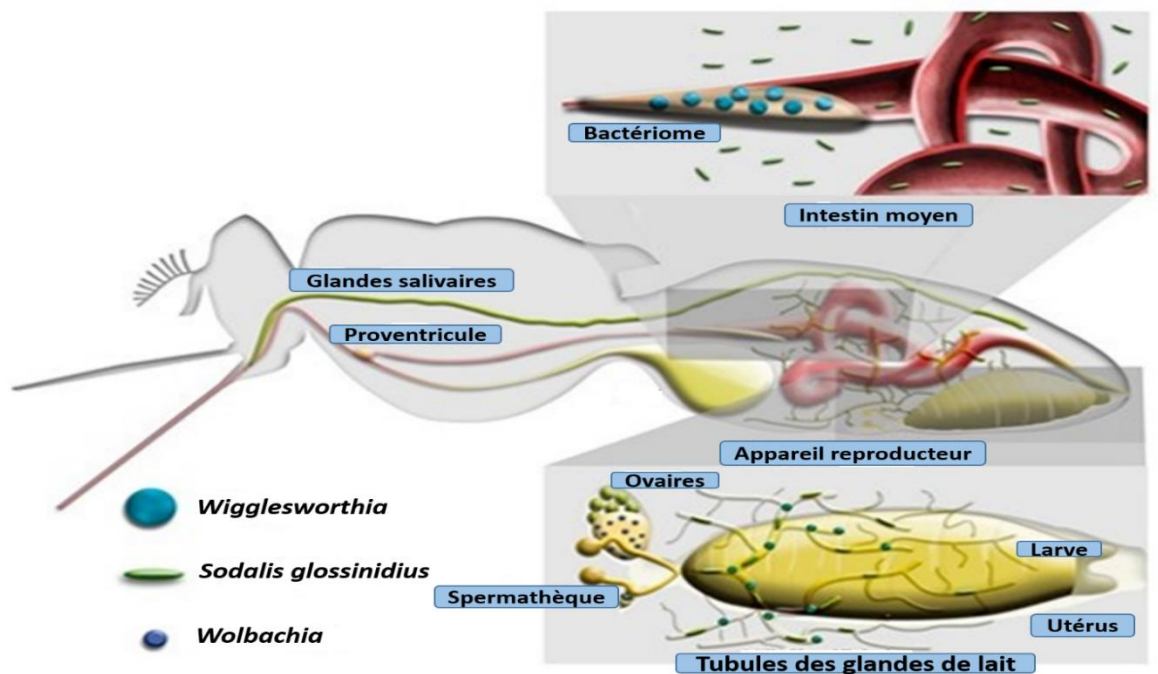


Figure 12 : Localisation des symbiontes dans l'intestin de la glossine

(Source : <http://publichealth.yale.edu/emd/research/ntd/Tsetse/index.aspx>, consulté le lundi 11 juin 2018).

CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATERIEL ET METHODES

II.1. Cadre géographique

Cette étude a été menée dans la localité de Campo, un des foyers actifs de la Trypanosomose Humaine Africaine (THA) et de Trypanosomose Animale Africaine (TAA) au Cameroun. Au Cameroun, cinq localités (Bipindi, Campo, Fontem, Manfé et Doumé) sont suspectées comme étant des foyers de THA encore actifs. Néanmoins, les foyers de Bipindi, Campo et Fontem sont les seuls qui présentent des cas depuis les années 2000 (PNLTHA, inédit). Cependant, Mbida Mbida (2006) a relevé une spécificité de la localité de Doumé qui, contrairement aux autres, hébergeait une autre espèce vectrice de trypanosomose (*Glossina fuscipes*). Ces différentes observations ont orienté notre choix vers Campo, site dans lequel on note une récurrence des cas de maladie de sommeil et où on retrouve *Glossina palpalis palpalis*.

Bordé par l'embouchure du fleuve Ntem (Figure 13) et l'Océan Atlantique, le foyer de Campo est situé à la frontière Cameroun-Guinée Equatoriale. C'est un bassin sédimentaire dont le terrain est accidenté avec un sol ferrallitique jaune. Cette localité est hydromorphe et peu fertile (Letouzey, 1985). Le climat qui y règne est de type équatorial maritime à quatre saisons (deux saisons sèches et deux saisons de pluies). Ayant pour durées respectives 3 et 2 mois, les saisons sèches s'étalent de décembre à février pour la grande et de juillet à août pour la petite. Les saisons de pluies quant à elles vont de septembre à novembre pour la grande et de mars à juin pour la petite. Bien que la pluviométrie soit importante et varie de 2500 à 2800 mm par an, la température et le taux d'hygrométrie relatif varient très peu et les moyennes annuelles sont respectivement de 25° C et de 87%. Le couvert végétal est de type forestier littoral, représenté par une forêt ombrophile peu dégradée (Letouzey, 1985) ; de même, le réseau hydrographique y est dense avec des rivières, des mangroves et des zones marécageuses (Olivry, 1986).

Dans les années 1930, Campo fut érigé comme réserve de faune sauvage. La richesse faunistique, la proximité avec la mer et son hygrométrie font que les activités principales des populations soient la pêche, la chasse, l'agriculture et la cueillette (Penchenier *et al.*, 1999).

D'un point de vue épidémiologique, Campo est considérée comme un foyer hypo-endémique de THA car n'a jamais connu de flambée épidémique (Penchenier *et al.*, 1999). Cependant, près de 70 cas de THA ont été dépistés entre 2002 et 2012, et de nouveaux cas sont toujours dépistés lors des enquêtes du Programme National de Lutte Contre la THA au Cameroun (PNLTHA/Cameroun, inédit).

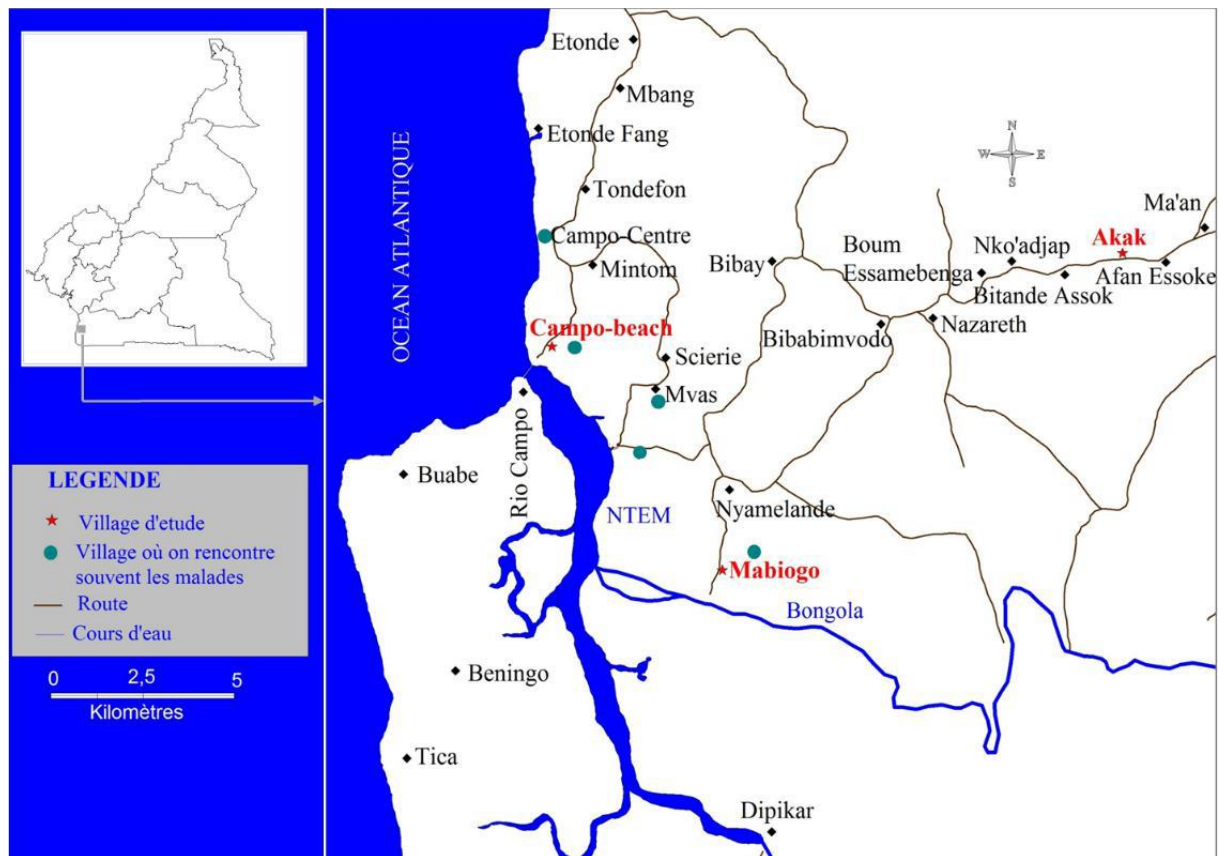


Figure 13 : Carte du foyer de trypanosomoses de Campo (extrait de la carte topographique INC, 1976).

- **Site d'étude**

La présente étude a été réalisée dans 5 villages couvrant une bonne partie de la localité de Campo soit : Campo-Beach, Ipono, Itondé-Fang, Mabiogo et Mvass. Bien qu'il y règne le même type de climat, la densité des populations ainsi que les activités anthropiques diffèrent d'un village à l'autre ; ce qui entraîne de légères différences observables entre les biotopes de ces localités faisant de celles-ci des zones d'intérêt pour notre enquête entomologique.

II. 2. Matériel et méthodes

II.2.1. Protocole d'échantillonnage

La capture des glossines a été effectuée par le déploiement de pièges pyramidaux (Gouteux & Lancien, 1986) dans des biotopes favorables à la présence de ces insectes, c'est-à-dire les points d'eau, les bords de sentiers, l'arrière des habitations, les alentours de porcheries, les lisières de champs cultivés...

L'échantillonnage a été effectué en avril 2018 avec un total de 33 pièges placés (10 à Campo-Beach, 5 à Ipono, 1 à Itondé-Fang, 12 à Mabiogo et 5 à Mvass). Quant aux récoltes, elles ont été effectuées deux fois par jour (matin/après-midi) sur quatre jours consécutifs. La codification des individus a consisté à donner à chacun une association de deux numéros ; le premier était celui du piège et le suivant indiquait le numéro de l'individu dans le piège.

II.2.2 Identification, dissection et conservation des glossines (Pollock, 1982 ; Laveisière *et al.*, 2000, modifié)

Une fois les glossines récoltées, il a été procédé au préalable à leur identification spécifique et à leur caractérisation sur la base de leur couleur et de leur taille, ensuite du sexe de chaque spécimen sur la base de l'observation du genitalia.

Seules les glossines non ténérales appartenant à la sous-espèce *Glossina palpalis palpalis* ont été retenues pour la suite de notre étude. La détermination de la ténéralité des glossines a été effectuée par palpation de leur thorax à l'aide des doigts.

La dissection des glossines a été effectuée dans des conditions stériles, proche d'une flamme d'un bec Bunsen. Chaque glossine était stérilisée par immersions successives dans une solution d'hypochlorite de sodium 5% et deux fois dans de l'éthanol à 70% pendant 5 min. La glossine a, par la suite, été déposée en décubitus dorsal sur une lame étiquetée et contenant une goutte d'eau physiologique. Elle a été maintenue par une pince ; des incisions à l'aide d'une pince à horloger n° 5 ont été effectuées latéralement sur les deux côtés du premier sternite abdominal. L'intestin a été extrait en exerçant une traction lente et progressive vers l'arrière de l'abdomen. Après extraction, l'intestin de chaque glossine a soigneusement été étalé entre une lame et une lamelle puis observé au microscope optique, à l'objectif 40X, pour la recherche des trypanosomes. Le statut parasitologique (infecté ou non) a été noté sur une fiche. Chaque intestin a par la suite été recueilli dans un tube Eppendorf de 1,5 mL étiqueté et contenant environ 200µL d'éthanol à 95°, pour sa conservation sur le terrain. Une fois au laboratoire, les différentes carcasses ont été conservées à -20° en attente d'analyses ultérieures.

II.2.3. Recherche des trypanosomes par PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

II.2.3.1. Extraction d'ADN à partir des intestins de glossines

L'ADN de chacun des intestins moyens de glossines a été extrait à l'aide du kit d'extraction DNeasy® Blood & Tissue Kit de QIAGEN® selon les instructions du fabricant. Au préalable, les intestins des glossines ont été décongelés à température ambiante, centrifugés, débarrassés de l'excédent d'alcool à l'aide d'une pipette et séchés à l'air libre sous une hotte.

Chaque intestin a été broyé, lysé par ajout de 180 µl de tampon ATL+ 20 µl de protéinase K dans des tubes Eppendorf. Ce mélange a été porté à incubation à 56°C au bain marie jusqu'à lyse complète du tissu. Par la suite, 200 µl de tampon AL ont été ajoutés dans chaque broyat puis incubé pendant 10 à 56°C. Après incubation, 200µl d'éthanol (96 à 100%) ont été ajoutés à chaque tube Eppendorf puis homogénéisés pendant 15s à l'aide d'un vortex. Le mélange a été transféré à l'aide d'une pipette dans des colonnes de DNeasy Mini spin, elles-mêmes placées dans des tubes collecteurs de 2ml. Après une centrifugation (8000 tours/ minute) pendant 1 minute, les colonnes ont été placées dans de nouveaux tubes collecteurs, 500µl de tampon AW1 ont été introduits dans chacune de ces colonnes puis une centrifugation (8000 tours/ minute) pendant 1 minute a été réalisée. L'opération a été répétée en chargeant 500µl de tampon AW2 dans les colonnes qui ont ensuite été centrifugées à 14000 tours/minute pendant 3 minutes. Enfin, les ADN provenant des intestins moyens de chaque glossine ont été récupérés dans des tubes collecteurs en imbibant 100µl de tampon d'élution sur la membrane de toutes les colonnes après une incubation d'une minute, à température ambiante, et une centrifugation à 8000 tours/ minute pendant une minute. La concentration de l'ADN provenant des intestins moyens de chaque glossine a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop de marque ThermoFisher Scientific®.

II.2.3.2. Recherche des taxons de trypanosomes infectant *Glossina palpalis palpalis*

L'amplification par PCR des séquences hautement répétitives de l'ADN satellite spécifique à chaque espèce de trypanosome a été effectuée, selon le protocole de Masiga *et al.* (1992) et Herder *et al.* (2002), pour détecter *Trypanosoma brucei* s.l. (*Tbr*), *T. brucei gambiense* (*Tbg*), *T. congolense* type «forêt» (*TcF*) et *T. congolense* type «savane» (*TcS*) chez les glossines échantillonnées. Le tube réactionnel final de 15µl contenait :

- 1,5µL de tampon TBE (TRIS-Borate-EDTA) (de concentration 10X) contenant du MgCl₂ (concentré à 25 mM) ;
- 0,6µL de l'amorce 1 (« forward ») (concentrée à 10µM) ;
- 0,6µL de l'amorce 2 (« reverse ») (concentrée à 10µM) ;
- 0,3µL d'un mélange de dNTPs (concentrés à 10mM) ;
- 0,06µL de Taq (*Thermus aquaticus*) ADN polymérase (concentrée à 5U/µL) ;
- 8,4µL d'eau ;
- 3µL d'extrait d'ADN.

L'amplification de ces séquences d'ADN a été faite à l'aide d'un thermocycleur suivant un programme d'amplification comprenant :

- * une étape de dénaturation initiale du double brin d'ADN à 94°C pendant 5 minutes ;
- * 44 cycles contenant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 58°C (pour les amorces de *Trypanosoma brucei*) ou à 60°C (pour les amorces de *Trypanosoma congolense*) pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute ;
- * une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes.

Une fois le programme d'amplification terminé, les produits d'amplification ont été séparés par migration sur un gel d'agarose à 2% obtenu en chauffant 2 grammes d'agarose dans 100mL de tampon TBE 0,5X (qui a été obtenu en diluant 20 fois avec de l'eau distillée le TBE 10X, qui est lui-même obtenu en mélangeant 108g de TRIS®, 55g d'acide borique et 7,44g d'EDTA®, dans un volume final de 1 litre d'eau distillée).

Le gel d'agarose 2% ainsi préparé a été coulé dans un moule contenant un peigne, façonnant des puits dans lesquels ont été déposés les produits d'amplification à migrer. Juste avant de couler le gel, 6µL de bromure d'éthidium (révélateur/intercalant qui rend fluorescent les bandes d'ADN sous lumière ultraviolette) y ont été ajoutés. Avant le dépôt des échantillons dans le gel, ces derniers ont été mélangés à un tampon de dépôt qui a pour rôle d'entraîner l'ADN au fond des puits du gel et permet de suivre de front de migration. La migration a été

réalisée en appliquant un champ électrique créé par un générateur d'électrophorèse, à 100 volts pendant 30 minutes. A l'issue de la migration, le résultat a été observé sous une lampe à ultraviolets.

Les tests PCR réalisés pour détecter les différents taxons de trypanosomes recherchés ont été faits en présence de deux témoins négatifs (le témoin d'extraction et celui de la PCR) et d'un témoin positif pour chaque espèce ; le témoin positif correspondait à l'ADN extrait de la souche de trypanosome. Ces ADN témoins étaient déjà disponibles au laboratoire. Lors de la révélation des bandes, ont été considérés positifs les échantillons ayant présenté une bande d'ADN amplifié de même poids moléculaire que celle du témoin positif. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire pendant la migration des produits d'amplification a permis de déterminer la taille, en paires de bases (pb), de ces produits. Tous les échantillons ayant été révélés positifs ont été repassés en PCR dans les mêmes conditions que celles citées ci-dessus, cette amplification a eu pour but de confirmer les résultats et d'éviter les faux positifs.

Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification des ADN des différents taxons de trypanosomes recherchés sont consignées dans le tableau I.

Tableau I : Séquences des amorces pour l'amplification de l'ADN des taxons de trypanosomes

Taxons	Séquences des couples d'amorces (5'-3')	Taille du produit	Références
<i>T. congolense</i> (Type Forêt)	GGACACGCCAGAAGGTA GTTCTCGCACCAAATCCAAC	350 pb	(Masiga et al., 1992)
<i>T. congolense</i> (Type Savane)	TCGAGCGAGAACGGGCACTTTGCGA ATTAGGGACAAACAAATCCCGCACA	341 pb	(Moser et al., 1989)
<i>T. brucei s.l.</i>	GAATGAATATTAACAATGCGCAG AGAACCATTATTAGCTTTGTTGC	164 pb	(Masiga et al., 1992)
<i>T. brucei gambiense</i> group 1 (TRBPA)	GCGCCGACGATACCAATGC AACGGATTTTCAGCGTTGCAG	154 pb	Herder et al. (2002)

II.2.4. Identification des bactéries hébergées dans l'intestin des glossines

L'identification des bactéries présentes dans l'intestin moyen des glossines a été faite par séquençage à haut débit de la petite sous unité 16S de l'ARN ribosomique des procaryotes.

L'ARN 16S est un composant de la petite-unité du ribosome des procaryotes. Essentiel lors de la traduction (car il fournit un site pour la liaison de l'ARNm bactérien au ribosome), le

gène qui code pour l'ARNr 16s est hautement conservé parmi les espèces bactériennes. Ce gène est également composé de régions variables, ce qui, à l'issue d'un séquençage et d'une analyse des séquences des banques de données permet l'identification et la différenciation des bactéries au niveau de l'espèce voire de la sous-espèce.

Les régions V4 et V3-V4 sont celles, variables de la sous-unité ARNr 16S, qui permettent une bonne identification des bactéries (Kozich *et al.*, 2013). La région V4 a été retenue car Tsgamo Ngoune *et al.* (2019) ont démontré que cette région permettait l'identification de plus de genres bactériens que la région V3-V4.

II.2.4.1. Séquençage (« Illumina MiSeq »)

La plate-forme de séquençage illumina MiSeq (Illumina, San Diego, USA) a permis de séquencer l'ADN provenant de 160 spécimens (80 non infectés et 80 infectés).

La conception des amorces sens (« forward » 5'-CAGCAGCCGCGGGTAATAC-3') et antisens (« reverse » 5'-CGCATTTACCGCTACAC-3') a été faite par le MR DNA Laboratory et selon leur protocole (<http://www.mdrdnalab.com/shallowater>, USA). Lors de leur synthèse, chacune de ces amorces a été associée à un liguant qui avait pour rôle de lier les produits issus de l'amplification aux index/bar-codes permettant d'identifier les séquences provenant de chaque spécimen à l'issue du séquençage. Quant aux indexes, ils ont été au préalable lié aux adaptateurs servant à fixer les inserts (ADN à séquencer) sur la matrice du séquenceur en vue du séquençage.

Après synthèse du couple d'amorces, la région V4 du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée par PCR, produisant des amplicons d'une longueur moyenne de 250pb.

Chaque réaction PCR a été effectuée avec un volume réactionnel final de 20µl d'un mélange contenant :

- 2µL CoralLoad ;
- 0,5µL de l'amorce sens (de concentration 10mM) ;
- 0,5µL de l'amorce antisens (de concentration 10mM) ;
- 10µL de Hot Star Taq Plus Master Mix ;
- 5µL d'eau ;
- 2µL d'extrait d'ADN.

L'amplification de ces séquences d'ADN a été faite à l'aide d'un thermocycleur ; son programme était composé des étapes suivantes :

- * une étape de dénaturation initiale du double brin d'ADN à 95°C pendant 5 minutes ;
- * 30 cycles contenant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 53°C pendant 40 secondes et une étape d'élongation à 72°C durant 1 minute ;
- * une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

La détermination du succès de l'amplification, a été effectuée par révélation des migrations des produits issus des PCR sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium, et visualisés sous ultraviolets. Cinquante nanogrammes de chaque amplicon ont été liés à des adaptateurs ; ces derniers ont été utilisés pour préparer la bibliothèque individuelle de codes-barres à l'aide du Kit de préparation d'échantillons d'ADN Nextera (Illumina, Singapour). La station « Experion Automated Electrophoresis » (Bio-Rad, Hercules, USA) a été utilisée pour déterminer la taille des inserts de la bibliothèque.

Les échantillons, c'est-à-dire les produits d'amplifications + bar-codes + adaptateurs, ont été poolés dans des proportions équimolaires en fonction de leurs concentrations en ADN. Le pool d'échantillons a été purifié à l'aide de billes aimantées Ampure XP® afin de préparer une librairie d'ADN pour le séquençage Illumina. Douze picomolaires de la librairie poolés ont été chargés sur une cartouche/matrice V3 reagent (Illumina) de 600 cycles. Le séquençage à double sens (« paired-end ») a été effectué par le MR DNA Laboratory sur la plate-forme de séquençage Illumina MiSeq selon leur protocole (<http://www.mdrdnalab.com/shallowater>, USA). La figure 14 schématise le protocole de séquençage sus-détaillé.

V4F-5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA'-3
 V4R-5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAA'-3
 V3F-5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTACGGGAGGCAGCAG'-3

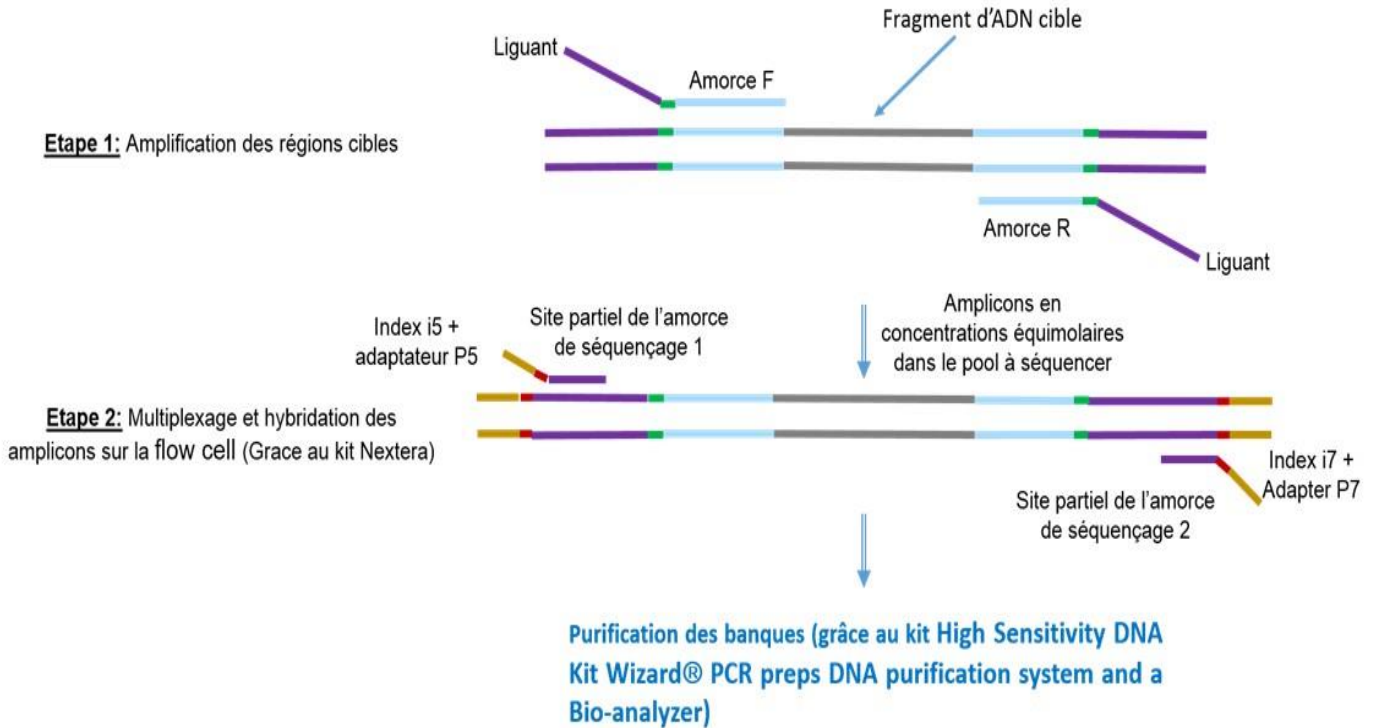


Figure 14 : Schéma de construction des banques d'ADN à séquençer (Kozich *et al.*, 2013).

II.2.4.2. Traitement des séquences d'ARNr 16S et identification des taxons

Avant d'exécuter le pipeline de « métabarcoding », nous avons généré un fichier de référence spécifique pour l'étape d'affectation, en exécutant CutAdapt v1.18 (Martin, 2011) avec les amorces utilisées, pour extraire les séquences de référence V4 de la base de données Silva SSU version 132 (Yaza *et al.*, 2014).

CutAdapt a été utilisé à nouveau dans la première étape du processus bio-informatique afin de filtrer la qualité de lecture. VSearch v2.10.2 (Rognes *et al.*, 2016) et CutAdapt ont été utilisés alternativement pour conduire les tâches suivantes :

- i- pour chaque échantillon, fusionner les données du séquençage des deux sens en fonction de leur zone de chevauchement ;
- ii- démultiplexer les séquences « reads » pour générer un fichier fastq par échantillon ;

- iii- retirer les séquences des codes-barres et des amorces ;
- iv- calculer le taux d'erreur du séquençage ;
- v- supprimer les séquences contenant des bases inconnues ;
- vi- regrouper les séquences en grappes ou clusters appartenant au même taxon à l'aide du script Swarm v2.2.2 (Mahé *et al.*, 2015) ;
- vii- éliminer les chimères à l'aide de VSearch.

Le pipeline STAMPA (<https://github.com/frederic-mahe/stampa>) a servi à l'attribution taxonomique des séquences représentant les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) par similitude avec celles du fichier de références spécifiques obtenues préliminairement à partir de la base de données Siva SSU.

Ces étapes de filtrage et d'assignation ont permis de générer un tableau de taxons auquel les filtres (en éliminant les petits clusters observés dans moins de trois spécimens car les taxons doivent être présents chez au moins 3 individus et en éliminant les clusters d'une abondance inférieure ou égale à 0,002) ont été appliqués afin de conserver les taxons ciblés au rang du genre.

II.2.4.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Calypso 8,84® (Zakrzewski *et al.*, 2016). Afin de vérifier la profondeur du séquençage, qui permet la description et l'identification de la quasi-totalité des OTUs présents dans l'intestin moyen des glossines, une analyse de raréfaction de la flore bactérienne a été effectuée pour chaque individu (Zakrzewski *et al.*, 2016). La couverture ou la profondeur en séquençage de l'ADN ou de l'ARN est le nombre de lectures uniques qui incluent un nucléotide donné dans la séquence reconstruite.

La recherche d'une différence possible entre les taxons au rang de genre et les paramètres étudiés (foyer et statut d'infection) a été effectuée à l'aide d'analyses des indices de diversité, d'analyse multivariée permutacionnelle de la variance, d'analyse canonique par correspondance. Les indices de diversité (α -diversité et β -diversité) ont été calculés en fonction de l'origine des glossines ainsi que de leur état d'infection. L' α -diversité mesure la diversité globale des taxons présents dans le milieu ; elle a été estimée à l'aide de l'indice de Shannon. La β -diversité, quant à elle, a été estimée pour déterminer le degré de diversité des espèces bactériennes en fonction de l'état de l'infection et des sites d'échantillonnages.

La distribution spatiale des individus de glossines dans un repère orthonormé en fonction de la composition de leurs microbiotes et de leur statut parasitaire a été visualisée à l'aide de

l'analyse des coordonnées principales (ACoP) sur la base de l'indice Bray-Curtis ; leur comparaison a été effectuée par l'analyse permutacionnelle de la variance (PERMANOVA), qui est un test statistique multivarié non paramétrique. L'analyse canonique par correspondance (ACC), test complémentaire, a été effectuée dans le but d'explorer les associations complexes entre les variables mesurées et les multiples variables explicatives (ou facteurs confondant).

L'analyse des différences de richesses bactériennes entre glossines infectées et non infectées, et entre les différents sites d'échantillonnage a été effectuée à l'aide du test non paramétrique Kruskal-Wallis.

La recherche de groupes taxonomiques potentiels pouvant servir de biomarqueurs (significativement associés à un groupe spécifique : glossines infectées ou non infectées par les trypanosomes) a été effectuée à l'aide du test de Wilcoxon et de l'algorithme LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) selon les recommandations de Segata *et al.* (2011).

Bien que tous les soins systématiquement utilisés dans le domaine de la recherche microbiologique aient été pris pour éviter la contamination des échantillons, l'apparition d'une telle possibilité ne peut être totalement exclue. Toutefois, étant donné qu'un taxon bactérien n'était considéré présent qu'au cas où il était retrouvé chez au moins 5 glossines et avec une prévalence supérieure à 0,01 % ; nous pouvons estimer avoir exclu de l'étude la plupart des contaminants possibles.

Pour toutes les analyses effectuées, le seuil de signification a été fixé à 5 %.

II.2.5. Evaluation de deux molécules potentiellement bloquantes de l'installation du trypanosome chez la mouche tsé-tsé

II.2.5.1. Insectes, souches bactériennes et conditions de culture

La disponibilité des glossines de la sous-espèce *G. palpalis gambiensis* en grand nombre dans l'insectarium de l'UMR 117 au cours de notre séjour a justifié son utilisation pour nos expérimentations. Ces glossines ont été maintenues à 24 °C et 75 % d'humidité relative, nourries 3 jours par semaine de sang de mouton défibriné à l'aide d'un système membranaire artificiel. Les souches de *Sodalis glossinidius* utilisées dans cette étude ont été isolées de l'hémolymphe des *G. morsitans morsitans* de la colonie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (IMT). Les cultures de *Sodalis glossinidius* ont été maintenues *in vitro* à 27°C dans le milieu d'insecte liquide Mitsuhashi-Maramorosch (MM) complété par 10% (v/v) du sérum

fœtal de bovin inactivé par la chaleur ; des antibiotiques de sélection ont été ajoutés aux milieux, aux concentrations suivantes : 100 µg/ml d'ampicilline ou 50 µg/ml de kanamycine.

II.2.5.2. Construction des plasmides

II.2.5.2.1. Amplification et purification des séquences d'ADN d'intérêts

Les gènes codant pour la *rTbgTCTP* et la cécropine ont été amplifiés via PCR à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau II) respectivement dans un volume final de 50µl. Le tube réactionnel contenait 2,5µl d'amorce « forward », 2,5µl d'amorce « reverse », 25µl du master mix Phusion®, de 1,5µl de DMSO, de 1µl d'ADN et de 17,5µl d'eau.

Tableau II : Séquences des amorces des gènes d'intérêt et de séquençage

Noms des amorces	Séquences d'amorces (5'-3')
<i>rTbgTCTP_Fwpcm66</i>	TCTAGAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCG CGGCCAGCCGGCCATGGCTAAGATCTTCAGGGATATCTTAACAAATGCC
<i>TbgTCTP_pcm66rev</i>	GAATTCTCACACGCGTTCGCCCTTGAGACCAT
<i>Cec_Fw</i>	AATTTTTATAAAATTTTCGTATTCA
<i>Cec_Rev</i>	TTATCCTCTAACAGTAGCGGCA
<i>Tn7_Fw</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
<i>M13_Fw</i>	GTAAAACGACGGCCAG
<i>M13_Rev</i>	CAGGAAACAGCTATGAC

L'amplification de ces gènes a été faite à l'aide d'un thermocycleur programmé à une étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 30 secondes, suivie de 35 cycles comprenant chacun une dénaturation à 98°C pendant 10 secondes, une hybridation d'amorces à 69°C (pour la *rTbgTCTP*), 72°C (pour la cécropine) et une élongation d'une minute ; à la fin des 35 cycles une extension finale de 72°C sur une durée de 10 minutes.

Les différents produits d'amplification ont été migrés sur un gel de 1% d'agarose et observés sous ultraviolet. Par la suite, il a été procédé à la purification de l'ADN issu de l'amplification PCR à l'aide du kit MSB® spin PCRapace suivant les instructions du fabricant détaillées ci-dessous :

- ajout de 250µl de tampon de liaison à 50µl du produit issu de la PCR ;
- homogénéisation de la solution au vortex ;
- transfert du mélange dans la colonne possédant le filtre et l'incubation à température ambiante pendant une minute ;

- centrifugation à vitesse 13000 rpm pendant 4 minutes ;
- placer la colonne dans un nouveau tube collecteur y ajouter 15µl d'eau distillée bien au centre du filtre et laisser incuber 1 minute à température ambiante,
- centrifuger à 11000 rpm pendant une minute et récupérer l'éluât contenant l'ADN purifié.

Pour les produits de PCR donnant plusieurs bandes, il a été procédé au découpage de la bande d'intérêt du gel, à l'extraction et à la purification de l'ADN à l'aide du kit d'extraction Invisorb® Spin DNA selon le protocole du fabricant détaillé ci-dessous :

- transférer de la portion de gel découpé dans un tube Eppendorf ;
- pour 150mg de gel collecté ajouter 500µl de Gel Solubilizer S et incuber à 50°C pendant 10 minutes jusqu'à solubilisation complète du gel ;
- ajouter 250 µl du Binding Enhancer et mixer en pipetant ;
- transférer le mélange dans la colonne à filtre, centrifuger à 11000 rpm pendant 2 minutes et vider l'éluât ;
- ajouter 500µl du tampon de lavage dans la colonne à filtre et centrifuger à 11000 rpm pendant 1 minute ;
- sécher la colonne en la centrifugeant à 13000 rpm pendant 4 minutes ;
- transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur, y ajouter 20µl d'eau distillée et incuber 5 pendant minutes à température ambiante puis centrifuger pendant une minute à 11000 rpm.

Tous les produits purifiés ont été envoyés au séquençage avec les amorces prévues à cet effet (Tableau II), en vue de la vérification des séquences d'ADN.

II.2.5.2.2. Digestion enzymatique et ligation (assemblage) insert+ vecteur

La digestion des plasmides (vecteur) pCM66 et pGRG25 et des ADN d'intérêts (Insert) a été faite à l'aide des enzymes de restriction XbaI et EcoRI à 37°C pendant toute une nuit. Par la suite les produits de la digestion enzymatique ont été purifiés à l'aide du kit MSB® spin PCRapace. Ces derniers ont été quantifiés au nanodrop et 4µl de chaque produit ont été mis à migration sur du gel d'agarose 1% afin de vérifier la conformité des vecteurs et des inserts.

L'assemblage vecteur + insert a été fait à l'aide du kit T4 DNA Ligase d'Invitrogen® pendant toute une nuit à 16°C. Un volume final réactionnel de 20µl a été obtenu par mélange d'un ratio de 3/1 de vecteur+ insert, du tampon, de l'enzyme d'assemblage et de l'eau. La

quantité d'insert et de vecteur utilisée a été déterminée à l'aide d'un outil de calcul en ligne « Ligation Calculator ».

II.2.5.2.3. Transformation et vérification des inserts (De Vooght *et al.*, 2012)

Après la ligation, les plasmides ont été introduits dans des bactéries compétentes TOP 10 (One Shot TOP 10 Chemically competent *E. coli*) suivant les instructions du fournisseur de ces dernières.

Sur de la glace, 3µl du produit de chaque ligation ont été mélangés dans des tubes Eppendorf contenant 50µl de bactéries compétentes. S'en est suivie une incubation pendant 30 minutes puis une autre incubation du mélange durant trente secondes à 42°C dans un bain-marie. Les tubes ont été replacés dans de la glace pendant 2 minutes. Un volume de 250µl de milieu SOC préalablement chauffé à 37°C a été introduit dans chaque tube. Les tubes ont été mis dans un incubateur réglé à 225 rpm et à 37°C pendant une heure, ensuite 100µl de chaque transformation ont été étalés sur des boîtes de Pétri de Luria-Bertany agar préchauffées à 37°C, contenant de l'ampicilline (100µg/ml) ou de la Kanamycine (50µg/ml) sur lesquelles a été étalé du X-Gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl-beta D-galactopyranoside :C₁₄H₁₅BrClNO₆). L'insertion du gène d'intérêt dans le « polylinker » du plasmide détruit la grille de lecture du gène codant pour le Lac Z entraînant l'absence de production de la β-galactosidase produisant des colonies blanches. En effet, le X-Gal est clivé par la β-galactosidase pour donner une substance bleue (colonies bleues).

Les milieux de culture ont été mis en incubation pendant toute une nuit à 37°C. La sélection des unités formant colonie (UFC) recombinante a été faite sur la base de la couleur. Les UFC blanches étaient celles qui portaient les inserts ; la vérification de la présence de ces inserts a été faite par PCR suivie d'un séquençage des produits issus de la PCR après sélection et mise en culture des UFC blanches.

II.2.5.3. Multiplication et récupération des plasmides

La multiplication des bactéries positives (UFC blanches) sélectionnées ayant reçu l'insert a été réalisée dans un milieu de culture LB, dans lequel ont été ajoutés des agents de sélection (antibiotiques correspondant à chacun des plasmides) ; 100µl des cultures vérifiées (portant les inserts après séquençage) ont été remis en culture dans 3ml de LB-Ampicilline à 100µg/ml pour la cécropine et 3ml de LB-Kanamycine à 50µg/ml pour la *rTbgTCTP*. La récupération des

plasmides a été faite à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep selon le protocole du fabricant détaillé ci-dessous :

- centrifugation à 8000 rpm et à température ambiante des milieux de cultures (3ml) fraîchementensemencés la veille, pendant 3 minutes ;
- mise en suspension du culot bactérien dans 250µl de tampon P1 puis transfert du mélange dans un tube Eppendorf ;
- ajout de 250 µl de tampon P2 et homogénéisation de la solution par pipetage jusqu'à éclaircissement ;
- ajout de 350µl de tampon N3 et homogénéisation du mélange par pipetage 4 à 6 fois ;
- centrifugation du mélange à 13000rpm pendant 10 minutes ;
- charger 800µl du surnageant dans une colonne à filtre et le centrifuger à 13000 rpm pendant une minute puis verser l'éluât ;
- charger 500µl du tampon PB dans la même colonne et le centrifuger à 13000 rpm pendant une minute ;
- charger 750µl du tampon PE dans la même colonne et le centrifuger à 13000rpm pendant une minute, enfin verser l'éluât ;
- sécher la colonne en la centrifugeant à 13000rpm pendant une minute ;
- placer la colonne dans un nouveau tube collecteur, y charger 30µl d'eau distillée et laisser incubé à température ambiante pendant une minute puis centrifuger à 13000rpm pendant une minute.

Une fois les plasmides récupérés, des PCR de contrôle ont été effectuées suivant le protocole utilisé lors de l'amplification des gènes d'intérêts, ensuite 50ng de chaque plasmide ont été envoyés au séquençage une fois de plus afin de vérifier la conformité des gènes d'intérêts.

II.2.5.4. Transformation génétique de *Sodalis glossinidius* avec les plasmides portant les gènes d'intérêts

Les constructions plasmidiques PCM66rTbgTCTP et pGRG25CWSP ont été insérées chacune dans *S. glossinidius* par choc thermique selon le protocole décrit par De Vooght *et al.* (2012). La transformation de *S. glossinidius* a été effectuée en deux étapes ; la première consistait à les rendre chimiquement compétents et la seconde consistait à l'insertion du plasmide.

La transformation de *S. glossinidius* en bactérie compétente a été faite selon le protocole ci-dessous (De Vooght *et al.*, 2012) :

- mise en culture de *S. glossinidius* dans 140ml de Mitsuhashi-Maramorosh (MM) jusqu'à obtention d'une densité optique de 0,3 à 600nm ;
- dépôt des milieux de culture dans de la glace pendant 15 minutes ;
- centrifugation des milieux à 3220x g pendant 10 minutes à 4°C ;
- versement des milieux et resuspension des culots avec 5ml de tampon F puis rajouter 20 ml de tampon dans chaque tube ;
- introduction des tubes dans de la glace durant 20 minutes ;
- centrifugation des tubes tel qu'effectué précédemment puis rejet du tampon ;
- resuspension des culots avec 1,5 ml de mélange de tampon F + DMSO et incubation sur de la glace pendant 10 minutes ;
- chargement de 100µl des bactéries compétentes dans des tubes de 1,5 ml.

L'insertion des plasmides contenant les inserts d'intérêts dans des cellules de *S. glossinidius* compétentes a été faite par choc thermique suivant le protocole ci-dessous :

- ajout de 200ng de plasmide dans un tube contenant 100µl de *S. glossinidius* compétent ;
- incubation sur de la glace pendant 30 minutes ;
- incubation des cellules à 42°C dans un bain marie pendant 40 secondes ;
- incubation des cellules dans de la glace pendant 2 minutes ;
- ajout de 0,4ml de MM à température ambiante ;
- incubation du mélange pendant toute la nuit à 27°C ;
- centrifugation des cellules à 5500x g durant 10minutes puis resuspension du culot dans 100µl de MM et étalement du mélange sur du MM-agar supplémenté de 5% de sang de cheval et de la Kanamycine (50µg/ml) pour la *rTbgTCTP* ou de l'ampicilline (100µg/ml) pour la cécropine ;
- incubation des cellules sur une dizaine de jours à 25°C dans des conditions micro-aérophiles (5% O₂, 10% CO₂ complété avec du N₂) ;
- isolement des clones recombinants.

Des spots de colonies (clones recombinants) ont été utilisés pour effectuer des PCR selon le protocole utilisé lors de l'amplification des inserts d'intérêts (cf paragraphe II. 2. 5. 2. 1).

II.2.5.5. Vérification de l'expression des protéines par Western Blot

Les différents culots obtenus après centrifugation des cultures de bactéries recombinantes ont été dénaturés à 95°C en présence du β -mercaptoéthanol pendant 5 min. Après dénaturation, les lysats (20 μ l) ont été déposés dans des puits de gels SDS-PAGE (10% pour la *TbgTCTP* et 20% pour la cécropine).

Les gels SDS-PAGE ont été préparés comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : Protocole de préparation de gels SDS-PAGE

Consommables	Gel de 10%	Gel de 20%	« <i>Stacking</i> » gel
ddH2O	2,50ml	1,15ml	3,61ml
40% bis acrylamide	1,25ml	2,5ml	0,62 ml
1,5M Tris pH 8,8	1,25ml	1,25ml	-
1,5M Tris pH 6,8	-	-	0,63ml
10% ammonium persulfate	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	2 μ L	2 μ l	5 μ l
SDS	50 μ l	50 μ l	50 μ l

La séparation électrophorétique a été faite sous une tension de 200V entre 35 et 50 minutes ; le transfert a été fait sur une membrane PVDF à 4°C pendant 2h à 200v ; le blocage a été fait dans du PBS tween + 5% de lait écrémé pendant 45 minutes ; les incubations ont été faites pendant toute une nuit en présence d'anticorps spécifiques aux protéines de l'étude.

La révélation de la présence des protéines a été faite par colorimétrie pour la *rTbgTCTP* et par chimioluminescence pour la cécropine.

II.2.5.6. Micro-injection des larves de stade 3, Infection des mouches tsé-tsé et maintien des colonies

Immédiatement après larviposition, 10⁶ UFC de *Sodalis* recombinant ont été injectées, à l'aide d'une seringue Hamilton de 5 μ l. Les pupes injectées ont été maintenues dans un

incubateur dans des conditions optimales de température et d'hygrométrie (24°C +/-1 et 85% d'humidité relative).

Juste après émergence, les glossines ont été infectées au cours de leur premier repas sanguin suivant deux protocoles.

Lors de l'étude de l'effet de la cécropine sur l'installation du parasite dans l'intestin moyen des glossines, le repas a été fait sur des souris préalablement infectées avec la souche ABBA de *T. brucei gambiense* groupe 2 et maintenues sous anesthésie à l'isoflurane

Lors de l'étude de l'effet de la rTbgTCTP, l'infection a été faite sur des souris préalablement infectées par la même souche ABBA et anesthésiées par injection de 150 à 200µl d'un mélange (650µl de NaCl 0,9% + 100µl de Rompun 2% + 50µl d'Imalgène 1000). La modification du protocole d'anesthésie du rongeur visait à obtenir une meilleure appétence des glossines car les souris injectées étaient disposées dans une salle ayant une température et une hygrométrie optimales pour les glossines ; ceci les stressait moins. Les repas suivants ont servi de repas de maintien, et pris sur un système membranaire + sang de mouton.

II.2.5.7. Vérification de l'action des protéines recombinantes sur le parasite

En recherchant à bloquer le cycle de développement du parasite en interférant avec son établissement dans l'intestin moyen des glossines ; celles-ci ont été disséquées environ une vingtaine de jours après la prise du repas infectant, pour vérifier par observation microscopique la présence du parasite puis la confirmer par PCR.

La dissection des intestins des glossines et l'extraction d'ADN provenant de ces intestins ont été faites selon le protocole utilisé plus haut (cf. paragraphe II. 2. 2. & II. 2. 3. 1).

II.2.5.7.1. Recherche de la présence du parasite chez *Glossina palpalis gambiensis*

L'amplification par PCR des séquences hautement répétitives de l'ADN satellite spécifiques du trypanosome a été effectuée pour détecter *T. brucei gambiense* (Tbg) chez les glossines de l'étude à l'aide du couple d'amorce TBR1 CGAATGAATATTAACAATGCGCAG et TBR2 AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC selon le protocole utilisé plus haut (cf paragraphe II. 2. 3. 2.).

II.2.5.7.2. Recherche de la présence des symbiontes chez *Glossina palpalis gambiensis*

Une fois l'ADN extrait des intestins des glossines, nous avons procédé à la vérification de la présence des symbiontes recombinants via amplification par PCR des séquences des gènes d'intérêts à l'aide de couples d'amorces amplifiant respectivement les séquences des gènes codant pour la *rTbgTCTP* et la cécropine.

rTbgTCTP_Fw (ATGAAGATCTTCAGGGATATCTTA)/

rTbgTCTP_Rev(TCACACGCGTTCGCCCTTGAGA)

et *recSodCWSP_Fw* (AATTTTATAAAAATTTTCGTATTCA)/

recSodCWSP_Rev (TTATCCTCTAACAGTAGCGGCA)

Le tube réactionnel, avec pour volume final 15µl, contenait

- 1,5µL de tampon TBE (TRIS-Borate-EDTA) (de concentration 10X) contenant du MgCl₂ (concentré à 25 mM) ;
- 0,6µL de l'amorce 1 (« Forward ») (concentrée à 10µM) ;
- 0,6µL de l'amorce 2 (« Reverse ») (concentrée à 10µM) ;
- 0,3µL d'un mélange de dNTPs (concentrés à 10mM) ;
- 0,06µL de Taq (*Thermus aquaticus*) ADN polymérase (concentrée à 5U/µL) ;
- 8,4µL d'eau ;
- 3µL d'ADN.

L'amplification de ces séquences d'ADN a été faite à l'aide d'un thermocycleur, suivant un programme d'amplification comprenant :

- * une étape de dénaturation initiale du double brin d'ADN à 95°C pendant 5 minutes ;
- * 40 cycles contenant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 46°C (pour les amorces de la *rTbgTCTP*) ou à 43°C (pour les amorces de la cécropine) pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute ;

* une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes.

Une fois le programme d'amplification terminé, les produits d'amplification ont été séparés par migration sur un gel d'agarose à 2%. La migration a été faite sous l'effet d'un champ électrique créé par un générateur d'électrophorèse, à 100 volts pendant 45 minutes et la révélation sous une lampe à ultraviolets.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Diversité biologique et densité apparente des glossines à Campo

Au cours de l'étude entomologique, 33 pièges pyramidaux ont été déployés dans l'ensemble des 5 villages comme suit : 10 à Campo-Beach, 5 à Ipono, 1 à Itondé-Fang, 5 à Mvass et 12 à Mabiogo). Ces pièges ont permis de capturer 540 glossines constituées de 289 (53,52%) femelles et de 251 (46,48%) mâles et majoritairement dominées par la sous-espèce *G. palpalis palpalis* (96,11%) où elle coexiste avec 3 autres espèces (Tableau IV).

Tableau IV : Diversité biologique des glossines capturées durant l'étude

Taxons de Glossines	<i>G. palpalis palpalis</i>	<i>G. pallicera</i>	<i>G. nigrofusca</i>	<i>G. caligenea</i>	Total
Effectifs (pourcentages)	519 (96,11%)	6 (1,11%)	1 (0,18%)	14 (2,59%)	540

La densité apparente moyenne des glossines par piège et par jour (DAP) était de 4,09 avec une forte fluctuation en fonction des sites de collecte allant de 1,85 dans la localité d'Ipono à 10,8 dans la localité de Mvass (Tableau V). Sur l'ensemble des glossines capturées la fréquence des glossines ténérales était de 16 (2,96%). De plus, 55 (9,25%) glossines étaient sèches au moment de la collecte à cause de la chaleur ; ceci explique que des 540 glossines récoltées, seulement 469 glossines aient été disséqués.

Tableau V : Détail des paramètres entomologiques enregistrés dans les villages

Villages	Nombre de pièges	Nombre de glossines	DAP g/p/j	Glossines ténérales (%)	Nombre de glossines disséqués
Campo-Beach	10	141	3,52	3(2,13)	126
Ipono	5	37	1,85	0(0)	28
Itondé-Fang	1	15	3,75	0(0)	13
Mabiogo	12	131	2,72	6(4,58)	122
Mvass	5	216	10,8	7(3,24)	180
Total	33	540	4,09	16(2,96)	469

*DAP : densité apparente par piège et par jour ; % : pourcentage.

III.1.2. Taxons de trypanosomes identifiés par PCR

La recherche des trypanosomes par PCR a été effectuée sur 160 *G. palpalis palpalis* prises au hasard sur l'effectif de celles disséqués. Parmi ces glossines, 80 (50%) étaient porteuses

d'au moins une espèce ou sous-espèce de trypanosome (Tableau VI). L'infection à *Trypanosoma congolense* type Savane était prépondérante avec 50 (31,25%) glossines mono-infectées plus 11 (6,87%) glossines ayant une infection mixte soit un total de 61 (38,12%) glossines portant ce parasite. La présence de *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg) a été notée dans le tractus digestif de 5 glossines soit une prévalence de 3,1%. Bien que cette présence pourrait ne pas conduire à une infection mature, elle prouve que le parasite circule toujours dans la localité. De plus, il a été observé la présence d'infection mixtes (doubles, triples et quadruples) chez 13 glossines soit une fréquence de 8,1%.

Tableau VI : Nombre de mono-infection et d'infections mixtes

Village	Nombre des glossines analysées	Nombre de glossines infectées (%)	TcS (%)	Tbrsl (%)	TcF (%)	Tc (F&S) (%)	Tbrsl & Tcs (%)	Tbrsl & Tbg (%)	Tbrsl, Tbg & Tcs (%)	Tc (F&S) & Tbg & Tbrsl (%)
Campo-Beach	64	27 (42,2)	11	6	2	3	2	1	1	1
Ipono	21	8 (38,1)	0	5	2	0	0	1	0	0
Itondé-Fang	10	7 (70)	6	0	0	0	0	0	1	0
Mabiogo	19	16 (84,2)	16	0	0	0	0	0	0	0
Mvass	46	22 (47,8)	17	0	2	3	0	0	0	0
Total	160	80 (50)	50 (31,25)	11 (6,87)	6 (3,75)	6 (3,75)	2 (1,25)	2 (1,25)	2 (1,25)	1 (0,62)

*TcF: *Trypanosoma congolense* type Forêt ; TcS: *Trypanosoma congolense* type Savane ; Tbrsl: *Trypanosoma brucei sensu lato* ; Tbg : *Trypanosoma brucei gambiense*.

III.1.3. Taxons bactériens identifiés dans l'intestin des glossines

III.1.3.1. Données brutes de séquençage

Les données brutes issues du séquençage de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique ont généré un total de 37 573 904 séquences « reads » ; 36 112 664 (96,1 %) d'entre-elles ont été alignées (appariées) avec succès. Elles ont ensuite été soumises à un filtre de qualité ; ainsi 29 994 337 (79,8%) d'entre-elles ont passé avec succès cette barrière et ont été conservées pour des analyses ultérieures.

III.1.3.2. Profondeur de séquençage

L'analyse des courbes de raréfaction du microbiome de chaque glossine ont permis de vérifier la profondeur du séquençage. Elle (fig. 15) a confirmé la qualité du séquençage et ces courbes présentaient, pour la plupart, une saturation se situant entre 100 000 et 250 000 séquences. Ceci, montre qu'un effort de séquençage suffisant a été réalisé pour caractériser la plupart des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs).

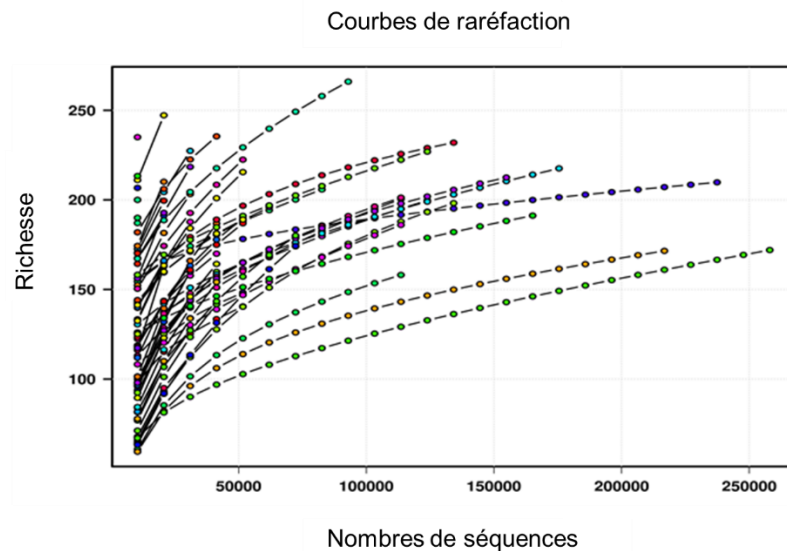


Figure 15 : Courbes de raréfaction des taxons bactériens pour chaque glossine. Chaque courbe correspond à la profondeur de séquençage pour chaque glossine et les points correspondent aux nombres de séquences trouvées dans chacune d'elles assignées au niveau du genre.

III.1.3.3. Caractérisation globale du microbiote des glossines

Les flores bactériennes présentes dans les intestins des glossines échantillonnées, suite au séquençage de la région V4 de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique, étaient composées de 14 phyla +1 « bactéries non cultivées » correspondant à 26 genres. Ici on considère la glossine (l'intestin moyen de la glossine) comme un échantillon et qui est composé de sa population bactérienne.

Toutefois, 114 genres bactériens appartenant à 12 phyla + le groupe « bactéries non cultivées » ont été retenus dans cette analyse car ils ont été enregistrés, au moins une fois dans un site d'échantillonnage avec une abondance relative supérieure à 0,01% (Tableau VII). Le

Phylum des Protéobactéries, majoritairement représenté à hauteur de 90,7%, était présent dans tous les intestins moyens de glossines séquencées ; les autres phyla étaient inégalement réparties chez ces glossines. La prédominance des Protéobactéries était principalement due à l'abondance relative très élevée du genre *Wigglesworthia* (87,22%), symbiote primaire obligatoire de la glossine ; il y joue un rôle crucial pour sa survie. Le phylum des Tenericutes ne comprenait qu'un seul genre (*Spiroplasma*) avec une abondance relative de 6,2 % ; les Actinobacteria, les Bacterioïdes et les Firmicutes étaient présents avec des abondances relatives respectives de 0,83, 0,60 et 0,86 %.

Tableau VII : composition des genres bactériens retenus

Phyla	Genres	Nombre de séquences	Abondance relative (%)
Nombre total de séquences		28 668 631	
Acidobacteria	<i>Bryobacter</i>	1793	0,0063
Actinobacteria			
Total		238580	0,8321
	<i>Actinomyces</i>	2543	0,0088
	<i>Actinomycetospora</i>	1724	0,0060
	<i>Brachybacterium</i>	8899	0,0310
	<i>Brevibacterium</i>	2484	0,0087
	<i>Candidatus_Aquiluna</i>	9283	0,0324
	<i>Cellulosimicrobium</i>	2285	0,0080
	<i>Corynebacterium</i>	31027	0,1082
	<i>Cutibacterium</i>	65278	0,2277
	<i>Fodinicola</i>	2730	0,0095
	<i>Geodermatophilus</i>	1069	0,0037
	<i>Georgenia</i>	7014	0,0245
	<i>Glutamicibacter</i>	4007	0,0140
	<i>Iamia</i>	1855	0,0065
	<i>Isoptericola</i>	3644	0,0127
	<i>Janibacter</i>	435	0,0015
	<i>Kocuria</i>	14452	0,0504
	<i>Lawsonella</i>	1946	0,0068
	<i>Leifsonia</i>	538	0,0019
	<i>Marmoricola</i>	1362	0,0048
	<i>Microbacterium</i>	20410	0,0712
	<i>Nesterenkonia</i>	13360	0,0466
	<i>Nocardioïdes</i>	15538	0,0542
	<i>Prauserella</i>	2819	0,0098
	<i>Pseudonocardia</i>	4022	0,0140
	<i>Rhodococcus</i>	1215	0,0042
	<i>Rubrobacter</i>	1506	0,0053

	<i>Saccharopolyspora</i>	10383	0,0362
	<i>Sporichthyaceae_hgcI_clade</i>	2088	0,0073
	<i>Streptomyces</i>	2027	0,0071
	<i>Turicella</i>	2637	0,0092
Bacteroidetes			
Total		171245	0,5973
	<i>Alistipes</i>	3158	0,0110
	<i>Alloprevotella</i>	3430	0,0120
	<i>Bacteroides</i>	17756	0,0619
	<i>Bergeyella</i>	8806	0,0307
	<i>Chryseobacterium</i>	67473	0,2354
	<i>Dyadobacter</i>	601	0,0021
	<i>Dysgonomonas</i>	692	0,0024
	<i>Empedobacter</i>	10833	0,0378
	<i>Flavobacterium</i>	16237	0,0566
	<i>Fluviicola</i>	5534	0,0193
	<i>Hymenobacter</i>	1756	0,0061
	<i>Moheibacter</i>	1419	0,0049
	<i>Parabacteroides</i>	2534	0,0088
	<i>Prevotella</i>	24117	0,0841
	<i>Proteiniphilum</i>	1854	0,0065
	<i>Pseudarcicella</i>	2629	0,0092
	<i>Rikenellaceae</i>	2416	0,0084
Chloroflexi	<i>Chloronem</i>	660	0,0023
Cyanobacteria			
Total		3673	0,0128
	<i>Microcoleus</i>	1927	0,0067
	<i>Myxosarcina</i>	1746	0,0061
Deinococcus- Thermus	<i>Deinococcu</i>	4292	0,0150
Firmicutes			
Total		247601	0,8637
	<i>Aerococcus</i>	6325	0,0221
	<i>Anaerospora</i>	408	0,0014
	<i>Anoxybacillus</i>	1810	0,0063
	<i>Atopostipes</i>	6227	0,0217
	<i>Bacillus</i>	64222	0,2240
	<i>Clostridium_sensu_stricto</i>	2284	0,0080
	<i>Dolosigranulum</i>	556	0,0019
	<i>Enterococcus</i>	8883	0,0310
	<i>Ethanoligenens</i>	6474	0,0226
	<i>Exiguobacterium</i>	1911	0,0067
	<i>Fonticella</i>	2036	0,0071
	<i>Gemella</i>	2684	0,0094
	<i>Geobacillus</i>	3073	0,0107
	<i>Jeotgalicoccus</i>	2530	0,0088

	<i>Lachnospiraceae</i>	3797	0,0132
	<i>Lactobacillus</i>	24786	0,0865
	<i>Leuconostoc</i>	60567	0,2113
	<i>Macrococcus</i>	1940	0,0068
	<i>Paenibacillus</i>	5306	0,0185
	<i>Phascolarctobacterium</i>	1742	0,0061
	<i>Ruminiclostridium</i>	2515	0,0088
	<i>Ruminococcaceae</i>	7367	0,0257
	<i>Ruminococcus</i>	2358	0,0082
	<i>Streptococcus</i>	15232	0,0531
	<i>Thermicanus</i>	4824	0,0168
	<i>Veillonella</i>	1524	0,0053
	<i>Weissella</i>	5798	0,0202
	<i>Zymophilus</i>	422	0,0015
Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>	1336	0,0047
Planctomycetes			
Total		5499	0,0191
	<i>Blastopirellula</i>	1261	0,0044
	<i>Fimbrioglobus</i>	2620	0,0091
	<i>Pirellula</i>	1618	0,0056
Proteobacteria			
Total		26008183	90,7200
	<i>Acinetobacter</i>	269894	0,9414
	<i>Altererythrobacter</i>	3170	0,0111
	<i>Cellvibrio</i>	1605	0,0056
	<i>Comamonas</i>	2974	0,0104
	<i>Cupriavidus</i>	31291	0,1091
	<i>Haemophilus</i>	856	0,0030
	<i>Hydrogenophilus</i>	3996	0,0139
	<i>Legionella</i>	7539	0,0263
	<i>Lysobacter</i>	1960	0,0068
	<i>Massilia</i>	5974	0,0208
	<i>Novosphingobium</i>	6396	0,0223
	<i>Pseudomonas</i>	182344	0,6360
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	1098	0,0038
	<i>Ralstonia</i>	5665	0,0198
	<i>Rickettsiella</i>	1675	0,0058
	<i>Schlegelella</i>	2254	0,0079
	<i>Serratia</i>	2657	0,0093
	<i>Stenotrophomonas</i>	11291	0,0394
	<i>Tepidimonas</i>	1743	0,0061
	<i>Tepidiphilus</i>	396494	1,3830
	<i>Thermomonas</i>	7202	0,0251
	<i>Undibacterium</i>	51915	0,1811
	<i>Vibrio</i>	1621	0,0057
	<i>Wigglesworthia</i>	25005181	87,2214

	<i>Yersinia</i>	1388	0,0048
Tenericutes	<i>Spiroplasma</i>	1795869	6,2642
Verrucomicrobia			
Total		13943	0,0487
	<i>Chthoniobacter</i>	2738	0,0096
	<i>Luteolibacter</i>	3886	0,0136
	<i>Prostheco bacter</i>	7319	0,0255
.....			
	uncultured_bacterium	99779	0,3480

(%) : pourcentage ; le total des séquences est l'ensemble des séquences obtenues sur les 261 genres. Mais pour la suite des analyses 114 genres ont été de sélectionnés.

En examinant de plus près la composition des communautés bactériennes présentes dans l'intestin moyen de chaque glossine (glossine = échantillon), 10 d'entre elles ont présenté des profils ayant de grandes différences d'abondance par rapport à la répartition globale des phyla bactériens (tableau VIII). Ainsi, alors que le phylum des Proteobacteria est le plus abondant (90,72%), ce n'est pas le cas, par exemple, pour les échantillons 1, 39, 41, 57 et 120 où le phylum le plus abondant est celui des Tenericutes. La composition bactérienne dans l'échantillon 155 montre que l'abondance relative des Bacterioides, des Firmicutes, des Proteobacteria était respectivement de 21,20 %, 17,37 % et 41,9 %. Les échantillons 20 et 44 avaient pour abondances relatives respectives 50,29 % et 46,82 % de Proteobactéria, 19,71 % et 13,84 % d'Actinobacteria, 11 % et 9,7 % de Bacterioedes et 10,73 % et 14,48 % de Firmicutes. Malgré l'importance du phylum des Proteobacteria, la représentation des genres bactériens qui le composent était très variables. L'abondance de *Wigglesworthia*, pour les 10 glossines sélectionnées a varié entre 4,1 et 95,4 % (abondance relative moyenne : 87,2 %). Dans l'échantillon 155, le genre *Tepidiphilus* (Protéobactérie), (comprenant 4 espèces bactériennes extrêmophiles : thermophiles) était majoritaire (31,6 %) alors que *Wigglesworthia* était minoritaire (4,13%).

Tableau VIII : Variation de la composition bactérienne chez 10 glossines

Glossines	Site de collecte	Statut	Actinobacteria		Bacteroides		Firmicutes		Proteobacteria			Tenericutes (Spiroplasma)		Reste des phyla	
			Nbr de séq	Abond. rel.	Nbr de séq	Abond. rel.	Nbr de séq	Abond. rel.	Nbr de séq	Abondance relative Tout Proteob.	Wigglesw.	Nbr de séq	Abond. rel.	Nbr de séq	Abond. rel.
1	Campo Beach	NI	324	0,1300	263	0,1055	196	0,0786321	110247	44,229365	43,961374	138104	55,405156	128	0,0513516
8	Campo Beach	I	17140	14,9642	13384	11,6850	16658	14,543391	56992	49,75729	17,933473	210	0,18334206	10156	8,8667714
20	Campo Beach	NI	24528	19,7102	13696	11,0058	13357	10,733428	62584	50,291298	30,853483	2691	2,16243581	7587	6,0967672
39	Campo Beach	I	661	0,2362	235	0,0840	207	0,0739653	62681	22,39719	22,197448	215946	77,1618768	131	0,046809
41	Campo Beach	I	5540	2,3267	1166	0,4897	987	0,4145178	108373	45,51422	43,946864	120738	50,7072421	1304	0,5476506
44	Campo Beach	NI	17214	13,8478	12064	9,7048	18003	14,482459	58213	46,829272	28,682557	282	0,22685405	18533	14,908816
57	Ipono	I	1120	0,4685	661	0,2765	593	0,2480756	87483	36,597641	35,64508	148882	62,2832999	301	0,1259203
94	Campo Beach	NI	261	0,1963	522	0,3927	263	0,1978381	131479	98,90324	95,44145	346	0,26027366	66	0,0496476
120	Mvass	I	240	0,1185	138	0,0681	258	0,1273565	91030	44,935112	43,162488	110838	54,7129296	77	0,0034959
155	Mabiogo	I	14258	9,2253	32777	21,2075	26860	17,379039	64766	41,905095	4,1357713	243	0,1572266	15650	10,125911

Nbr= nombre ; Seq= séquence ; Abond= abondance ; I= infectée ; NI= non-infectée ; Proteob.= Proteobacteria ; Wigglesw. = Wigglesworthia ; rel= relative ; (%) = pourcentage

Chaque glossine est considérée comme échantillon.

III.1.3.4. Distribution des communautés bactériennes des glossines en fonction des sites d'échantillonnage

Les compositions des microbiomes des glossines en fonction des sites ont montré une prépondérance du genre *Wigglesworthia* dans tous les sites (plus de 85 % à Ipono, 86 % à Campo-Beach et Mvass, 89 % à Mabiogo et 96 % à Itonde-Fang) (Tableau IX). Des disparités de fréquences ont été notées dans des échantillons ; par exemple la fréquence de *Wigglesworthia* était la plus faible (4,1 %) dans l'échantillon 155 de Mabiogo, plus élevée (95,4 %) dans l'échantillon 94 de Campo-Beach, de 17,9 % dans l'échantillon 8 piégé dans le même village (Tableau VIII). En revanche, la fréquence de *Spiroplasma* a varié de 1,7 % chez les glossines provenant d'Itonde-Fang à 9,1 % chez celles d'Ipono ; celle d'*Acinetobacter* était de 0,057% chez les glossines récoltées à Mabiogo contre 2,65% pour celles provenant de Mvass enfin celle de *Pseudomonas* était de 0,05% et 1,58% respectivement à Mabiogo et Mvass. Hormis les différences de distribution des bactéries présentes dans tous les sites de collecte, plusieurs autres taxa ayant des fréquences supérieures au seuil fixé, ont été trouvés dans un seul site de collecte. Ces taxons et leurs sites d'échantillonnage correspondants sont présentés dans le tableau IX. En revanche, certains taxons (*Aerococcus*, *Brachy bacterium*, *Kocuria*, *Nesterenkonia* et *Prevotella*) étaient absents (fréquences inférieures au seuil fixé) sur le site d'Itonde-Fang, tout comme *Leuconostoc* à Mabiogo. Enfin, certains taxons n'ont guère été détectés dans certains sites ; c'est le cas d'*Anaerospora* chez les glossines de Mvass ; *Janibacter*, *Dyadobacter*, *Phascolarctobacterium* et *Zymophilus* à Mabiogo, *Myxosarcina*, *Anaerospora*, *Zymophilus*, *Pseudoxanthomonas* à Itonde-Fang, et *Proteiniphilum*, *Anaerospora* à Ipono

Tableau IX : Distribution des bactéries en fonction du site de collecte

Genres	Fréquences (%)				
	Mvass	Mabiogo	Itonde-Fang	Ipono	Campo-beach
<i>Acidibacter</i>	0,0002	0,0001	0,0000	0,0021	0,0024
<i>Acinetobacter</i>	2,6545	0,0574	0,0694	0,5445	0,2830
<i>Actinomyces</i>	0,0072	0,0005	0,0021	0,0021	0,0152
<i>Actinomycetospora</i>	0,0008	0,0002	0,0011	0,0136	0,0094
<i>Adhaeribacter</i>	0,0031	0,0017	0,0001	0,0001	0,0002
<i>Aerococcus</i>	0,0343	0,0111	0,0026	0,0174	0,0211
<i>Aeromicrobium</i>	0,0043	0,0000	0,0000	0,0009	0,0007
<i>Aeromonas</i>	0,0004	0,0075	0,0001	0,0005	0,0013
<i>Agrococcus</i>	0,0002	0,0059	0,0002	0,0040	0,0064

<i>Agromyces</i>	0,0016	0,0000	0,0021	0,0003	0,0032
<i>Alcanivorax</i>	0,0004	0,0003	0,0061	0,0054	0,0012
<i>Algoriphagus</i>	0,0005	0,0000	0,0001	0,0044	0,0050
<i>Alishewanella</i>	0,0013	0,0002	0,0003	0,0004	0,0009
<i>Alistipes</i>	0,0005	0,0232	0,0005	0,0206	0,0135
<i>Alkalicoccus</i>	0,0016	0,0050	0,0003	0,0017	0,0004
<i>Alloiococcus</i>	0,0035	0,0031	0,0001	0,0017	0,0048
<i>Alloprevotella</i>	0,0007	0,0002	0,0007	0,0109	0,0245
<i>Altererythrobacter</i>	0,0040	0,0008	0,0013	0,0023	0,0226
<i>Amycolatopsis</i>	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	0,0000
<i>Anaerospira</i>	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Anaerovibrio</i>	0,0002	0,0000	0,0010	0,0001	0,0000
<i>Aneurinibacillus</i>	0,0000	0,0001	0,0000	0,0048	0,0000
<i>Anoxybacillus</i>	0,0014	0,0100	0,0020	0,0004	0,0111
<i>Antricoccus</i>	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0002
<i>Aquabacterium</i>	0,0002	0,0018	0,0002	0,0005	0,0029
<i>Aquipuribacter</i>	0,0005	0,0000	0,0002	0,0029	0,0007
<i>Arcicella</i>	0,0002	0,0004	0,0001	0,0045	0,0039
<i>Arenimonas</i>	0,0000	0,0013	0,0001	0,0008	0,0027
<i>Aridibacter</i>	0,0008	0,0003	0,0000	0,0006	0,0001
<i>Armatimonas</i>	0,0001	0,0004	0,0003	0,0001	0,0094
<i>Arsenicococcus</i>	0,0037	0,0002	0,0000	0,0008	0,0028
<i>Atopostipes</i>	0,0060	0,0102	0,0091	0,0333	0,0336
<i>Aurantimicrobium</i>	0,0004	0,0004	0,0023	0,0034	0,0067
<i>Bacillus</i>	0,1210	0,3002	0,0888	0,2690	0,2797
<i>Bacteroides</i>	0,0107	0,0588	0,0134	0,0410	0,1106
<i>Bdellovibrio</i>	0,0004	0,0003	0,0001	0,0003	0,0009
<i>Bergeyella</i>	0,0028	0,0975	0,0004	0,0022	0,0454
<i>Blastococcus</i>	0,0018	0,0004	0,0023	0,0014	0,0084
<i>Blastopirellula</i>	0,0004	0,0005	0,0004	0,0069	0,0107
<i>Blautia</i>	0,0020	0,0019	0,0001	0,0001	0,0006
<i>Bounagaea</i>	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
<i>Brachybacterium</i>	0,0314	0,0129	0,0083	0,0451	0,0346
<i>Brevibacillus</i>	0,0003	0,0001	0,0006	0,0000	0,0000
<i>Brevibacterium</i>	0,0118	0,0024	0,0038	0,0067	0,0095
<i>Bryobacter</i>	0,0004	0,0079	0,0003	0,0101	0,0094
<i>Butyricococcus</i>	0,0001	0,0000	0,0002	0,0015	0,0080
<i>Butyrivibrio</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0008
<i>Caldalkalibacillus</i>	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0015
<i>Caldibacillus</i>	0,0005	0,0001	0,0000	0,0000	0,0003
<i>Caloramator</i>	0,0005	0,0058	0,0000	0,0001	0,0009
<i>Candidatus_Aquiluna</i>	0,0037	0,0073	0,0016	0,0113	0,0691
<i>Candidatus_Planktophila</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0039
<i>Candidatus_Solibacter</i>	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0009
<i>Candidatus_Udaeobacter</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0038
<i>Candidatus_Xiphinematobacter</i>	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

<i>Catenibacterium</i>	0,0005	0,0000	0,0002	0,0055	0,0042
<i>Cellulomonas</i>	0,0013	0,0030	0,0000	0,0028	0,0034
<i>Cellulosimicrobium</i>	0,0041	0,0035	0,0005	0,0488	0,0004
<i>Cellvibrio</i>	0,0004	0,0011	0,0003	0,0076	0,0104
<i>Chloronema</i>	0,0007	0,0002	0,0005	0,0153	0,0002
<i>Christensenellaceae</i>	0,0009	0,0090	0,0003	0,0000	0,0010
<i>Chroococciopsis</i>	0,0045	0,0030	0,0043	0,0024	0,0008
<i>Chryseobacterium</i>	0,0603	0,8542	0,0730	0,0866	0,2624
<i>Chthoniobacter</i>	0,0009	0,0005	0,0004	0,0175	0,0166
<i>Cloacibacterium</i>	0,0000	0,0051	0,0001	0,0000	0,0008
<i>Clostridium</i>	0,0033	0,0068	0,0009	0,0106	0,0117
<i>Cohnella</i>	0,0032	0,0000	0,0047	0,0003	0,0004
<i>Comamonas</i>	0,0003	0,0151	0,0005	0,0026	0,0197
<i>Conexibacter</i>	0,0013	0,0003	0,0001	0,0027	0,0004
<i>coprostanoligenes</i>	0,0001	0,0079	0,0003	0,0010	0,0068
<i>Corynebacterium</i>	0,0557	0,0204	0,0268	0,1445	0,1671
<i>Coxiella</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0010	0,0090
<i>Cupriavidus</i>	0,0173	0,0001	0,0078	0,0171	0,2418
<i>Curtobacterium</i>	0,0008	0,0017	0,0068	0,0035	0,0006
<i>Curvibacter</i>	0,0002	0,0000	0,0003	0,0004	0,0038
<i>Cutibacterium</i>	0,1413	0,0667	0,0338	0,2940	0,3359
<i>Deinococcus</i>	0,0071	0,0275	0,0009	0,0129	0,0198
<i>Delftia</i>	0,0001	0,0001	0,0000	0,0001	0,0003
<i>Demequina</i>	0,0011	0,0017	0,0002	0,0001	0,0002
<i>Dialister</i>	0,0001	0,0000	0,0001	0,0017	0,0014
<i>Dietzia</i>	0,0078	0,0005	0,0016	0,0026	0,0064
<i>Dolosigranulum</i>	0,0015	0,0114	0,0013	0,0000	0,0005
<i>Domibacillus</i>	0,0025	0,0043	0,0008	0,0001	0,0040
<i>Dyadobacter</i>	0,0024	0,0000	0,0001	0,0102	0,0002
<i>Dysgonomonas</i>	0,0000	0,0144	0,0001	0,0051	0,0004
<i>Empedobacter</i>	0,0451	0,0053	0,0068	0,0260	0,0496
<i>Enterococcus</i>	0,0040	0,1782	0,0017	0,0021	0,0242
<i>Enterorhabdus</i>	0,0025	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000
<i>Enterovibrio</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000
<i>Epulopiscium</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000
<i>Erysipelatoclostridium</i>	0,0001	0,0003	0,0003	0,0000	0,0013
<i>Erysipelothrix</i>	0,0019	0,0054	0,0010	0,0001	0,0065
<i>Ethanoligenens</i>	0,0001	0,1381	0,0001	0,0002	0,0180
<i>Exiguobacterium</i>	0,0009	0,0004	0,0008	0,0145	0,0106
<i>Facklamia</i>	0,0054	0,0002	0,0019	0,0007	0,0034
<i>Faecalibacterium</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0003	0,0001
<i>Fastidiosipila</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
<i>Ferruginibacter</i>	0,0005	0,0001	0,0004	0,0003	0,0030
<i>Fimbrioglobus</i>	0,0013	0,0000	0,0003	0,0212	0,0143
<i>Flavobacterium</i>	0,0185	0,0181	0,0109	0,0536	0,0998
<i>Fluviicola</i>	0,0024	0,0116	0,0016	0,0211	0,0347

<i>Fodinicola</i>	0,0015	0,0066	0,0001	0,0096	0,0170
<i>Fonticella</i>	0,0024	0,0215	0,0005	0,0201	0,0036
<i>Fructobacillus</i>	0,0001	0,0002	0,0046	0,0003	0,0044
<i>Gaiella</i>	0,0090	0,0001	0,0003	0,0065	0,0027
<i>Gemella</i>	0,0047	0,0029	0,0045	0,0016	0,0173
<i>Gemmata</i>	0,0009	0,0007	0,0004	0,0083	0,0034
<i>Gemmatimonas</i>	0,0005	0,0004	0,0002	0,0130	0,0067
<i>Geobacillus</i>	0,0004	0,0873	0,0004	0,0000	0,0026
<i>Geodermatophilus</i>	0,0010	0,0042	0,0002	0,0142	0,0027
<i>Geomicrobium</i>	0,0007	0,0000	0,0006	0,0016	0,0055
<i>Georgenia</i>	0,0004	0,1070	0,0021	0,0001	0,0300
<i>Giesbergeria</i>	0,0000	0,0001	0,0001	0,0037	0,0028
<i>Globicatella</i>	0,0017	0,0006	0,0008	0,0006	0,0019
<i>Glutamicibacter</i>	0,0321	0,0156	0,0017	0,0099	0,0046
<i>Gordonia</i>	0,0008	0,0004	0,0002	0,0010	0,0066
<i>Gottschalkia</i>	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Haemophilus</i>	0,0005	0,0001	0,0003	0,0202	0,0006
<i>Haloechothrix</i>	0,0009	0,0000	0,0001	0,0001	0,0039
<i>Halomonas</i>	0,0029	0,0073	0,0008	0,0023	0,0006
<i>Helcobacillus</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003
<i>Holdemanella</i>	0,0002	0,0000	0,0000	0,0067	0,0017
<i>Hydrocarboniphaga</i>	0,0005	0,0002	0,0001	0,0086	0,0078
<i>Hydrogenophaga</i>	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0041
<i>Hydrogenophilus</i>	0,0050	0,0218	0,0031	0,0114	0,0203
<i>Hymenobacter</i>	0,0043	0,0004	0,0004	0,0011	0,0113
<i>Iamia</i>	0,0019	0,0012	0,0008	0,0160	0,0088
<i>Inhella</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0001	0,0019
<i>Isoptericola</i>	0,0044	0,0469	0,0007	0,0003	0,0151
<i>Janibacter</i>	0,0004	0,0000	0,0006	0,0103	0,0001
<i>Jatrophihabitans</i>	0,0008	0,0000	0,0007	0,0004	0,0010
<i>Jeotgalicoccus</i>	0,0047	0,0005	0,0004	0,0010	0,0174
<i>Kocuria</i>	0,0230	0,0128	0,0047	0,0270	0,0924
<i>Kytococcus</i>	0,0046	0,0001	0,0002	0,0005	0,0011
<i>Lachnoclostridium</i>	0,0001	0,0005	0,0002	0,0001	0,0034
<i>Lachnospiraceae</i>	0,0016	0,0029	0,0009	0,0080	0,0272
<i>Lacihabitans</i>	0,0001	0,0002	0,0001	0,0033	0,0046
<i>Lactobacillus</i>	0,0244	0,0829	0,0257	0,0533	0,1480
<i>Lactococcus</i>	0,0087	0,0016	0,0020	0,0025	0,0004
<i>Lawsonella</i>	0,0056	0,0051	0,0019	0,0157	0,0060
<i>LD29</i>	0,0000	0,0004	0,0004	0,0000	0,0001
<i>Legionella</i>	0,0089	0,0033	0,0020	0,0068	0,0535
<i>Leifsonia</i>	0,0000	0,0109	0,0002	0,0001	0,0016
<i>Leucobacter</i>	0,0018	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
<i>Leuconostoc</i>	0,6459	0,0078	0,0142	0,0268	0,0607
<i>Limnohabitans</i>	0,0002	0,0001	0,0001	0,0019	0,0013
<i>Luteimonas</i>	0,0003	0,0000	0,0000	0,0009	0,0079

<i>Luteolibacter</i>	0,0036	0,0046	0,0014	0,0119	0,0249
<i>Lysinibacillus</i>	0,0001	0,0003	0,0000	0,0002	0,0001
<i>Lysobacter</i>	0,0018	0,0039	0,0016	0,0034	0,0128
<i>Macrococcus</i>	0,0027	0,0002	0,0004	0,0025	0,0135
<i>Marinobacter</i>	0,0004	0,0000	0,0001	0,0005	0,0041
<i>Marinospirillum</i>	0,0006	0,0008	0,0006	0,0044	0,0029
<i>Marmoricola</i>	0,0023	0,0004	0,0039	0,0151	0,0045
<i>Massilia</i>	0,0189	0,0020	0,0023	0,0290	0,0273
<i>Methylotenera</i>	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001	0,0028
<i>Microbacterium</i>	0,0496	0,1418	0,0255	0,0420	0,0832
<i>Micrococcus</i>	0,0063	0,0008	0,0031	0,0008	0,0006
<i>Microcoleus</i>	0,0006	0,0003	0,0011	0,0002	0,0153
<i>Microtrichaceae</i>	0,0007	0,0002	0,0002	0,0004	0,0049
<i>Mobilicoccus</i>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0006	0,0047
<i>Moheibacter</i>	0,0006	0,0242	0,0005	0,0079	0,0026
<i>Mycobacterium</i>	0,0035	0,0005	0,0014	0,0009	0,0066
<i>Myxosarcina</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0144
<i>Neisseria</i>	0,0018	0,0005	0,0007	0,0014	0,0040
<i>Nesterenkonia</i>	0,0210	0,0253	0,0081	0,1428	0,0456
<i>Nocardioides</i>	0,0403	0,0414	0,0114	0,0595	0,0716
<i>Nocardiopsis</i>	0,0002	0,0001	0,0002	0,0005	0,0021
<i>Novosphingobium</i>	0,0695	0,0016	0,0034	0,0081	0,0035
<i>Oceanobacillus</i>	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0038
<i>Ochrobactrum</i>	0,0002	0,0086	0,0002	0,0008	0,0017
<i>Ornithinibacillus</i>	0,0015	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000
<i>Ornithinimicrobium</i>	0,0064	0,0003	0,0009	0,0062	0,0013
<i>Oscillibacter</i>	0,0002	0,0000	0,0006	0,0000	0,0059
<i>Paenibacillus</i>	0,0098	0,0056	0,0094	0,0034	0,0336
<i>Paludibacter</i>	0,0017	0,0000	0,0001	0,0000	0,0041
<i>Pantoea</i>	0,0008	0,0001	0,0004	0,0004	0,0005
<i>Parabacteroides</i>	0,0028	0,0231	0,0011	0,0012	0,0127
<i>Paracoccus</i>	0,0015	0,0011	0,0003	0,0014	0,0025
<i>Parviterribacter</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0005	0,0091
<i>Patulibacter</i>	0,0009	0,0000	0,0013	0,0004	0,0063
<i>Peptoniphilus</i>	0,0071	0,0004	0,0032	0,0092	0,0062
<i>Peptostreptococcus</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,0002	0,0000	0,0002	0,0050	0,0128
<i>Photobacterium</i>	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Pirellula</i>	0,0010	0,0004	0,0001	0,0041	0,0114
<i>Planktothrix</i>	0,0004	0,0002	0,0007	0,0006	0,0035
<i>Pleurocapsa</i>	0,0014	0,0059	0,0010	0,0029	0,0015
<i>Polynucleobacter</i>	0,0015	0,0074	0,0003	0,0072	0,0036
<i>Pontibacter</i>	0,0009	0,0000	0,0004	0,0001	0,0074
<i>Porphyromonas</i>	0,0001	0,0001	0,0000	0,0002	0,0056
<i>Prauserella</i>	0,0102	0,0015	0,0007	0,0285	0,0074
<i>Prevotella</i>	0,0132	0,0237	0,0042	0,1579	0,1366

<i>Promicromonospora</i>	0,0007	0,0005	0,0005	0,0015	0,0053
<i>Prostheco bacter</i>	0,0025	0,0171	0,0079	0,0403	0,0412
<i>Proteiniphilum</i>	0,0009	0,0358	0,0002	0,0000	0,0055
<i>Pseudacidovorax</i>	0,0004	0,0001	0,0003	0,0006	0,0005
<i>Pseudarcicella</i>	0,0024	0,0030	0,0025	0,0151	0,0145
<i>Pseudogracilibacillus</i>	0,0002	0,0000	0,0001	0,0001	0,0026
<i>Pseudokineococcus</i>	0,0001	0,0000	0,0001	0,0001	0,0033
<i>Pseudomonas</i>	1,5814	0,0518	0,1147	0,4920	0,2807
<i>Pseudonocardia</i>	0,0067	0,0163	0,0027	0,0139	0,0201
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,0034	0,0243	0,0000	0,0008	0,0004
<i>Psychrobacter</i>	0,0012	0,0028	0,0004	0,0021	0,0036
<i>Ralstonia</i>	0,0498	0,0069	0,0048	0,0066	0,0094
<i>Rhodococcus</i>	0,0014	0,0008	0,0011	0,0107	0,0055
<i>Rhodoluna</i>	0,0005	0,0000	0,0014	0,0008	0,0047
<i>Rickettsiella</i>	0,0140	0,0012	0,0002	0,0006	0,0041
<i>Rikenellaceae</i>	0,0017	0,0038	0,0001	0,0037	0,0168
<i>Rothia</i>	0,0007	0,0004	0,0010	0,0065	0,0065
<i>Rubrobacter</i>	0,0130	0,0004	0,0015	0,0016	0,0030
<i>Ruminiclostridium</i>	0,0058	0,0168	0,0048	0,0038	0,0108
<i>Ruminococcaceae</i>	0,0026	0,0168	0,0047	0,0384	0,0427
<i>Ruminococcus</i>	0,0011	0,0002	0,0007	0,0009	0,0184
<i>Saccharibacillus</i>	0,0000	0,0024	0,0001	0,0005	0,0001
<i>Saccharopolyspora</i>	0,0146	0,0040	0,0057	0,0125	0,0708
<i>Schlegelella</i>	0,0063	0,0135	0,0022	0,0032	0,0097
<i>Sediminibacterium</i>	0,0002	0,0003	0,0001	0,0026	0,0008
<i>Selenomonas</i>	0,0005	0,0001	0,0001	0,0017	0,0060
<i>Serratia</i>	0,0035	0,0011	0,0016	0,0040	0,0180
<i>Simplicispira</i>	0,0003	0,0024	0,0002	0,0003	0,0060
<i>Singulisphaera</i>	0,0003	0,0000	0,0001	0,0027	0,0041
<i>Sinomonas</i>	0,0020	0,0002	0,0002	0,0035	0,0028
<i>Sodalis</i>	0,0006	0,0003	0,0007	0,0006	0,0006
<i>Solirubrobacter</i>	0,0061	0,0004	0,0011	0,0013	0,0066
<i>Spiroplasma</i>	6,4769	3,3292	1,7078	9,0633	6,7177
<i>Sporichthyaceae</i>	0,0007	0,0005	0,0003	0,0047	0,0153
<i>Staphylococcus</i>	0,0003	0,0001	0,0001	0,0005	0,0004
<i>Stenotrophomonas</i>	0,0166	0,0050	0,0074	0,0283	0,0717
<i>Streptococcus</i>	0,0155	0,0301	0,0298	0,0295	0,0949
<i>Streptomyces</i>	0,0056	0,0037	0,0005	0,0008	0,0118
<i>Subdoligranulum</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Tamaricihabitans</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0083	0,0000
<i>Telmatocola</i>	0,0001	0,0002	0,0001	0,0060	0,0036
<i>Tepidimicrobium</i>	0,0019	0,0042	0,0005	0,0008	0,0035
<i>Tepidimonas</i>	0,0021	0,0320	0,0015	0,0007	0,0044
<i>Tepidiphilus</i>	1,0588	2,8348	0,4720	0,9006	1,5102
<i>Terrabacter</i>	0,0066	0,0000	0,0002	0,0021	0,0001
<i>Terrimonas</i>	0,0001	0,0006	0,0002	0,0024	0,0035

<i>Thermicanus</i>	0,0009	0,0642	0,0018	0,0006	0,0224
<i>Thermoactinomyces</i>	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002
<i>Thermomonas</i>	0,0134	0,0352	0,0100	0,0142	0,0359
<i>Thermosinus</i>	0,0009	0,0009	0,0003	0,0004	0,0027
<i>Thermus</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Truepera</i>	0,0006	0,0004	0,0001	0,0003	0,0019
<i>Tsukamurella</i>	0,0007	0,0000	0,0002	0,0001	0,0056
<i>Tumebacillus</i>	0,0011	0,0001	0,0001	0,0000	0,0008
<i>Turicella</i>	0,0025	0,0052	0,0008	0,0031	0,0178
<i>Turneriella</i>	0,0001	0,0002	0,0005	0,0055	0,0043
<i>Tyzzarella</i>	0,0001	0,0000	0,0001	0,0011	0,0082
<i>uncultured_bacterium</i>	0,0728	0,5107	0,0334	0,3448	0,5380
<i>Undibacterium</i>	0,0867	0,0754	0,1354	0,2902	0,2448
<i>Ureibacillus</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0090	0,0000
<i>Veillonella</i>	0,0031	0,0000	0,0004	0,0017	0,0100
<i>Vibrio</i>	0,0018	0,0321	0,0009	0,0014	0,0034
<i>Virgibacillus</i>	0,0039	0,0000	0,0001	0,0002	0,0000
<i>Weissella</i>	0,0027	0,0018	0,0075	0,0513	0,0291
<i>Wigglesworthia</i>	86,0771	89,9587	96,8425	85,7460	86,2654
<i>Yersinia</i>	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001	0,0113
<i>Zavarzinella</i>	0,0001	0,0000	0,0001	0,0003	0,0063
<i>Zymophilus</i>	0,0002	0,0000	0,0000	0,0110	0,0000

Les valeurs surlignées en jaune pointent les bactéries qui n'ont pas passé nos différents filtres du fait de leur abondance relative inférieure au seuil fixé ; les fréquences surlignées en rouge sont celles où le genre correspondant y était absent ; (%) : pourcentage.

III.1.3.5. Variation de la composition de la flore bactérienne intestinale des glossines en fonction de la présence ou l'absence des trypanosomes

Le tableau X présente les fréquences des genres bactériens chez toutes les glossines et chez celle infectées et non infectées par les trypanosomes. On note que 36 genres bactériens n'étaient uniquement présents que chez les glossines non-infectées, leurs fréquences chez les glossines infectées n'atteignant pas le seuil de détection ; Leurs fréquences variaient entre 0,01 et 0,21%, la plupart se situait entre 0,01% et 0,03%. Les genres *Cellulosimicrobium* et *Geobacillus* n'étaient hébergés que par les glossines infectées de trypanosomes, avec des fréquences respectives de 0,013 et de 0,018%.

Tableau X : Fréquences des genres bactériens en fonction du statut infectieux

Glossines		Total (160)		Non-infectés (80)		Infectées (80)	
Nombre total des séquences		28 668 631		14 133 759		14 534 872	
Phylums	Genres	Nb séquences	freq.	Nb séquences	freq.	Nb séquences	freq.
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	2543	0,0089	1551	0,011	992	0,0068
	<i>Brachybacterium</i>	8899	0,031	5556	0,0393	3343	0,023
	<i>Brevibacterium</i>	2484	0,0087	1433	0,0101	1051	0,0072
	<i>Candidatus aquiluna</i>	9283	0,0324	6948	0,0492	2335	0,0161
	<i>Cellulosimicrobium</i>	2285	0,008	375	0,0027	1910	0,0131
	<i>Corynebacterium</i>	31027	0,1082	15630	0,1106	15397	0,1059
	<i>Cutibacterium</i>	65278	0,2277	46034	0,3257	19244	0,1324
	<i>Fodinicola</i>	2730	0,0095	1972	0,014	758	0,0052
	<i>Georgenia</i>	7014	0,0245	3519	0,0249	3495	0,024
	<i>Glutamicibacter</i>	4007	0,014	2880	0,0204	1127	0,0078
	<i>Isoptericola</i>	3644	0,0127	2146	0,0152	1498	0,0103
	<i>Kocuria</i>	14452	0,0504	8628	0,061	5824	0,0401
	<i>Microbacterium</i>	20410	0,0712	13138	0,093	7272	0,05
	<i>Nesterenkonia</i>	13360	0,0466	6681	0,0473	6679	0,046
	<i>Nocardioides</i>	15538	0,0542	10639	0,0753	4899	0,0337
	<i>Pseudonocardia</i>	4022	0,014	2347	0,0166	1675	0,0115
	<i>Saccharopolyspora</i>	106	0,0004	6700	0,0474	3683	0,0253
	<i>Sporichthyaceae_hgcI_clade</i>	2088	0,0073	1886	0,0133	202	0,0014
	<i>Streptomyces</i>	2027	0,0071	1820	0,0129	207	0,0014
	<i>Turicella</i>	2637	0,0092	2187	0,0155	450	0,0031
Bacteroidetes	<i>Alistipes</i>	3158	0,011	1717	0,0121	1441	0,0099
	<i>Alloprevotella</i>	3430	0,012	3380	0,0239	50	0,0003
	<i>Bacteroides</i>	17756	0,0619	11090	0,0785	6666	0,0459
	<i>Bergeyella</i>	8806	0,0307	5639	0,0399	3167	0,0218
	<i>Chryseobacterium</i>	67473	0,2354	26173	0,1852	41300	0,2841
	<i>Empedobacter</i>	10833	0,0378	7289	0,0516	3544	0,0244
	<i>Flavobacterium</i>	16237	0,0566	11242	0,0795	4995	0,0344
	<i>Fluviicola</i>	5534	0,0193	3528	0,025	2006	0,0138
	<i>Hymenobacter</i>	1756	0,0061	1577	0,0112	179	0,0012
	<i>Parabacteroides</i>	2534	0,0088	1592	0,0113	942	0,0065
	<i>Prevotella</i>	24117	0,0841	21883	0,1548	2234	0,0154
	<i>Pseudarcicella</i>	2629	0,0092	2069	0,0146	560	0,0039
	<i>Rikenellaceae</i>	2416	0,0084	2045	0,0145	371	0,0026

Cyanobacteria	<i>Myxosarcina</i>	1746	0,0061	1692	0,012	54	0,0004
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	4292	0,015	2047	0,0145	2245	0,0154
Firmicutes	<i>Aerococcus</i>	6325	0,0221	3715	0,0263	2610	0,018
	<i>Atopostipes</i>	6227	0,0217	3889	0,0275	2338	0,0161
	<i>Bacillus</i>	64222	0,224	35875	0,2538	28347	0,195
	<i>Enterococcus</i>	8883	0,031	2957	0,0209	5926	0,0408
	<i>Ethanoligenens</i>	6474	0,0226	2155	0,0152	4319	0,0297
	<i>Gemella</i>	2684	0,0094	2450	0,0173	234	0,0016
	<i>Geobacillus</i>	3073	0,0107	332	0,0023	2741	0,0189
	<i>Jeotgalicoccus</i>	2530	0,0088	2207	0,0156	323	0,0022
	<i>Lachnospiraceae</i>	3797	0,0132	3284	0,0232	513	0,0035
	<i>Lactobacillus</i>	24786	0,0865	11639	0,0823	13147	0,0905
	<i>Leuconostoc</i>	60567	0,2113	28888	0,2044	31679	0,218
	<i>Macrococcus</i>	1940	0,0068	1842	0,013	98	0,0007
	<i>Paenibacillus</i>	5306	0,0185	4408	0,0312	898	0,0062
	<i>Phascolarctobacterium</i>	1742	0,0061	1668	0,0118	74	0,0005
	<i>Ruminiclostridium</i>	2515	0,0088	1713	0,0121	802	0,0055
	<i>Ruminococcaceae</i>	7367	0,0257	5482	0,0388	1885	0,013
	<i>Ruminococcus</i>	2358	0,0082	2194	0,0155	164	0,0011
	<i>Streptococcus</i>	15232	0,0531	12992	0,0919	2240	0,0154
	<i>Thermicanus</i>	4824	0,0168	2668	0,0189	2156	0,0148
	<i>Weissella</i>	5798	0,0202	3331	0,0236	2467	0,017
Planctomycetes	<i>Blastopirellula</i>	1597	0,0056	1463	0,0104	134	0,0009
	<i>Fimbriiglobus</i>	2620	0,0091	2107	0,0149	513	0,0035
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	269894	0,9414	233643	1,6531	36251	0,2494
	<i>Altererythrobacter</i>	3170	0,0111	2979	0,0211	191	0,0013
	<i>Comamonas</i>	2974	0,0104	2275	0,0161	699	0,0048
	<i>Cupriavidus</i>	31291	0,1091	30520	0,2159	771	0,0053
	<i>Hydrogenophilus</i>	3996	0,0139	2610	0,0185	1386	0,0095
	<i>Legionella</i>	7539	0,0263	6748	0,0477	791	0,0054
	<i>Lysobacter</i>	1960	0,0068	1603	0,0113	357	0,0025
	<i>Massilia</i>	5974	0,0208	4195	0,0297	1779	0,0122
	<i>Novosphingobium</i>	6396	0,0223	5828	0,0412	568	0,0039
	<i>Pseudomonas</i>	182344	0,636	139543	0,9873	42801	0,2945
	<i>Ralstonia</i>	5665	0,0198	5011	0,0355	654	0,0045
	<i>Rickettsiella</i>	1675	0,0058	1513	0,0107	162	0,0011
	<i>Schlegelella</i>	2254	0,0079	1427	0,0101	827	0,0057
	<i>Stenotrophomonas</i>	11291	0,0394	9221	0,0652	2070	0,0142

	<i>Tepidiphilus</i>	396494	1,383	218034	1,5426	178460	1,2278
	<i>Thermomonas</i>	7202	0,0251	4863	0,0344	2339	0,0161
	<i>Undibacterium</i>	51915	0,1811	32589	0,2306	19326	0,133
	<i>Wigglesworthia</i>	25005181	87,2215	12218942	86,4522	12786239	87,9694
Tenericutes	<i>Spiroplasma</i>	1795869	6,2642	675703	4,7808	1120166	7,7067
Verrucomicrobia	<i>Chthoniobacter</i>	2738	0,0096	2361	0,0167	377	0,0026
	<i>Luteolibacter</i>	3886	0,0136	3527	0,025	359	0,0025
	<i>Prothecobacter</i>	7319	0,0255	4955	0,0351	2364	0,0163
.....	<i>uncultured_bacterium</i>	99779	0,348	63957	0,4525	35822	0,2465

*Nb= nombre ; nombre en rouge : abondance en deçà de 0.01% ; freq : fréquence.

La comparaison des fréquences de détection des 11 genres bactériens majoritairement représentés dans le microbiome des glossines en fonction de leur statut infectieux ou non a révélé que la fréquence de *Wigglesworthia* a été statistiquement plus élevée chez les glossines infectées (87,96) que chez celles non infectées soit, 86,45% (P = 0,032) (tableau XI). Les genres *Bacillus*, *Cutibacterium*, *Pseudomonas* et *Tepidiphilus* ont été plus fréquemment (P<0,05) isolés chez les glossines non-infectées que chez celles infectées. Pour les 6 autres genres le taux de détection n'a pas varié en fonction du statut des glossines. Lors de la compilation du test de Wilcoxon et du LEfSe score, les genres *Bacteroides*, *Georgenia* et *Prothecobacter* étaient associés à l'infection des glossines (P<0,05).

Tableau XI : Comparaison des fréquences de détection de 11 genres bactériens majoritaires du microbiome de l'ensemble des glossines en fonction du statut infectieux

Genres	Toutes les glossines (N=160)	Glossines Non-infectées (N=80)	Glossines Infectée (N=80)	Valeur de P
<i>Acinetobacter</i>	0,94	1,65	0,24	0,051
<i>Bacillus</i>	0,11	0,25	0,19	0,008
<i>Chryseobacterium</i>	0,24	0,19	0,28	0,2
<i>Cutibacterium</i>	0,23	0,32	0,13	0,00012
<i>Leuconostoc</i>	0,21	0,2	0,21	0,48
<i>Pseudomonas</i>	0,64	0,98	0,29	0,0063
<i>Spiroplasma</i>	6,26	4,78	7,7	0,12
<i>Tepidiphilus</i>	1,38	1,54	1,22	0,025
<i>Undibacterium</i>	0,18	0,23	0,13	0,25
<i>Wigglesworthia</i>	87,22	86,45	87,96	0,032
<i>Uncultured Bacterium</i>	0,34	0,45	0,24	0,45

III.1.3.6. Diversité microbienne des glossines

- **Alpha diversité**

Globalement aucune différence significative (indice de Shannon) n'a été observée entre les valeurs de l'indice de Shannon concernant la diversité bactérienne des glossines infectées et de celles non infectées (P=0,11) ou encore la diversité microbienne des glossines en fonctions des sites de collecte (P=0,22). Par contre la figure 16 (C, D) montre que les richesses spécifiques des microbiomes des glossines infectées étaient bien différentes de celles non infectées, de même que celles entre les différents sites de collecte (P< 0,05) . De même, une différence entre les diversités spécifiques bactérienne des glossines hébergeant *T. congolense* type Savane et celles non-infectées a été observée (P= 0,047) (Figure 16. E.).

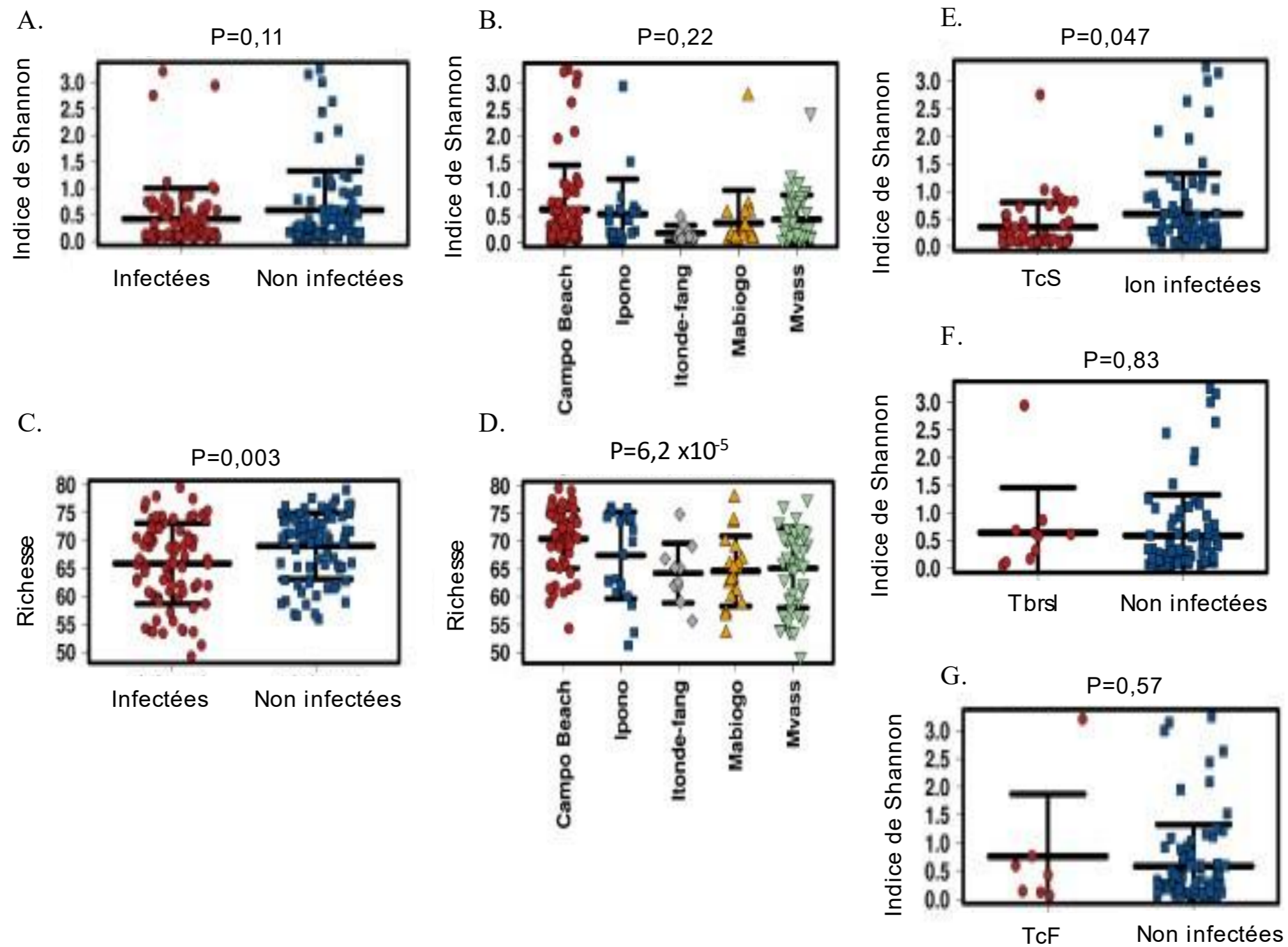


Figure 16 : Comparaison des diversités des microbiomes des glossines.

A, C : statut d'infection des glossines ; B, D : origine des glossines ; E, F, G : espèces de trypanosomes abritées par les glossines. TcF : *Trypanosoma congolense* type Forêt, TcS : *Trypanosoma congolense* type Savane, Tbrsl : *Trypanosoma brucei* sensu-lato.

- **Beta diversité**

L'analyse principale des coordonnées (PCoA), montrant la distribution de 160 échantillons (glossines) en fonction de la composition de leurs microbiotes (distribution bactérienne) (Fig. 17), a mis en évidence 4 clusters selon le site de collecte (fig. 17C), l'analyse de la variance permutatoire (PERMANOVA) basée sur chacun de ces composants (distribution bactérienne et abondance relative) a montré qu'il y avait des différences statistiquement significatives de composition du microbiote des glossines en fonction du site d'échantillonnage avec une valeur de probabilité $P = 0,0003$. En outre, bien que l'analyse multivariée ait montré des différences statistiquement significatives selon l'état infectieux ($P = 0,0003$) et la sous-espèce de parasites abritée ($P = 0,0001$), la distribution des échantillons provenant de glossines infectées et des glossines non infectées en général ou de glossines non infectées et de glossines infectées par différentes espèces/sous-espèces de trypanosomes a été homogène, ceci quels que soient les 4 clusters (Fig. 17A, B).

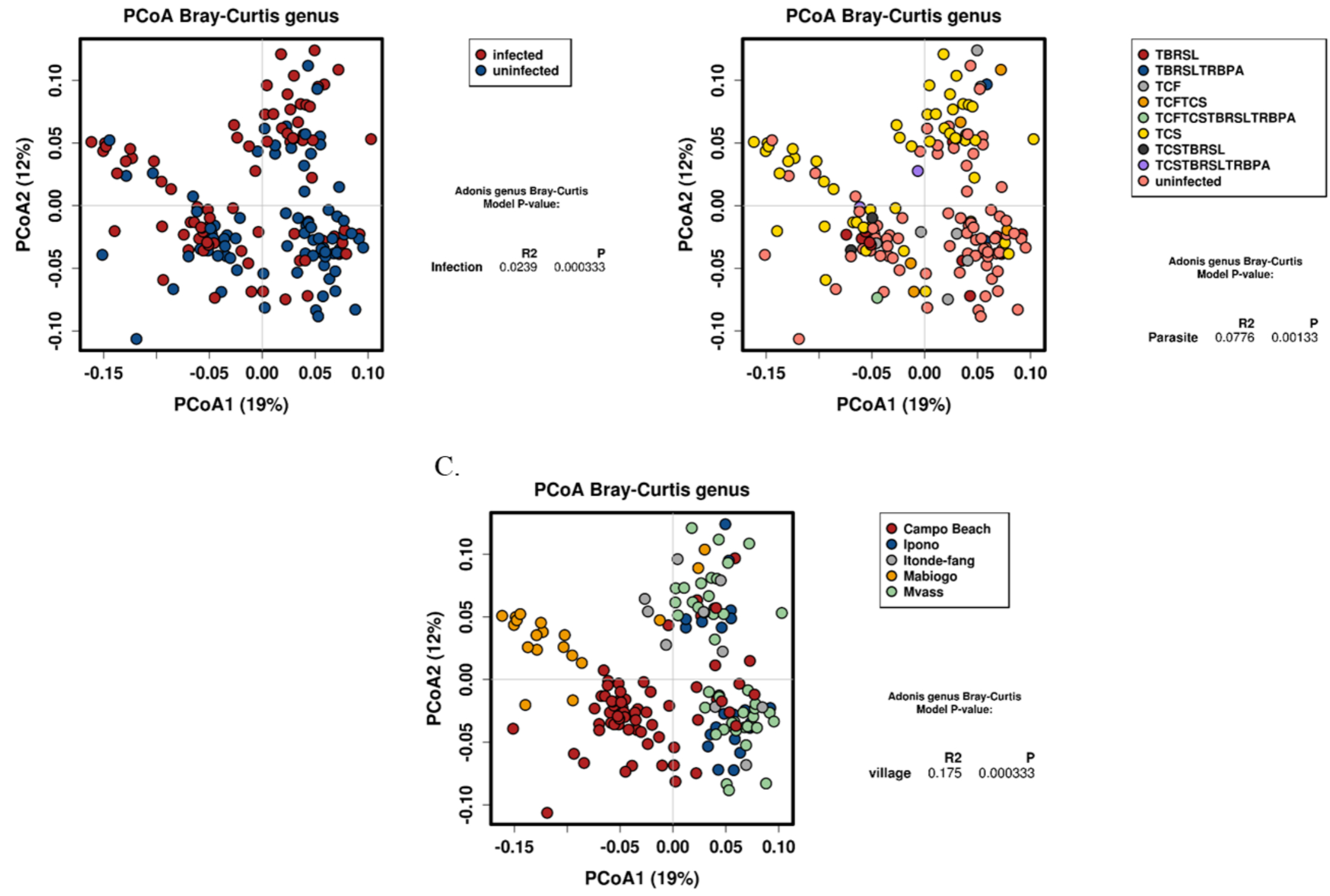


Figure 17 : Répartition des échantillons de mouches tsé-tsé en fonction de la composition de leurs microbiotes

Répartition faite d'après l'analyse des coordonnées principales (PCoA) à l'aide de l'indice de Bray-Curtis en fonction de l'état d'infection (A), de l'espèce de *Trypanosoma* (B) et des sites d'échantillonnage (C) TcF : *Trypanosoma congolense* type Forêt, TCS : *Trypanosoma congolense* type Savanne, Tbrsl : *Trypanosoma brucei* sensu lato, Trbpa *Trypanosoma brucei gambiense*.

Pour affiner nos résultats, une analyse canonique de correspondance (CCA) (Fig. 18) a été effectuée ce qui a mis en évidence une différence de composition de la flore microbienne entre les glossines infectées et les glossines non infectées ($P = 0,001$).

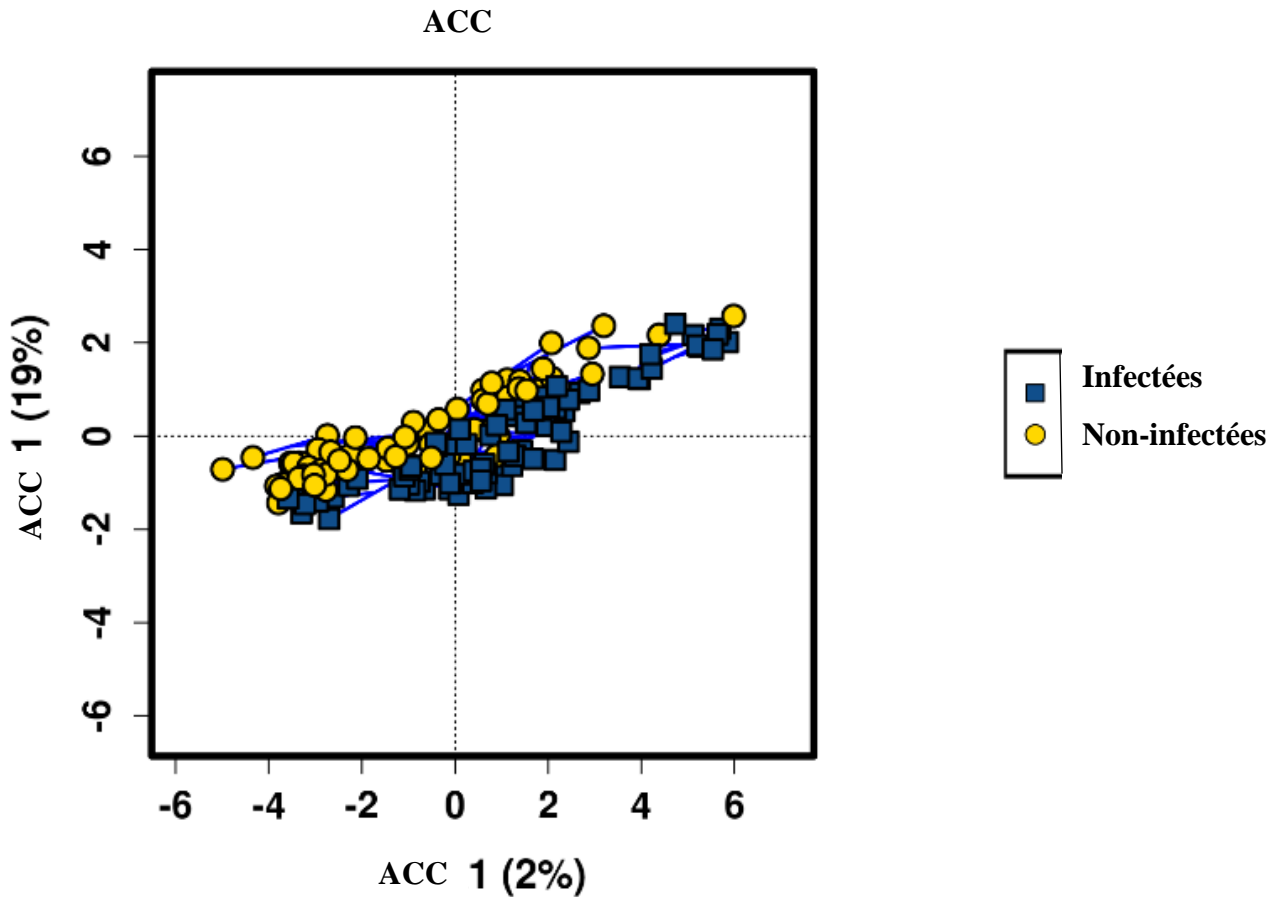


Figure 18 : Comparaison des microbiomes des glossines infectées et des non infectées
Comparaison faite d'après l'analyse de correspondance canonique (ACC) à l'aide de l'indice de diversité de Bray Curtis basé sur le statut d'infection des 160 mouches tsé-tsé

Enfin, un regroupement hiérarchique a donné lieu à un dendrogramme qui a révélé l'existence de plusieurs grappes non associées à l'état d'infection des mouches tsé-tsé, et aux sites d'échantillonnage d'où elles provenaient (Fig. 19). Tous ces résultats peuvent indiquer qu'au-delà de la présence des trypanosomes et/ou des sites d'échantillonnage (différences d'environnement), il existe d'autres facteurs qui pourraient moduler la composition de la flore bactérienne des glossines.

genus Bray-Curtis

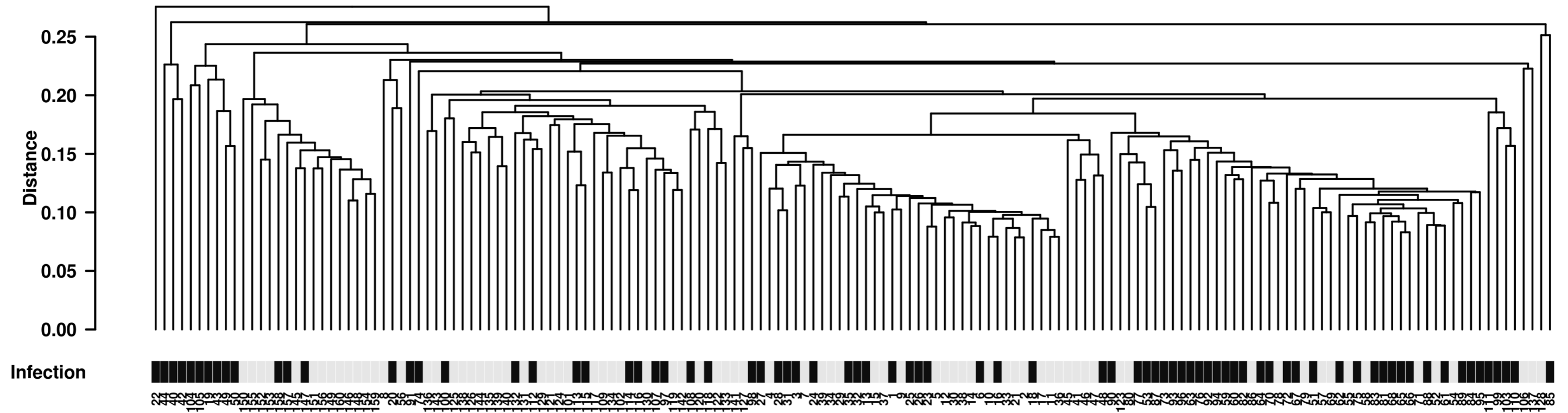


Figure 19 : Relation entre les différentes glossines en fonction de leurs microbiomes

Relation entre différents échantillons (représentés par leur identifiant : numéro au bas du dendrogramme) en fonction des taxa bactériens qu'ils hébergent en utilisant un regroupement hiérarchique basé sur les valeurs de l'indice de Bray-Curtis. Les cases au-dessus des identifiants indiquent l'état d'infection des glossines (cases noires : non infecté ; cases grises : infecté).

III.1.4. Effets de deux molécules candidates sur l'installation du trypanosome dans l'intestin moyen des glossines

III.1.4.1. Plasmides recombinants obtenus

III.1.4.1.1. Séquences d'intérêts amplifiées et purifiées

L'amplification des gènes d'intérêts a été effectuée avant toute forme de modification génétique. Pour ce faire, les gènes codant pour la *TbgTCTP* et la cécropine ont été amplifiés via la PCR puis migrés sur gel d'agarose et révélés sous U.V(Figure 20)

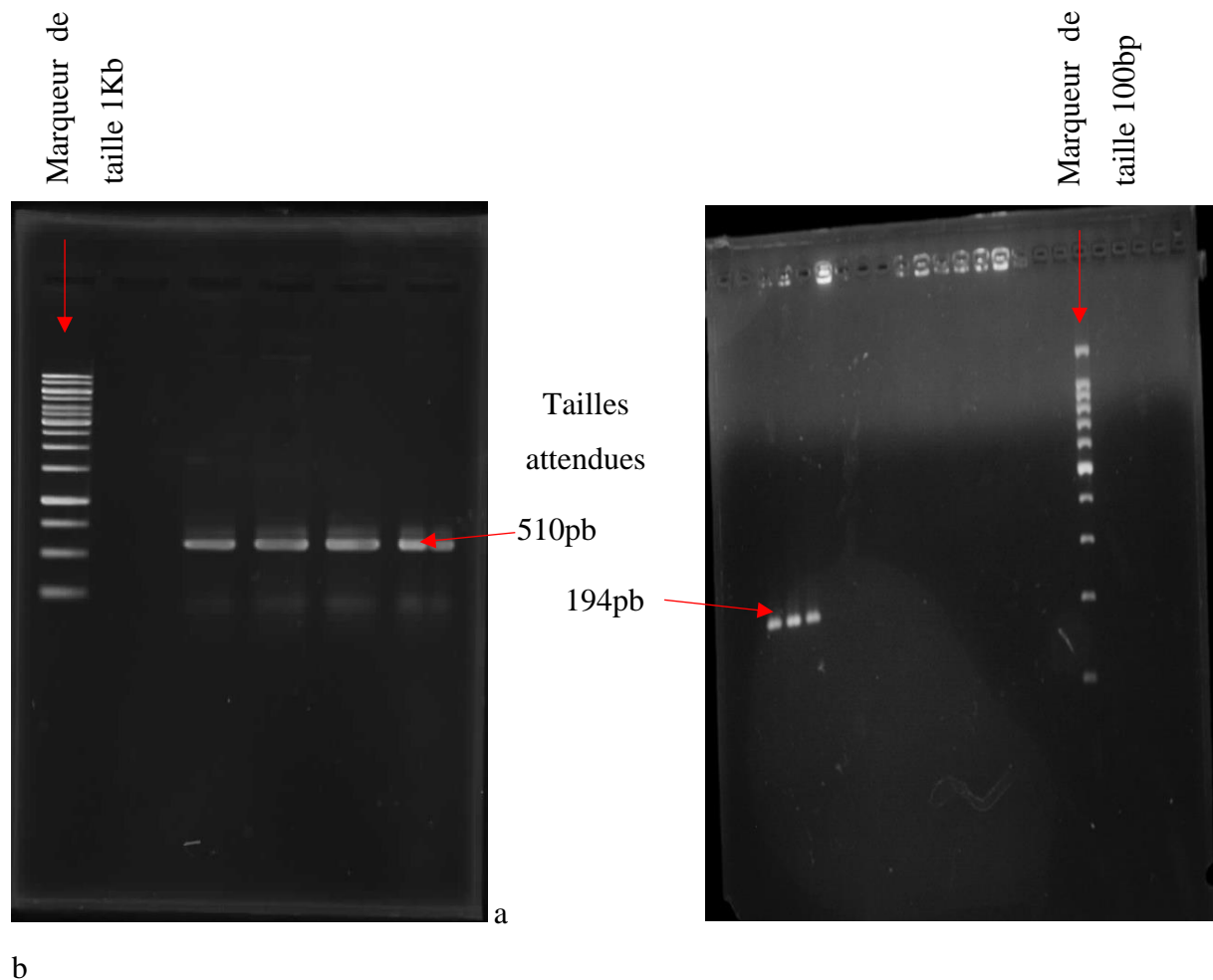


Figure 20 : Profil de migration des gènes codant pour les protéines étudiées

(a= *TbgTCTP* ; b= cécropine)

Les produits d'amplification des gènes codant pour la *TbgTCTP* et la cécropine avaient pour tailles respectives 510 pb et 194 pb. Après purification de ces produits et séquençage, nous

avons obtenu une similitude de 98% entre les séquences de nucléotides des gènes codant pour les protéines d'intérêts et les produits issus de la purification.

III.1.4.1.2. Plasmides recombinants obtenus

Les unités formant colonies (UFC) de couleur blanche (Figure 21) étaient celles portant les plasmides recombinants. La quantification des plasmides purifiés, après leurs multiplications par culture des bactéries les hébergeant, a été faite à l'aide du Nanodrop® avec pour valeurs respectives pour la *TbgTCTP* et la cécropine : 669,69ng/μl ($A_{260/280} = 1,93$) ; 115,14 ng/μl ($A_{260/280} = 1,87$). Une similitude de 98% entre les séquences de nucléotides des gènes codant pour les protéines d'intérêts et les produits de purification a été mise en évidence par la plateforme NCBI blast.

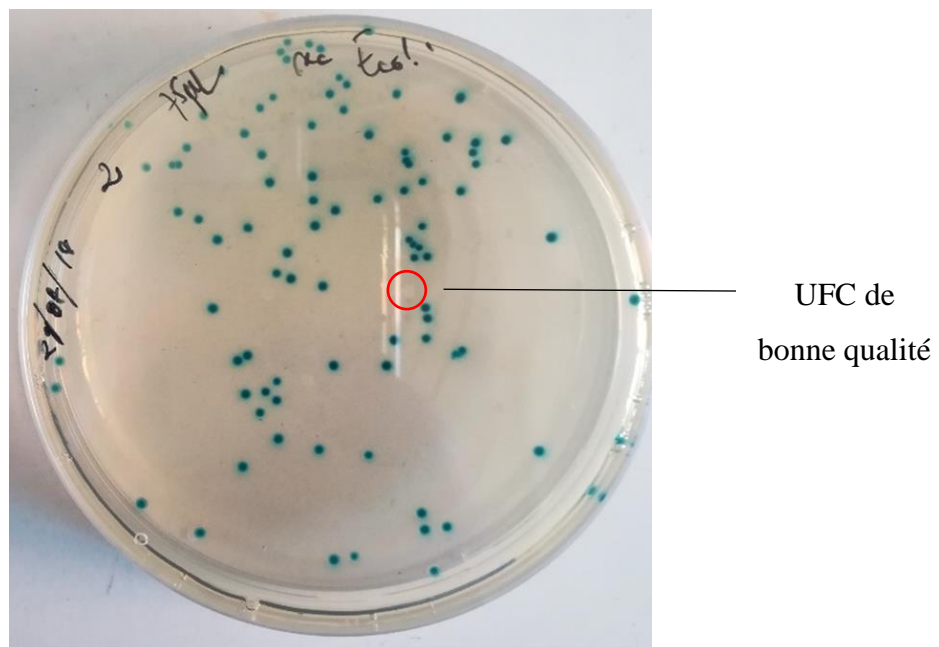


Figure 21 : Unités formant colonies après insertion du plasmide recombinant sur des TOP10.

III.1.4.2. Transformation de *Sodalis glossinidius* en bactérie chimiquement compétente et insertion des plasmides recombinants

La figure 22 présente une culture de *S. glossinidius* en bactérie chimiquement compétente, c'est-à-dire en bactérie dans laquelle on peut procéder à l'incorporation d'ADN extrachromosique ou de plasmide.



Figure 22 : Culture de *Sodalis glossinidius* compétent

▪ **Résultat des expressions protéiques des bactéries recombinantes**

La vérification de l'expression protéique des bactéries au début des phases stationnaires (OD600 0,5- 0,6), avant l'introduction des cellules de *Sodalis* recombinant (rec*Sodalis*) dans les glossines expérimentales, nous a donné les profils d'expressions observés dans la figure 23.

- Pour la cécropine de très petite taille (~5kDa : taille attendue), nous avons obtenu un fort signal aux alentours de 10 KDa ; ce signal est proche de celui de la cécropine car présent uniquement chez *Sodalis* recombinant cultivé en présence de l'arabinose, sucre induisant la production d'une protéine d'intérêt par le plasmide vecteur (Figure 23a).

- Pour la rTbgTCTP, sur la membrane PVDF (membrane de révélation) nous avons observé une bande ayant 2 fois la taille attendue (Figure 23b). Bien que l'anticorps utilisée lors de l'immunocoloration soit celui spécifique à notre protéine d'intérêt, ce qui confirme la production de notre protéine, d'autres questions émergent par exemple: s'agit-il d'une dimérisation ? Ce serait-elle liée à une protéine de surface de même poids ?

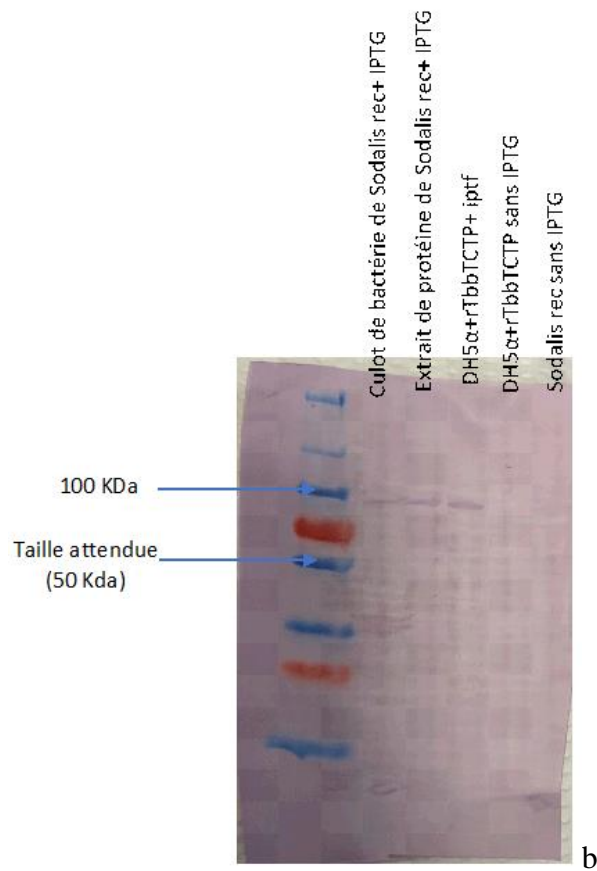
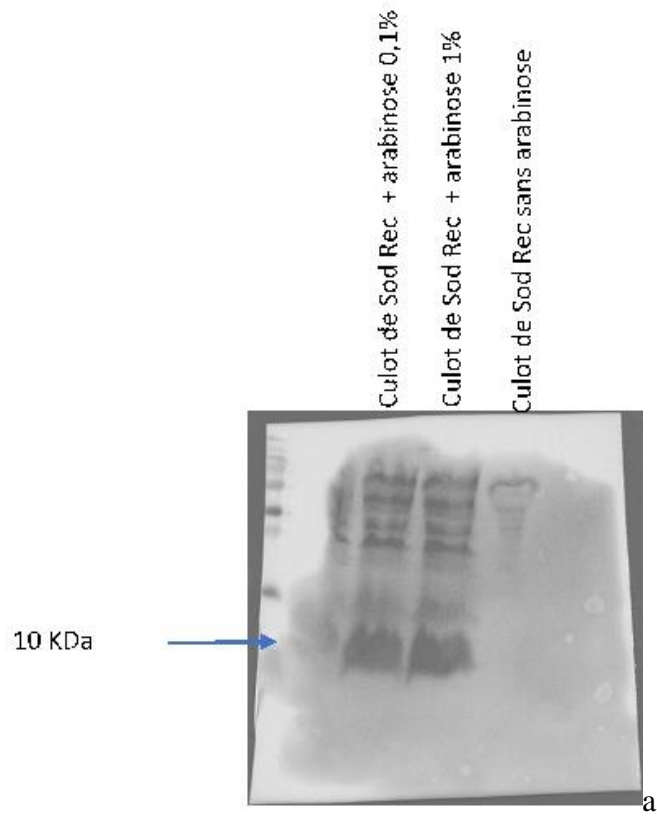


Figure 23 : Bandes de vérification de l'expression des protéines d'intérêts
(a= cécropine ; b= *rTbgTCTP*)

III.1.4.3. Micro-injection des glossines et infections expérimentales

III.1.4.3.1. Taux de réussite des micro-injections sur des larves de glossines de stade III

La Figure 24 ci-dessous récapitule l'ensemble des micro-injections effectuées aux glossines, le nombre d'émergences de glossines observées, et le nombre de glossines disséquées. De manière générale, sur les expérimentations de micro-injections des 2 catégories de *Sodalis* recombinants, le lot témoin sans micro-injection a servi de référence. Après observation, il ressort que 115 (soit environ 95%) de glossines provenant du lot témoin (sans micro-injection) ont émergé. Les taux d'émergence des glossines des lots témoins micro-injectés avec de l'eau physiologique lors des deux expérimentations étaient respectivement de 50,70% et de 70,06%. Il apparaît qu'il y a probablement un « effet micro-injection » sur le taux d'émergence des glossines.

Les taux d'émergence des glossines portant les souches de *Sodalis* recombinants étaient de 50,97% et 6,71% respectivement pour celles portant les gènes codant pour la cécropine et la *rTbgTCTP*. Ces taux d'émergence révèlent que la micro-injection des *Sodalis* recombinants portant le gène codant pour la *rTbgTCTP* des stades larvaires III des glossines influe sur le développement larvaire de ces glossines en entraînant une mortalité plus élevée des pupes.

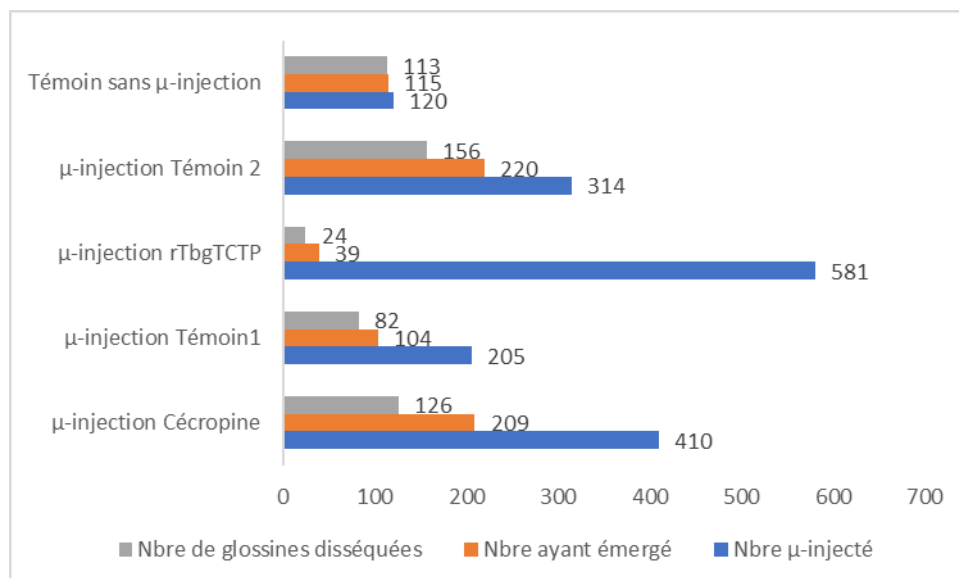


Figure 24 : Diagramme récapitulatif des micro-injections

III.1.4.3.2. Effet de la micro-injection sur le développement de la glossine durant la pupaison

Pour comprendre la différence entre les taux d'émergence des glossines non-micro-injectées et celles micro-injectées (données de la première expérimentation), nous avons eu à comparer le poids des pupes sans et après micro-injection à l'aide du test de Student. Après analyse, nous avons observé que la différence des poids n'était pas statistiquement significative ($P= 0,061$). Ceci laisse penser que l'injection n'a pas une grande incidence sur le développement des larves contrairement au produit micro-injecté. En effet dans le cas de la *rTbgTCTP* le taux d'émergence était de 6,71% contre 70,06% dans le groupe témoin, alors que pour la cécropine, le taux d'émergence était de 50,97 % contre 50,7 % dans le groupe témoin).

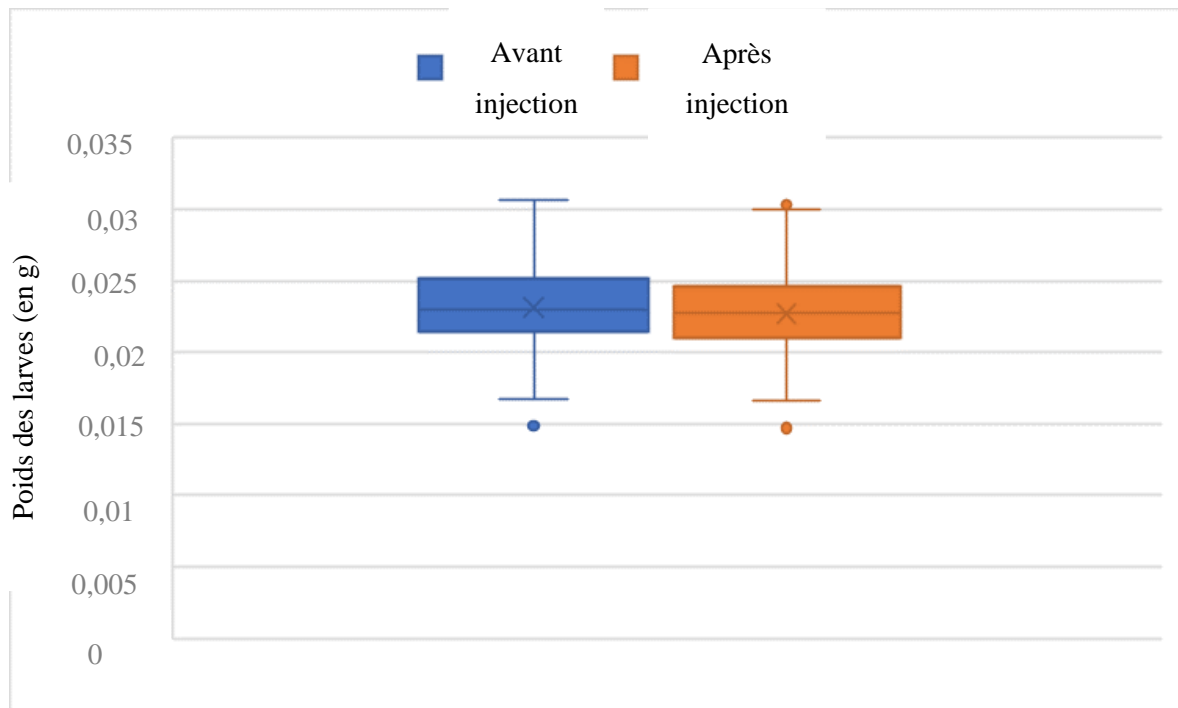


Figure 25 : Box plot présentant le poids des pupes avant et après micro-injection de larves.

III.1.4.4. Vérification de l'installation du parasite chez les glossines micro-injectées

III.1.4.4.1. Vérification de la présence des symbiontes recombinants dans les glossines micro-injectées

Afin de valider l'action de la para-transgénése des protéines recombinantes d'intérêt sur l'installation des trypanosomes dans l'intestin moyen des glossines, nous avons au préalable

vérifié, par PCR, la présence des symbiotes recombinants chez les glossines micro-injectées ayant émergé (Tableau XIII). Les taux d'installation des symbiotes recombinants étaient respectivement de 57,14% et de 54,16% chez les glossines exprimant la cécropine et la *rTbgTCTP*.

Tableau XII : Taux d'installation des bactéries recombinantes chez les glossines ayant émergé

	Cécropine	<i>rTbgTCTP</i>
Glossines ayant émergé	126	24
Glossines portant réellement le symbiote recombinant	72(57,14%)	13(54,16%)

III.1.4.4.2. Vérification de l'effet des protéines recombinantes sur l'installation du parasite dans l'intestin moyen des glossines (Tableau XIII).

L'analyse des taux d'installation du parasite dans l'intestin moyen entre glossines portant des bactéries recombinantes exprimant les protéines d'intérêt et celles n'ayant subi aucune modification a révélé qu'il existe une différence de distribution du parasite ($\text{Chi}^2 = 17,296$; $\text{df} = 4$; $\text{p-value} = 0,001693$) ; ceci est toujours vrai lorsqu'on compare les témoins de chaque groupe ($\text{Chi}^2 = 13,177$; $\text{df} = 2$; $\text{p-value} = 0,001376$).

Cependant, s'agissant de la cécropine, bien que le taux de glossines, micro-injectées avec du *Sodalis* recombinant exprimant cette protéine, et abritant le parasite était inférieur à ceux observés dans les lots témoins, la différence n'était pas statistiquement significative ($\text{Chi}^2 = 0,27472$, $\text{df} = 2$, $\text{p-value} = 0,8717$). Outre cela, la faible proportion de glossines portant les *Sodalis* recombinant exprimant la *rTbgTCTP* ne nous a pas permis d'effectuer des tests statistiques.

Tableau XIII : Taux de glossines hébergeant le trypanosome 21 jour après les infections expérimentales

	Expérimental Cécropine	Témoin Cécropine	Expérimental TCTP	Témoin TCTP	Témoin (Sans μ- injection)
Total de glossines disséquées	72	85	13	156	113
Nbr de glossines parasitées	6 (8,33%)	9 (10,58%)	3 (23,07%)	37 (23,71%)	10 (8,88%)
Résultats PCR (Nbr de glossines parasitées)	-	31(36,47%)	4(30,76%)	52(33,33%)	52(46,01%)

III.2. Discussion

La trypanosomiase humaine africaine, bien qu'étant reléguée au rang de maladie tropicale négligée, reste un réel problème de santé publique. De même, la trypanosomose animale africaine est un problème de santé vétérinaire pour les animaux d'élevage dans les pays d'Afrique sub-saharienne où elle sévit (OMS, 2017). A ce jour, la lutte antivectorielle semble être le moyen le plus efficace pour lutter contre ces parasitoses. Aussi la compréhension des mécanismes impliqués dans la sensibilité et/ou la résistance des glossines à l'infection par le trypanosome est une étape importante dans le contrôle des populations de vecteurs de ce pathogène, ceci dans le but de pouvoir stopper et/ou de contrôler l'infection de nouveaux vecteurs.

Des études transcriptomiques et protéomiques ont été réalisées aussi bien avec des glossines provenant d'insectariums qu'avec celles provenant du terrain, dans le but d'identifier les fonctions et voies métaboliques associées aux processus d'infection des glossines par le trypanosome (Hamidou Soumana *et al.*, 2015 ; Tsgamo Ngouné *et al.*, 2017) et par conséquent les gènes impliqués.

Outre cela, plusieurs bactéries symbiotiques ont été décrites chez les glossines (Aksoy, 1995 ; Chang et Aksoy, 1999 ; Geiger *et al.*, 2013) ; certaines d'entre elles interagiraient dans le processus d'infection de la glossine par le trypanosome (Geiger *et al.*, 2007 ; Farikou *et al.*, 2015 ; Tsagmo Ngoune *et al.*, 2019). Toujours dans le but d'améliorer les connaissances sur la composition de la flore bactérienne intestinale des glossines, cette étude fait suite à celles menées par Jacob *et al.* (2017) et Tsagmo Ngoune *et al.* (2019). Elle avait pour objectif de décrire la flore bactérienne des mouches tsé-tsé collectées sur le terrain en séquençant la région V4 de la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomique, dans l'optique de déterminer leur implication possible dans l'établissement du trypanosome dans l'intestin de ces dernières et par conséquent la modulation de la compétence vectorielle de celles-ci.

III.2.1. Composition spécifique des glossines du foyer de trypanosomoses de Campo

La prospection entomologique a permis de capturer 540 glossines appartenant à 4 taxons dominés par *G. palpalis palpalis* (96,11%). Ce résultat corroborent ceux de Mbida Mbida (2006), Farikou *et al.* (2010) et Tsagmo Ngouné *et al.* (2019) dans ce même foyer de THA. Il est important de noter qu'au cours du temps, la proportion de cette sous espèce comparée à

celles des autres taxons a augmenté, allant de 65% en 1985 à plus 95% en 2015. Cette augmentation de la fréquence de *G. palpalis palpalis* serait due au fait qu'en plus d'être des glossines anthropophiles, cette sous-espèce se développerait de préférence dans la forêt dégradée, faisant de sa niche écologique l'espace péri-domestique (Mouchet *et al.*, 1985 ; Gouteux *et al.*, 1992 ; Lavésière *et al.*, 2000). L'anthropisation progressive de Campo au fil du temps a eu un fort impact sur l'amélioration des conditions écologiques qui contribueraient à l'augmentation du nombre de biotopes favorables à l'installation de cette dernière.

III.2.2. Circulation des trypanosomes chez *Glossina palpalis palpalis* dans le foyer de Campo

L'identification des trypanosomes par PCR a permis de détecter 80 glossines infectées par au moins une espèce de trypanosome sur les 160 analysées, soit un taux d'infection de 50%. Cette forte circulation des trypanosomes dans le foyer de Campo est en accord avec les observations faites par plusieurs auteurs au courant des 20 dernières années (Morlais *et al.*, 1998 ; Farikou *et al.*, 2010 ; Jacob *et al.*, 2017).

Dans notre étude, les infections à *T. congolense* type savane et à *T. brucei* sl ont été les plus fortes avec des prévalences respectives de 31,25% et 6,87%. Lors des enquêtes précédentes *T. congolense* type forêt était la sous-espèce majoritaire (Farikou *et al.*, 2010 ; Jacob *et al.*, 2017 ; Tsagmo Ngouné *et al.*, 2019) ; cette différence pourrait être due à une modification du couvert végétal. Notre observation est en accord avec celle de plusieurs auteurs qui ont rapporté de fortes prévalences à *T. congolense* type savane dans plusieurs autres pays comme la Côte d'Ivoire, la Gambie, le Burkina Faso, etc. (Massiga *et al.*, 1996 ; McNamara *et al.*, 1995 ; Solano & Amsler-Delafosse, 1995 ; Woolhouse *et al.*, 1996).

La détection de *T. brucei gambiense* justifie sa circulation dans ce foyer malgré les efforts fournis par le Programme National de Lutte contre la Trypanosomiase Humaine Africaine (PNLTHA), par des campagnes de dépistage et de traitement. Ceci s'expliquerait par le fait que la faune sauvage et les animaux domestiques en sont des hôtes réservoirs (Njiokou *et al.*, 2004a, b ; Simo *et al.*, 2006 ; Simo *et al.*, 2013). Deux cas d'infection à la THA ont été reportés au courant de l'année 2020 (PNLTHA : données non publiées).

III.2.3. Comparaison de la flore bactérienne entre glossines infectées et non infectées

III.2.3.1. Composition du microbiome des glossines

La composition des microbiomes des 160 glossines analysées a permis d'identifier 261 genres bactériens dont 114 genres ont présenté une abondance relative supérieure au seuil de 0,01 % ; 83 genres d'entre eux ont été identifiés par Jacob *et al.* (2017) et seulement 10 par Tsagmo Ngouné *et al.* (2019). Malgré la grande différence de nombres de taxons représentés, la plupart de ces bactéries appartenaient aux quatre phyla précédemment identifiés : actinobactéries, bactéroïdes, firmicutes et protéobactéries, ainsi qu'un phylum supplémentaire ; celui des ténéricutes a été représenté uniquement par le genre *Spiroplasma*.

Ces phyla sont couramment identifiés, avec des abondances variables, dans l'intestin d'une large gamme d'insectes (Andreotti *et al.*, 2011 ; Boissiere *et al.*, 2012 ; Zouache *et al.*, 2011 ; Terenius *et al.*, 2012 ; Dillon *et al.*, 2008 ; Geib *et al.*, 2009 ; Gouveia *et al.*, 2008). Contrairement à ces insectes, chez les mouches tsé-tsé les protéobactéries surabondent (en moyenne, ce phylum est représenté par environ 90 % de l'abondance relative des bactéries), elles sont suivies des ténéricutes avec un seul genre (*Spiroplasme*) dont l'abondance relative est d'environ 6 % ; chacun des trois autres phyla (actinobactéries, bactéroïdes et firmicutes) ne représente habituellement qu'environ 1 %.

La surabondance des protéobactéries est due à celle du genre *Wigglesworthia*, (symbionte primaire hébergé par toutes les glossines). Ce genre bactérien contribue à l'amélioration de la fitness des glossines (Emerson *et al.*, 2007 ; Snyder et Rio, 2015). La surabondance de *Wigglesworthia* par rapport aux autres bactéries intestinales est systématiquement rapportée dans la littérature (Wang *et al.*, 2013 ; Aksoy *et al.*, 2014 ; Snyder et Rio, 2015 ; Jacob *et al.*, 2017 ; Tsagmo Ngouné *et al.*, 2019) ; ce genre est considéré comme responsable des difficultés rencontrées lors de la recherche et de l'identification des bactéries faiblement abondantes, et donc de la sous-estimation de la diversité des bactéries intestinales des glossines. Tous ces embranchements sont inégalement répartis sur les 160 échantillons ; le tableau VIII donne un aperçu de la large diversité de distribution de la richesse des genres parmi 10 échantillons sélectionnés. Ainsi nous avons observé une variation des abondances relatives de chaque phylum dans les échantillons. De plus, une grande diversité a également été montrée en ce qui concerne la distribution des genres appartenant aux protéobactéries autres que *Wigglesworthia*. Par exemple, l'abondance relative de *Pseudomonas* était de 0,05 % dans l'échantillon 1 alors

qu'il était de 5% (100 fois plus) dans l'échantillon 8 ; plus surprenant, alors que l'abondance relative de *Wigglesworthia* n'était que de 4,1 % dans l'échantillon 155, celui de *Tepidiphilus* (un genre qui comprend quatre espèces de bactéries extrêmophiles (Xiao-Tong et al., 2020) a atteint 31,6%. Il y a des questionnements sur où et comment la glossine a ingéré ce genre de bactéries que l'on trouve dans : les boues issues du traitement des eaux usées, des nappes de pétrole ou des sources chaudes terrestres (Manaia et al., 2003 ; Salinas et al., 2004 ; Poddar et al., 2014). Il a été rapporté que la mouche tsé-tsé pouvait ingérer des bactéries présentes sur l'épiderme (Poinar Jr. Et al., 1979) d'humains ou d'une variété de vertébrés (Moloo et al., 1988 ; Simo et al., 2008) ou sur le nectar des plantes (Colman et al., 2012 ; Solano et al., 2015) lorsqu'elles se nourrissent.

Afin de vérifier s'il y aurait eu une dynamique bactérienne au cours de cette dernière décennie, nous avons comparé les résultats obtenus au cours des études précédentes sur ce site. Cette comparaison n'a qu'une valeur indicative puisque différentes techniques ont été utilisées dans ces études pour la détermination de la composition du microbiome : la culture bactérienne et le moléculaire par séquençage à l'aide de différentes amorces de la sous-région 16S de l'ARN ribosomal sur différentes régions amplifiées (V3V4 ou V4 uniquement). Il est important de rappeler que la méthode moléculaire permet d'identifier les bactéries qui ont été ingérées par les glossines, mais qu'elle ne certifie pas qu'elles sont encore vivantes et sont établies dans la mouche tsé-tsé. Le nombre de genres bactériens identifiés était de 261 dans la présente étude, 10 en 2019 (Tsagmo Ngouné et al., 2019) et 83 en 2017 (Jacob et al., 2017) par les méthodes moléculaires, et 9 en 2011 par la méthode de culture (Geiger et al., 2011). On peut également noter que le très faible nombre de genres bactériens signalés en 2019 (Tsagmo Ngoune et al., 2019) était peut-être attribuable à l'abondance relative exceptionnellement élevée de *Wigglesworthia* (98,9%) qui a très probablement perturbé l'identification des bactéries peu abondantes.

Cinquante-six (56) genres bactériens ont été identifiés dans des glossines recueillies au cours d'au moins deux campagnes entomologiques sur notre site, à l'exception de *Sphingobacterium* qui n'a été identifié qu'en utilisant la méthode de culture, tandis que *Tsukamurella*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Spiroplasma*, ont été trouvés chez les glossines lors des 3 campagnes d'échantillonnage de Jacob et al., (2017), Tsagmo Ngoune et al., (2019), et Ngambia Freitas et al., (2021). Certains de ces 56 genres sont capables de sécréter des composés antiparasitaires (Poinar et al., 1979 ; Azambuja et al., 2004). De telles bactéries peuvent avoir une incidence sur l'établissement de

protozoaires parasites dans leurs insectes vecteurs, comme cela a été signalé pour les moustiques (Pumpuni *et al.*, 1996 ; Beier *et al.*, 1994 ; Straif *et al.*, 1998). Ainsi, par exemple, les bactéries du genre *Enterobacter* sont capables de produire des pigments, comme la prodigiosine (Moss, 2002), toxiques pour *Plasmodium falciparum* (Lazaro *et al.*, 2002) et pour *Trypanosoma cruzi* (Azambuja *et al.*, 2004). Il a été rapporté que *Serratia marcescens* isolé de *Rhodnius prolixus* est capable de lyser *Trypanosoma cruzi* in vitro (Azambuja *et al.*, 2004), et que les souches de *Pseudomonas fluorescens* sont capables de lyser *T. cruzi* (Mercado et Colon-Whitt, 1982). D'autres genres bactériens similaires, ayant été isolés de l'intestin moyen des mouches tsé-tsé, méritent d'être étudiés afin de vérifier s'ils pourraient moduler la compétence de la mouche tsé-tsé en tant que vecteur. Pour ce qui est de *Sodalis*, le symbiote secondaire des mouches tsé-tsé, il favorise l'infection des glossines par le trypanosome (Farikou *et al.*, 2010 ; Hamidou Soumana *et al.*, 2014). Cette bactérie a été identifiée en dessous du seuil fixé. Elle était également en faible abondance chez les glossines collectées lors de 2 autres campagnes (Tsagmo Ngoune *et al.*, 2019 ; Jacob *et al.*, 2017). Les différences d'abondances et de prévalences entre les études précédentes et actuelles seraient dues aux différentes approches moléculaires. L'une était réalisée avec des amorces spécifiques de *Sodalis*. Néanmoins, sa transmission maternelle d'une génération à l'autre en fait, via la para-transgénèse, un bon vecteur d'expression *in situ* de molécules antiparasitaires capables d'empêcher l'établissement du parasite dans l'intestin des mouches tsé-tsé.

III.2.3.2. Association entre la composition de la flore bactérienne des glossines et le statut d'infection d'une part et, d'autre part le site d'échantillonnage

La grande diversité des genres bactériens, la très faible abondance de la plupart d'entre eux et leurs répartitions inégales rendent complexe l'analyse d'une association possible entre la composition du microbiome et la susceptibilité / résistance de la glossine à l'infection par le trypanosome. De même que pour une éventuelle association avec les sites d'échantillonnage des glossines et, par conséquent, avec un effet possible de facteurs écologiques sur la composition du microbiome. Plusieurs modèles statistiques ont été utilisés pour analyser les données, d'autres devront être testés lors des prochaines investigations. Néanmoins, 36 genres bactériens ont été identifiés uniquement chez des glossines non infectées. L'intérêt de cette découverte doit cependant être modulé puisque leur abondance relative était très faible. En fait, l'abondance relative de 26 genres sur les 36 était inférieure à 0,02% ; elle se situe entre 0,02%

et 0,05% pour 9 d'entre eux ; enfin un seul genre bactérien, *Cupriavidus*, avait une abondance relative de 0,22%. De même, la présence ou l'absence de plusieurs genres bactériens semble être spécifiquement associée à l'infection à trypanosomes des mouches tsé-tsé et/ou au site de collecte de ces dernières.

Certains tests statistiques utilisés ont montré une tendance à une association entre le microbiome, sa diversité en termes de composition et d'abondance bactérienne individuelle, et l'infection de ces glossines par le trypanosome ; de même, la diversité du microbiome observées chez les glossines collectées était associée aux différents sites d'échantillonnage ($p = 0,0003$). De plus, en compilant l'utilisation de la recherche de biomarqueurs et du LEfSe score ainsi que des données obtenues après comparaison du statut infecté ou non infecté, il apparaît que les abondances relatives comparatives de *Bacillus* ($p=0,008$), *Bacteroides* ($p=0,0042$), *Georgenia* ($p=0,0097$), *Prostheco bacter* ($p=0,035$), *Tepidiphilus* ($p=0,025$) et *Wigglesworthia* ($p=0,032$) sont directement associés à la présence des trypanosomes. Ces résultats diffèrent de ceux de Jacob *et al.* (2017) et Tsagmo Ngoune *et al.* (2019) enregistrés dans la même région ; cette différence viendrait, hormis du type d'amorces utilisé pour le séquençage, du fait qu'ils se sont concentrés sur la comparaison entre les foyers et non entre les sites d'échantillonnage (villages) à l'intérieur d'un foyer donné (ici le foyer de Campo). Il convient de noter que dans les cinq villages étudiés, la principale activité anthropique est la pêche. En outre, selon les villages, l'agriculture, l'élevage, la chasse et l'exploitation forestière sont effectués à différents niveaux d'intensité, ce qui favoriserait de légères différences de la faune sauvage et domestique, et de ce fait pourrait avoir un impact sur la diversité des bactéries que les mouches tsé-tsé pourraient éventuellement ingérer lors de la prise de leur repas de sang. Le but de cette étude était d'analyser les différents types d'associations entre la composition du microbiome des glossines et la présence de trypanosomes, et le potentiel rôle de certaines bactéries dans la modulation de la compétence vectorielle des glossines, même si la complexité des interactions n'est pas bien identifiée à ce stade tout comme le séquençage indiquerait la présence de bactéries dans l'intestin moyen des glossines du fait de leurs ingestions et non de leurs installations, la méthode moléculaire permet d'identifier les trypanosomes qui ont été ingérés par les glossines, mais n'évalue pas le fait qu'ils sont encore en vie ou qu'ils se sont établis chez la mouche tsé-tsé. Les mouches tsé-tsé abritant *Trypanosoma congolense* « type savane » présentaient un microbiote différent de ceux des glossines non infectées ; la validation des résultats obtenues sur le potentiel impact de ces dernières (bactéries) associées au statut infecté ou non des mouches tsé-tsé ne pourra se faire que par le biais de leur culture et de l'analyse fonctionnelle

sur la façon dont elles peuvent moduler la compétence vectorielle des glossines, ce qui pourrait probablement être utile à l'amélioration des essais utilisant l'approche para-transgénique.

III.2.4. Effet de la cécropine et de la *rTbgTCTP* sur l'établissement du trypanosome dans l'intestin moyen des glossines

Les bactéries symbiotiques génétiquement modifiées sont des outils potentiels pour l'administration de protéines interférant avec le développement d'agents pathogènes dans le vecteur. Leur utilisation peut être une approche complémentaire pour contrôler la transmission de la maladie (Beard *et al.*, 1993). L'utilisation de symbiotes bactériens exprimant des protéines étrangères chez les arthropodes vecteurs permet aussi d'améliorer l'étude des connaissances des interactions insectes-pathogènes. Bien que l'approche paratransgénèse chez les glossines ait été étudiée pour le contrôle de la transmission de la trypanosomiase, peu de progrès ont été réalisés dans l'identification et l'expression des protéines, pouvant interférer avec les trypanosomes, par le biais de l'endosymbiote bactérien de la mouche tsé-tsé : *Sodalis glossinidius*. À ce jour, les souches de *S. glossinidius* n'ont été utilisées que comme hôtes pour la production de GFP et d'un anticorps à domaine unique c'est-à-dire nano-corps (Cheng et Aksoy, 1999 ; De Vooght *et al.*, 2012 ; 2014). Le but de cette étude était d'évaluer l'activité d'un peptide antimicrobien (cécropine) et d'une protéine tumorale sécrétée par le parasite (*TbgTCTP*) sur l'établissement des trypanosomes dans le tractus gastrointestinal de la glossine, ceci en développant des souches recombinantes de *Sodalis* fonctionnelles pouvant exprimer nos molécules cibles *in situ*.

III.2.4.1. Cas de la cécropine

L'une des premières observations de la modulation de la compétence des arthropodes vecteurs, à l'aide de bactéries symbiotiques génétiquement modifiées, a été décrite par Durvasula *et al.* (1997). Ce dernier a mis en exergue que l'expression de la cécropine A recombinante par des bactéries symbiotiques dans l'intestin postérieur de *Rhodnius prolixus* interfère avec le développement de trypanosomes par une action lytique (*T. cruzi*). En effet, les insectes porteurs de bactéries transformées codant pour la cécropine, ont soit éliminé le parasite, soit réduit de façon logarithmique l'intensité du parasite. De plus, ces auteurs ont aussi démontré que le gène codant pour la cécropine est stable en l'absence de sélection d'antibiotiques et les bactéries transformées semblent maintenir une relation stable avec

l'insecte hôte c'est-à-dire que la toxicité du peptide recombinant envers la flore intestinale ou les tissus d'insectes ne semblait pas être un problème (Durvasula *et al.*, 1999).

Le clonage du gène codant pour la cécropine dans le vecteur d'expression pGRG25 a été un succès, la vérification a été effectuée par séquençage du gène. Cependant, il nous a été difficile de confirmer l'expression de ladite protéine par le biais de la révélation par colorimétrie (l'anticorps anti-His utilisé ici était conjugué à une peroxydase) car moins sensible. Nous avons eu un signal de forte intensité proche de celui de la taille attendue par le biais de la chimioluminescence. Ceci proviendrait de la faible taille de ce peptide, rendant délicate sa migration sur le gel et difficile son transfert sur la membrane. Cette difficulté a été rencontrée dans l'étude de Durvasula *et al.* (1997) ; bien que ce dernier ait pu mettre en exergue la production de ladite protéine en corrélant l'absence des trypanosome (*Trypanosoma cruzi*) chez les triatomes. Bien que notre étude ait montré un taux d'infection inférieur chez les glossines hébergeant le symbiote génétiquement modifié vs ceux ayant été micro-injectées avec de l'eau physiologique, cette différence n'a pas été significative. À ce stade nous ne sommes pas en mesure de conclure car Durvasula *et al.* (1997), en quantifiant le taux de parasites chez les glossines portant le symbiote génétiquement modifié et celles n'abritant pas le symbiote recombinant, a montré que les triatomes portant le symbiote recombinant avaient une charge parasitaire statistiquement inférieure à ceux du lot témoin. Nous pourrions être dans le même cas de figure dans notre étude. D'autres expérimentations comme la quantification du taux de parasites par qPCR des sujets de notre étude pourraient être menées, et qui nous permettraient d'avoir de plus amples informations.

III.2.4.2. Cas de la rTbgTCTP

Des études portant sur le sécrétome des trypanosomes ont permis l'identification d'un grand nombre de protéines (Geiger *et al.*, 2010). De plus, un large nombre de protéines et ou de gènes surexprimés ou sous-exprimés lors de la comparaison de ces derniers provenant de l'intestin moyen des glossines (*Glossina palpalis gambiensis*) infectées par le *Tbg* vs glossines non infectées a été identifié (Geiger *et al.*, 2015 ; Hamidou Soumana *et al.*, 2015). Parmi ces protéines, la protéine tumorale à traduction contrôlée (TCTP) du trypanosome, pour laquelle le gène correspondant s'est avéré surexprimé chez les glossines infectées par le *Tbg* est apparue d'un grand intérêt.

Cette protéine omniprésente chez les eucaryotes et hautement conservée chez les animaux et les plantes jouerait de multiples rôles dans les processus cellulaires, y compris la

prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, la réponse au stress, l'apoptose, et serait impliquée dans le développement embryonnaire (Brioudes *et al.*, 2010 ; Stierum *et al.*, 2003 ; Arcuri *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2013 ; Bommer *et al.*, 2011 ; Susini *et al.*, 2008 ; Roque *et al.*, 2016). À ce titre, la TCTP a été considérée comme une cible thérapeutique potentielle contre plusieurs maladies ou troubles physiologiques (Eichhorn *et al.*, 2013 ; Kadioglu *et al.*, 2016 ; Seo & Efferth, 2016). Quant à la forme *Tbg* de la TCTP (*TbgTCTP*), sa possibilité d'excrétion / sécrétion par le trypanosome a soulevé une question sur son rôle paracrine, car le parasite se développe dans l'intestin de la glossine où un certain nombre de bactéries sont hébergées, dont certaines se sont avérées impliquées dans la compétence du vecteur de la mouche tsé-tsé (Farikou *et al.*, 2010 ; Aksoy *et al.*, 2016).

Bossard *et al.*, (2017), a évalué l'effet biologique de la *rTbgTCTP* sur plusieurs souches bactériennes isolées de l'intestin moyen de diverses espèces de *Glossina* échantillonnées dans différents foyers de THA (Geiger *et al.*, 2009 ; Geiger *et al.*, 2010b ; Geiger *et al.*, 2011). Ils ont indiqué que la *rTbgTCTP* peut moduler la croissance des bactéries de l'intestin moyen de glossines ; que cet effet dépend principalement du type de bactérie, des conditions de culture et de la concentration en protéines. Ceci suppose que la présence de la *rTbgTCTP* est capable de modifier la composition microbienne de l'intestin moyen de la mouche tsé-tsé (Van Meirvenne *et al.*, 1995), avec comme conséquence l'altération de la capacité de la glossine à transmettre le trypanosome responsable de la maladie du sommeil. En effet, plusieurs bactéries intestinales, y compris *Sodalis glossinidius*, se sont déjà révélées impliquées dans la compétence du vecteur de la mouche tsé-tsé (Geiger *et al.*, 2007 ; Hamidou Soumana *et al.*, 2013).

Dans notre étude, comme pour la cécropine, le gène codant pour la *TbgTCTP* a été inséré avec succès dans son vecteur d'expression (pCM66) par digestion enzymatique. La vérification de l'expression de la *rTbgTCTP* sur membrane s'est faite par l'immunoloration avec un anticorps spécifique à notre protéine. Bien que la taille de la *TbgTCTP* observée lors de la révélation ait été deux fois celle du produit attendu, il pourrait s'agir d'une dimérisation car la fonction -SH de cet acide aminé établirait fréquemment des ponts disulfures (-S-S-) avec le -SH d'autre cystéine (Bossard *et al.*, 2017). Elle pourrait s'être liée à une protéine de surface de même poids qu'elle ?

Le taux d'émergence des glossines portant la souche de *Sodalis* recombinant exprimant la *TbgTCTP*, était 6,71% contre 70% pour le lot témoin. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la modification du microbiome de ces glossines par cette protéine soit létale pour le stade larvaire de ces dernières. Nous pouvons exclure l'effet de micro-injection des larves

car il n'existait aucune différence statistiquement significative entre les émergences du lot témoin lors de l'expérimentation effectuée pour la cécropine et celle effectuée pour la *rTbgTCTP* (P= 0,061).

Bien que l'effet de protection recherché n'ait pas abouti, il n'en demeure pas moins que l'expression des protéines d'intérêts par les bactéries recombinantes ait influé le développement des pupes par modification de leurs microbiomes. Il serait judicieux de procéder lors de futures expérimentations à une modification génétique du symbionte avec le gène codant pour l'anti-*TbgTCTP* (protéine ayant eu de bons résultats sur l'immunisation des souris lors de leurs infections avec les trypanosomes) (Bossard *et al.*, 2020).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour but l'étude de la composition du microbiome de *Glossina palpalis palpalis* en fonction de la présence ou l'absence des trypanosomes d'une part, et l'évaluation de la capacité de la cécropine et de la rTbgTCTP à inhiber l'installation de *Trypanosoma brucei gambiense* dans le tractus gastro-intestinal de *Glossina palpalis gambiensis* d'autre part.

Les prospections entomologiques menées dans les différents villages du foyer de Campo ont révélé la présence de 4 espèces de glossines, *Glossina palpalis palpalis* étant majoritairement représenté (96,1%). La recherche par PCR des parasites chez 160 glossines de cette sous-espèce a révélé que *Trypanosoma congolense* type Savane et *Trypanosoma brucei* s.l. étaient représentés avec des prévalences de 31,25% et 6,87%. L'étude méta-taxonomique du microbiome de ces glossines a permis la détection de 12 phyla + un groupe de bactéries non cultivées. Le genre *Wigglesworthia*, symbionte primaire, était représenté à 87,22%, mais son abondance relative a varié très largement d'une glossine à l'autre. Des différences significatives ont été trouvées en comparant les microbiomes des glossines non-infectées et ceux des glossines hébergeant *Trypanosoma congolense* « type savane » ; il a été de même lorsqu'on a comparé les microbiomes des glossines provenant des différents sites de collecte. Ces analyses ont mis en exergue la modulation du microbiome des glossines par le trypanosome et par le lieu de capture de ces dernières. De plus, certains genres bactériens se sont révélés d'un grand intérêt car elles joueraient un rôle dans le caractère réfractaire des glossines à l'instar de *Bacillus*, *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Tepidiphilus*. Il est à noter que la surabondance du genre *Wigglesworthia* dans ce travail a pu empêcher l'observation d'autres genres bactériens, potentiellement importants, jouant un rôle dans l'interaction étudiée. Nous pensons que c'est l'une des raisons pour laquelle la bactérie *Sodalis glossinidius*, symbionte secondaire de la glossine, n'a pu être identifiée dans cette étude.

L'analyse fonctionnelle *in vivo* par para-transgénèse de la cécropine et de la rTbgTCTP sur l'établissement de *Trypanosoma brucei gambiense* est la première obtenue sur *G. palpalis gambiensis* (les seules études de para-transgénèse menées étaient sur *G. morsitans morsitans*) et nécessitent des études complémentaires afin de perfectionner le rendement de cette approche et d'obtenir un taux de 100% de glossines para-transgéniques portant le symbionte recombinant et exprimant les molécules cibles. Dans cette étude, nous avons réussi à cloner avec succès des gènes codant pour les protéines d'intérêt dans des souches de *Sodalis*. Ces *Sodalis* recombinants (rec*Sodalis*) ont été micro-injectés avec un taux de réussite supérieur à 50% dans les stades larvaires L₃ des glossines. Il est aussi à noter que les gènes clonés étaient stables même après une 20^{ème} génération. Dans le cas des glossines hébergeant les rec*Sodalis* exprimant la

cécropine, nous avons observé un taux d'infection inférieur (8,33%) à celui des glossines des lots témoins (témoin sans micro-injection et témoin micro-injecté avec de l'eau physiologique >10%) bien que cela ne soit pas statistiquement significatif ; une quantification des parasites provenant de ces trois lots par qPCR pourrait nous donner plus de réponses. Quant aux glossines hébergeant le rec*Sodalis* exprimant la *rTbgTCTP*, il s'est avéré que cette protéine avait une action létale sur le développement des larves ce qui empêcherait leur émergence, avec 6,71% de glossines ayant émergées contre 70% de glossines appartenant au lot témoin. Il est à noter qu'aucun effet de protection ait été retrouvé chez celles ayant émergées.

PERSPECTIVES

Dans des travaux futurs, il serait intéressant de :

- Procéder à une quantification des parasites et des symbiotes recombinants versus celles natives pour avoir de plus amples informations sur l'effet de la cécropine et de la *rTbgTCTP* sur l'établissement du trypanosome dans le tractus gastro-intestinal des glossines ;
- Poursuivre les analyses fonctionnelles des gènes et protéines différemment exprimés et sécrétés lors de l'infection trypanosomienne de manière *in vitro* et *in vivo* ;
- D'améliorer nos connaissances sur le microbiomes des glossines en cherchant de nouveaux symbiotes potentiellement impliqués dans le statut sensible ou résistant des glossines à l'infection trypanosomienne ; par exemple en utilisant des amorces et des enzymes de restrictions permettant de séquencer toutes les bactéries présentes chez la glossine, à l'exception du genre *Wigglesworthia* ;
- Mener des analyses transcriptomiques, protéomiques, et méta-taxonomiques, des intestins moyens, du thorax, des glandes salivaires des glossines et aussi des glossines entières tout au long de l'infection dans le but d'avoir une vue plus générale du dialogue moléculaire se déroulant chez ses dernières.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ABD-ALLA A.M.M., BERGOIN M., PARKER A.G., MANIANIA N.K., VLAK J.M., BOURTZIS K., BOUCIAS D.G. & AKSOY S. (2013). Improving Sterile Insect Technique (SIT) for tsetse flies through research on their symbionts and pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112(1) : S2–S10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.009>.
- ABRAHAM N.M., LIU L., JUTRAS B.L., YADAV A.K., NARASIMHAN S., GOPALAKRISHNAN V., ANSARI J.M., JEFFERSON K.K., CAVA P., JACOBS-WAGNER C. & FIKRIG E. (2017). Pathogen mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *Proceeding of the National Academy of Science*, 114(5) : E781–E790.
- ABUBAKAR L., BULIMO W., MULAA F. & OSIR E. (2006). Molecular characterization of a tsetse fly midgut proteolytic lectin that mediates differentiation of African trypanosomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.010>.
- AKODA, K., VAN DEN BOSSCHE, P., MARCOTTY, T., KUBI, C., COOSEMANS, M., DE DEKEN, R. and VAN DEN ABEELE, J. (2009), Nutritional stress affects the tsetse fly's immune gene expression. *Medical and Veterinary Entomology*, 23 : 195-201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00799.x>
- AKSOY E., TELLERIA E.L., ECHODU R., WU Y., OKEDI L.M., WEISS B.L., AKSOY S. & CACCONE A. (2014). Analysis of Multiple Tsetse Fly Populations in Uganda Reveals Limited Diversity and Species-Specific Gut Microbiota. *Applied Environmental Microbiology*, 80 (14) : 4301–4312. <https://doi.org/10.1128/AEM.00079-14>.
- AKSOY E., VIGNERON A., BING X., ZHAO X., O'NEILL M., WU Y.N., BANGS J.D., WEISS B.L. & AKSOY S. (2016). Mammalian African trypanosome VSG coat enhances tsetse's vector competence. *Proceeding of the National Academy of Science*, 113 (25) : 6961-6966.
- AKSOY S. (1995). *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies.

International Journal of Systematic Bacteriology, 45(4) : 848–851.
<https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-848>.

- AKSOY S. (2003). Control of tsetse flies and trypanosomes using molecular genetics. *Veterinary Parasitology*, 115(2) : 125–145.
- AKSOY S., GIBSON W.C. & LEHANE M.J. (2003). Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Advances Parasitology*, 53 : 1–83.
- AKSOY S., MAUDLIN I., DALE C., ROBINSON A.S. & O'NEILL S.L. (2001). Prospects for control of African trypanosomiasis by tsetse vector manipulation. *Trends in Parasitology*, 17 : 29–35.
- AKSOY S. & RIO R.V.M. (2005). Interactions among multiple genomes: tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7): 691–698.
- AKSOY S., WEISS B. & ATTARDO G. (2008). Paratransgenesis Applied for Control of Tsetse Transmitted Sleeping Sickness. *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease*, 627 : 35–48.
- ALAM U., MEDLOCK J., BRELSFOARD C., PAIS R., LOHS C., BALMAND S., CARNOGURSKY J., HEDDI A., TAKAC P., GALVANI A. & AKSOY S. (2011). *Wolbachia* Symbiont Infections Induce Strong Cytoplasmic Incompatibility in the Tsetse Fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathogens*, 7 : e1002415.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002415>.
- ANDREOTTI R., PÉREZ DE LEÓN A.A., DOWD S.E., GUERRERO F.D., BENDELE K.G. & SCOLES G.A. (2011). Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *Bio Medical Central Microbiology*, 11(1) : 6.
- ARCURI F., PAPA S., CARDUCCI A., ROMAGNOLI R., LIBERATORI S., RIPARBELLI M.G., SANCHEZ J.C., TOSI P. & DEL VECCHIO M.T. (2004). Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *Prostate*, 60 : 130–40.
- ATTARDO G.M., LOHS C., HEDDI A., ALAM U.H., YILDIRIM S. & AKSOY S. (2008). Analysis of milk gland structure and function in *Glossina morsitans*: Milk protein

production, symbiont populations and fecundity. *Journal of Insect Physiology*, 54 : 1236–1242. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.06.008>.

AZAMBUJA P., FEDER D. & GARCIA E.S. (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, 107 : 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.04.007>.

B

BAKER N., DE KONING H.P., MÄSER P. & HORN D. (2013). Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. *Trends in Parasitology*, 29 (3) : 110-118. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.12.005>

BAKER R.D., MAUDLIN I., MILLIGAN P.J.M., MOLYNEUX D.H. & WELBURN, S.C. (1990). The possible role of *Rickettsia*-like organisms in trypanosomiasis epidemiology. *Parasitology*. **100**, 209. <https://doi.org/10.1017/S0031182000061217>.

BALMAND S., LOHS C., AKSOY S. & HEDDI, A. (2013). Tissue distribution and transmission routes for the tsetse fly endosymbionts. *Journal of Invertebrate Pathology*. **112** Suppl, S116-122. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.002>

BARILLAS-MURY C., WIZEL B. & HAN Y.S. (2000). Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **30**, 429–442.

BARRY J.D. & MC CULLOCH R. (2001). Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Advances in Parasitology*, 49 : 1–70.

BEARD C.B., O'NEILL S.L., MASON P., MANDELCO L., WOESE C.R., TESH R.B., RICHARDS F.F. & AKSOY S. (1993). Genetic transformation and phylogeny of bacterial symbionts from tsetse. *Insect Molecular Biology*, 1 : 123–131.

BEIER M.S., PUMPUNI C.B., BIZIO J.C. & DAVIS J.R. (1994). Effect of paraaminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in Anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 31 : 561–565.

BENGALY Z., GANABA R., SIDIBE I. & DESQUESNES M. (2001). Trypanosomose animale chez les bovins dans la zone Sud-soudanienne du Burkina Faso. Résultats

d'une enquête sérologique. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux*, 54(3–4) : 221–224

- BERTHIER D., TCHICAYA B., THEVENON S., NJIOKOU F., CUNY G. & GEIGER A. (2013). Population dynamics of *Glossina palpalis gambiensis* symbionts, *Sodalis glossinidius*, and *Wigglesworthia glossinidia*, throughout host-fly development. *Infection Genetics and Evolution*, 13 : 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.003>
- BIAN G., XU Y., LU P., XIE Y. & XI Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, 6 : e1000833
- BLACK S.J., WANG Q., MAKADZANGE T., LI Y.L., VAN PRAAGH A., LOOMIS M. & SEED J.R. (1999). Anti-*Trypanosoma brucei* activity of non-primate zoo sera. *Journal of Parasitology*. **85**, 48–53.
- BOGDAN C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. **2**, 907–916. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>.
- BOISSIÈRE A., TCHIOFFO M.T., BACHAR D., ABATE L., MARIE A., NSANGO S.E., SHAHBAZKIA H.R., AWONO-AMBENE P.H., LEVASHINA E.A., CHRISTEN R. & MORLAIS I. (2012). Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS Pathogens*, 8 : e1002742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002742>
- BOMMER U., HENG C., PERRIN A., DASH P., LOBOV S., ELIA A. & CLEMENS M.J. (2010). Roles of the translationally controlled tumour protein (TCTP) and the double-stranded RNA dependent protein kinase, PKR, in cellular stress responses. *Oncogene*, 29 : 763–773.
- BOULANGER N., BRUN R., EHRET-SABATIER L., KUNZ C. & BULET P. (2002). Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 369–375.
- BOSSARD G., BARTOLI M., FARDEAU M.L., HOZMULLER P., OLLIVIER B. & GEIGER A. (2017). Characterization of recombinant *Trypanosoma brucei gambiense* Translationally Controlled Tumor Protein (rTbgTCTP) and its interaction with

Glossina midgut bacteria. *Gut Microbes*, 8(5) : 413-427. DOI: 10.1080/19490976.2017.1331833

- BOULANGER N., BRUN R., EHRET-SABATIER L., KUNZ C. & BULET P. (2002). Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32 : 369–375.
- BOUYER J. (2006). Ecologie des glossines du Mouhoun au Burkina Faso: intérêt pour l'épidémiologie et le contrôle des trypanosomoses africaines. *Parasitologie*. Université Montpellier II, Montpellier, France, 206p.
- BOUYER J. (2008). Does isometamidium chloride treatment protect tsetse flies from trypanosome infections during SIT campaigns? *Medical and Veterinary Entomology*, 22(2) : 140–143.
- BRIOUDES F., THIERRY A.M., CHAMBRIER P., MOLLEREAU B. & BENDAHMANE M. (2010). Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 : 16384-9.
- BRUCE D., HAMERTON A. E. & BATEMAN H.R. (1909). The development of *Trypanosoma brucei* in *Glossina palpalis*. *Proceeding of Royal Society (B)*, 81 : 405-414.
- BRUCE D. & NABARRO D. (1903). Report on sleeping sickness. *Commission of royal Society*, 20p.
- BRUN R., BLUM J., CHAPPUIS F. & BURRI C. (2010). Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, 375 : 148–159. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60829-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1)
- BRUNHES J., CUISANCE D., GEOFFROY B. & HERVY J-P. (1998). Les glossines ou mouches tsé-tsé : logiciel d'identification et d'enseignement = Glossina : the tsetse fly : an identification and training software. *Edition ORSTOM*: Montpellier, France.
- BURTT E. (1946). Incubation of tsetse pupae: increased transmission-rate of *Trypanosoma rhodesiense* in *Glossina morsitans*. [*Annals of Tropical Medicine and Parasitology*](#). **40**, 18–28.

BÜSCHER P., CECCHI G., JAMONNEAU V. & PRIOTTO G. (2017). Human african trypanosomiasis. *Lancet*. 390 : 2397–2409.

C

[CALJON](#) G., [DE VOOGHT](#) L. & [ABBEELE](#) J.V.D. (2013). Options for the delivery of anti-pathogen molecules in arthropod vectors. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(1) : S75–S82.

CAMARA M., OUATTARA E., DUVIGNAUD A., MIGLIANI R., CAMARA O., LENO M., SOLANO P., BUCHETON B., CAMARA M. & MALVY D. (2017). Impact of the Ebola outbreak on *Trypanosoma brucei gambiense* infection medical activities in coastal Guinea, 2014-2015: A retrospective analysis from the Guinean national Human African Trypanosomiasis control program. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11(11) : e0006060. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006060>

CARRINGTON L.B., TRAN B.C.N., LE N.T.H., LUONG T.T.H., NGUYEN T.T., NGUYEN P.T., NGUYEN C.V.V., NGUYEN H.T.C., VU T.T., VO L.T., LE D.T., VU N.T., NGUYEN G.T., LUU H.Q., DANG A.D., HURST T.P., O'NEILL S.L., TRAN V.T., KIEN D.T.H., NGUYEN N.M., WOLBERS M., WILLS B. & SIMMONS C.P. (2018). Field- and clinically derived estimates of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(2) : 361–366.

CHALIER A., EYRAUD M., LAFAYE A. & LAVEISSIERE C. (1977). Amélioration du rendement du piège biconique pour glossines (Diptera, Glossinidae) par l'emploi d'un cône inférieur bleu. *Cahier O.R.S.T.O.R.M., série Entologie et Parasitologie*, 15 (3) : 283-286.

CHANDRA M., LINIGER M., TETLEY L., RODITI I. & BARRY J.D. (2004). Tsetse EP, a gut protein from the tsetse *Glossina morsitans*, is related to a major surface glycoprotein of trypanosomes transmitted by the fly and to the products of a *Drosophila* gene family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**, 1163–1173. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.07.004>

- CHEN W., WANG H., TAO S., ZHENG Y., WU W., LIAN F., JARAMILLO M., FANG D. & ZHANG D.D. (2013). Tumor protein translationally controlled 1 is a p53 target gene that promotes cell survival. *Cell Cycle*, 12(14) : 2321–2328.
- CHENG Q. & AKSOY S. (1999). Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes in vivo in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Molecular Biology*, 8(1) : 125–132.
- CHENG Q., RUEL T.D., ZHOU W., MOLOO S.K., MAJIWA P., O'NEILL S.L. & AKSOY S. (2000). Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(1) : 44–50. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00202.x>
- CLAUSEN P.H., ADEYEMI I., BAUER B., BRELOEER M., SALCHOW F. & STAAK C. (1998). Host preferences of tsetse (Diptera: *Glossinidae*) based on bloodmeal identifications. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(2) : 169–180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00097.x>
- COATES C.J., JASINSKIENE N., MIYASHIRO L. & JAMES A.A. (1998). Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7) : 3748–3751.
- COLMAN D.R., TOOLSON E.C. & TAKACS-VESBACH C.D. (2012). Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology*, 21(20) : 5124–5137.
- COOLEY L. R., KELLEY R. & SPRADLING A. C. (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P-elements. *Science*, 239 : 1121–1128.
- COUTINHO-ABREU IV. ZHU K.Y. & RAMALHO-ORTIGAO M. (2010). Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. *Parasitology International*, 59(1) : 1–8.
- CUISANCE D. (1989). Le piégeage des tsé-tsé. Etudes et synthèses de l'I.E.M.V.T./CIRAD (*Maisons Alfort*), 32 : 1-172.

D

- DALE C. & MAUDLIN I. (1999). *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 49(1) : 267–275. <https://doi.org/10.1099/00207713-49>

- DALE C. & WELBURN S.C. (2001). The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *International Journal of Parasitology*, 31 : 628–631.
- DALE C., WELBURN S.C., MAUDLIN I. & MILLIGAN P.J.M. (1995). The kinetics of maturation of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology*, 111(2) : 187-191. <https://doi.org/10.1017/S0031182000064933>
- DE GREGORIO E. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO Journal* 21, 2568–2579. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2568>
- DE VOOGHT L., CALJON G., DE RIDDER K. & VAN DEN ABBEELE J. (2014). Delivery of a functional anti-trypanosome Nanobody in different tsetse fly tissues via a bacterial symbiont, *Sodalis glossinidius*. *Microbial Cell Factories*, 13 : 156. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0156-6> PMID: 25376234.
- DE VOOGHT L., CALJON G., STIJLEMANS B., DE BAETSELIER P., COOSEMANS M. & VAN DEN ABBEELE J. (2012). Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody in *Sodalis glossinidius*, a bacterial symbiont of the tsetse fly. *Microbial Cell Factories*, 11 : 23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-23>.
- DE VOOGHT L., VAN KEER S. & VAN DEN ABBEELE J. (2018). Towards improving tsetse fly paratransgenesis: stable colonization of *Glossina morsitans morsitans* with genetically modified *Sodalis*. *BMC Microbiology*, 18(1) : 165.
- DELESPAUX V. & DEKONING H. (2007). Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resistance Updates*, 10 : 30–50. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.02.004>
- DIALLO S., NDIR O., DIENG Y., LEYE A., DIENG T., BAH I.B., DIOP B.M., GAYE O. & FAYE O. (1996). Seroprevalence of toxoplasmosis in Dakar (Senegal) in 1993: study of women in their reproductive years. *Santé Montrouge, France*, 6 (2) : 102–106.
- DILLON R.J., WEBSTER G., WEIGHTMAN A.J., DILLON V.M., BLANFORD S. & CHARNLEY A.K. (2008). Composition of Acridid gut bacterial communities as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97 (3) : 265–272.

- DIMOPOULOS G., MÜLLER H.M., LEVASHINA E.A. & KAFATOS, F.C. (2001). Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Current Opinion in Immunology*, **13**, 79–88.
- DOUDOUMIS V., ALAM U., AKSOY E., ABD-ALLA A.M.M., TSIAMIS G., BRELSFOARD C., AKSOY S. & BOURTZIS K. (2013). Tsetse-Wolbachia symbiosis: comes of age and has great potential for pest and disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(0) : S94-103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.010>
- DOUGLAS A.E. (2011). Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe* **10**, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.001>
- DUKES P., GIBSON W.C., GASHUMBA J.K., HUDSON K.M., BROMIDGE T.J., MED KAUKUS A., ASONGANYI T. & MAGNUS E. (1992). Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Tropica*, 51(2) : 123–134.
- DUMAS M. & BOUTEILLE B. (1996). Trypanosomose humaine africaine [Human African trypanosomiasis]. *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 190 (4) : 395–408.
- DURVASULA R.V., GUMBS A., PANACKAL A., KRUGLOV O., AKSOY S., MERRIFIELD R.B., RICHARDS F.F. & BEARD C.B. (1997). Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7) : 3274–3278.
- DURVASULA R.V., GUMBS A., PANACKAL A., KRUGLOV O., TANEJA J., KANG A.S., CORDON-ROSALES C., RICHARDS F.F., WHITHAM R.G. & BEARD C.B. (1999). Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Medical and Veterinary Entomology*, 13(2) :115–119.
- DYCK V.A., HENDRICHS J.P. & ROBINSON A.S. (2005). The Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. *Springer, Dordrecht*.
- DYER N. A., ROSE C., EJEH N. O. & ACOSTA-SERRANO, A. (2013). Flying tryps: survival and maturation of trypanosomes in tsetse flies. *Trends in Parasitology*, 29(4), 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.02.003>

E

- EICHHORN T., WINTER D., BÜCHELE B., DIRDJAJA N., FRANK M., LEHMANN W.D., MERTENS R., KRAUTH-SIEGEL R.L., SIMMET T., GRANZIN J. & EFFERTH T. (2013). Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*, 85 (1) : 38–45.
- ELSEN P., AMOUDI M.A. & LECLERCQ M. (1991). A propos de la découverte, en Arabie Saoudite, de deux espèces de mouches tsé-tsé vectrices de trypanosomiasis humaines et animales [Discovery in Saudi Arabia of two species of tsetse fly that are vectors of human and animal trypanosomiasis]. *Revue Médicale de Liège*, 46 : 225-231.
- EMERSON D., RENTZ J.A., LILBURN T.G., DAVIS R.E., ALDRICH H., CHAN C. & MOYER C.L. (2007). A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. *PLoS ONE*, 2(7) : e667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000667>
- ENGLUND P.T., HAJDUK S.L. & MARINI J.C. (1982). The molecular biology of trypanosomes. *Annual Reviews of Biochemistry*, 51 : 695–726. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.003403>

F

- FARIKOU O., NJIOKOU F., MBIDA MBIDA J.A., NJITCHOUANG G.R., DJEUNGA H.N., ASONGANYI T., SIMARRO P.P., CUNY G. & GEIGER A. (2010a). Tripartite interactions between tsetse flies, *Sodalis glossinidius* and trypanosomes—An epidemiological approach in two historical human African trypanosomiasis foci in Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(1) : 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.10.008>
- FARIKOU O., NJIOKOU F., SIMO G., ASONGANYI T., CUNY G. & GEIGER A. (2010b). Tsetse fly blood meal modification and trypanosome identification in two sleeping sickness foci in the forest of southern Cameroon. *Acta Tropica*, 116(1) : 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.06.002>
- FARIKOU O., THEVENON S., NJIOKOU F., ALLAL F., CUNY G. & GEIGER A. (2011). Genetic Diversity and Population Structure of the Secondary Symbiont of Tsetse Flies,

Sodalis glossinidius , in Sleeping Sickness Foci in Cameroon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8) : e1281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001281>

FORD J. & LEGGATE B.M. (1961). The geographical and climatic distribution of trypanosome infection rates in *G. morsitans* group of tsetse-flies (*Glossina wied.*, diptera). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(4) : 383–397. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(61\)90108-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(61)90108-0)

FRANCO J.R., CECCHI G., PRIOTTO G., PAONE M., DIARRA A., GROUT L., MATTIOLI R.C. & ARGAW D. (2018). Monitoring the elimination of human african trypanosomiasis: update to 2016. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(12) : e0006890.

G

GEIB S.M., JIMENEZ-GASCO MDEL M., CARLSON J.E., TIEN M. & HOOVER K. (2009). Effect of host tree species on cellulase activity and bacterial community composition in the gut of larval Asian long horned beetle. *Environmental Entomology*, 38(3) : 686–699.

GEIGER A., FARDEAU M-L., FALSEN E., OLLIVIER B. & CUNY G. (2010b). *Serratia glossinae* sp. nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6) : 1261–1265. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013441-0>

GEIGER A., FARDEAU M-L., GREBAUT P., VATUNGA G., JOSÉNANDO T., HERDER S., CUNY G., TRUC P. & OLLIVIER B. (2009). First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infection Genetics and Evolution*, 9(6) : 1364–1370. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.013>

GEIGER A., FARDEAU M-L., NJIOKOU F., JOSEPH M., ASONGANYI T., OLLIVIER B. & CUNY G. (2011). Bacterial Diversity Associated with Populations of *Glossina* spp. from Cameroon and Distribution within the Campo Sleeping Sickness Focus. *Microbial Ecology*; 62(3) : 632–643. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9830-y>

GEIGER A., FARDEAU M-L., NJIOKOU F. & OLLIVIER B. (2013). *Glossina* spp. gut bacterial flora and their putative role in fly-hosted trypanosome development.

- GEIGER A., HAMIDOU SOUMANA I., TCHICAYA B., ROFIDAL V., DECOURCELLE M., SANTONI V. & HEM S. (2015). Differential expression of midgut proteins in *Trypanosoma brucei gambiense*-stimulated vs. non-stimulated *Glossina palpalis gambiensis* flies. *Frontiers in Microbiology*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00444>
- GEIGER A., HIRTZ C., BECUE T., BELLARD E., CENTENO D., GARGANI D., ROSSIGNOL M., CUNY G. & PELTIER J.B. (2010a). Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiology*, 10 : 20.
- GEIGER A., MALELE I., ABD-ALLA A.M. & NJIOKOU F. (2018). *Trypanosoma*-tsetse fly interactions: current and potential future research directions. *BMC Microbiology*, 18 : 162.
- GEIGER A., RAVEL S., FRUTOS R. & CUNY G. (2005). *Sodalis glossinidius* (Enterobacteriaceae) and vectorial competence of *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina morsitans morsitans* for *Trypanosoma congolense* savannah type. *Current Microbiology* **51**, 35–40. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4525-6>
- GEIGER A., RAVEL S., MATEILLE T., JANELLE J., PATREL D., CUNY G. & FRUTOS R. (2007). Vector Competence of *Glossina palpalis gambiensis* for *Trypanosoma brucei* s.l. and Genetic Diversity of the Symbiont *Sodalis glossinidius*. *Molecular Biology and Evolution*, 24(1) : 102–109. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl135>
- GIBSON W. & BAILEY M. (2003). The development of *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly midgut observed using green fluorescent trypanosomes. *Kinetoplastid biology and disease*, 2(1), 1-13.
- GIMONNEAU G., TCHIOFFO M.T., ABATE L., BOISSIÈRE A., AWONO-AMBÉNÉ P.H., NSANGO S.E., CHRISTEN R. & MORLAIS I. (2014). Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. *Infection, Genetics and Evolution*, 28 : 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.029>

- GINGRICH J.B., WARD R.A., MACKEN L.M. & ESSER K.M. (1982). African sleeping sickness: new evidence that mature tsetse flies (*Glossina morsitans*) can become potent vectors. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **76**, 479–481. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(82\)90142-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(82)90142-0)
- GOODING R.H. (1977a). Digestive processes of haematophagous insects. XIV. Haemolytic activity in the midgut of *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae). *Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie*, **55**(11) : 1899–1905.
- GOODING R.H. (1997b). Genetic analysis of hybrid sterility in crosses of the tsetse flies *Glossina palpalis palpalis* and *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae). *Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie*, **75**(7): 1109-1117.
- GOODING R.H. & MOLOO S.K. (1994). Genetics of two colonies of *Glossina pallidipes* originating from allopatric populations in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, **8**, 133–136.
- GOODING R.H., SOLANO P. & RAVEL S. (2004). X-chromosome mapping experiments suggest occurrence of cryptic species in the tsetse fly *Glossina palpalis palpalis*. *Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie*, **82**(12) : 1902-1909.
- GOUTEUX J. P. & DAGNOGO M. (1985). Homogénéité morphologique des genitalia mâles de *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Muscidae) en Côte d'Ivoire. *Cahier O.R.S.T.O.M, série Entomologie médicale et Parasitologie*, **23**(1) : 55-59.
- GOUTEUX J. P. & LANCIEN J. (1986). The pyramidal trap for collecting and controlling tsetse-flies (Diptera-Glossinidae) – comparative trials and description of new collecting technics. *Tropical Medicine and Parasitology*, **37**(1) : 61-66.
- GOUTEUX J.P., KOUNDA GBOUMBI J.C., NOUTOUA L., D'AMICO F., BAILLY C. & ROUNGOU J.B. (1993). Man-fly contact in the Gambian trypanosomiasis focus of Nola-Bilolo (Central African Republic). *Tropical Medicine and Parasitology, Official Organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, **44**(3) : 213–218.
- GOUVEIA C., ASENSI M.D., ZAHNER V., RANGEL E.F. & OLIVEIRA S.M. (2008). Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotropical Entomology*, 37(5) : 597–601.

GRIFFITH F. LI. (1898). The petrie papyri: Hieratic papyri from Kahun and Gurob (principally of the middle kingdom). *London: Quaritch*. <http://archive.org/details/hieraticpapyrifr00grifuoft>.

H

HAAG J., O'HUIGIN C. & OVERATH P. (1998). The molecular phylogeny of trypanosomes: Evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91(1) : 37–49.

HAGAN H.R. (1951). Embryology of the viviparous insects. *Roland Press Compagny*, New York, 472p.

HAINES L. R. (2013). Examining the tsetse teneral phenomenon and permissiveness to trypanosome infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 84.

HAINES L.R., JACKSON A.M., LEHANE M.J., THOMAS J.M., YAMAGUCHI A.Y., HADDOW J.D. & PEARSON T.W. (2005). Increased expression of unusual EP repeat-containing proteins in the midgut of the tsetse fly (*Glossina*) after bacterial challenge. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.005>

HAINES L.R., LEHANE S.M., PEARSON T.W. & LEHANE M.J. (2010). Tsetse EP Protein Protects the Fly Midgut from Trypanosome Establishment. *PLoS Pathogens* 6, e1000793. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000793>

HAMIDOU SOUMANA I., KLOPP C., RAVEL S., NABIHOUDINE I., TCHICAYA B., PARRINELLO H., ABATE L., RIALLE S. & GEIGER A. (2015). RNA-seq de novo Assembly Reveals Differential Gene Expression in *Glossina palpalis gambiense* Infected with *Trypanosoma brucei gambiense* vs. Non-Infected and Self-Cured Flies. *Frontiers in Microbiology*, 6 : 1259. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01259>

HAMIDOU SOUMANA I., TCHICAYA B., SIMO G. & GEIGER A. (2014). Comparative gene expression of *Wigglesworthia* inhabiting non-infected and *Trypanosoma brucei gambiense*-infected *Glossina palpalis gambiense* flies. *Frontiers in Microbiology*, 5 : 620. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00620>

- HAO Z., KASUMBA I., LEHANE M.J., GIBSON W.C., KWON J. & AKSOY S. (2001). Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.* **98**, 12648–12653. <https://doi.org/10.1073/pnas.221363798>
- HERDER S., SIMO G., NKININ S. & NJIOKOU F. (2002). Identification of trypanosomes in wild animals from Southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR). *Parasite*, 9(4) : 345–349. <https://doi.org/10.1051/parasite/2002094345>
- HOARE C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. In: Mulligan, H. W. (1970). The African trypanosomiases, *Editions Allen and Unwin*, London, 159p.
- HOFFMANN A.A., MONTGOMERY B.L., POPOVICI J., ITURBE-ORMAETXE I., JOHNSON P.H., MUZZI F., GREENFIELD M., DURKAN M., LEONG Y.S., DONG Y., COOK H., AXFORD J., CALLAHAN A.G., KENNY N., OMODEI C., MCGRAW E.A., RYAN P.A., RITCHIE S.A., TURELLI M. & O'NEILL S.L. (2011). Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 476(7361) : 454–457.
- HOLMES P.H. (2013). Tsetse-transmitted trypanosomes – Their biology, disease impact and control. *Journal of Invertebrate Pathology*; 112 : S11–S14. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.014>
- HOLMES P.H., EISLER M.C., GEERTS S. (2004). Current chemotherapy of animal trypanosomiasis. In: Holmes, Maudlin, Miles (Eds.), *The trypanosomiases*. CABI Publishing, Oxford, UK, pp. 431-444.
- HORN D. (2014). Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(2) : 123–129.
- HU Y. & AKSOY, S. (2005). An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.10.007>
- I**
- IMBUGA M.O., OSIR E.O., LABONGO V.L., DARJI N. & OTIENO L.H. (1992). Studies on tsetse midgut factors that induce differentiation of blood-stream *Trypanosoma brucei brucei* in vitro. *Parasitology Research* **78**, 10–15.

J

- JACOB F., MELACHIO T.T., NJITCHOUANG G.R., GIMONNEAU G., NJIOKOU F., ABATE L., CHRISTEN R., REVEILLAUD J. & GEIGER A. (2017). Intestinal Bacterial Communities of Trypanosome-Infected and Uninfected *Glossina palpalis palpalis* from Three Human African Trypanomiasis Foci in Cameroon. *Frontiers in Microbiology*, 8 : 1464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01464>
- JAMONNEAU V., RAVEL S., KOFFI M., KABA D., ZEZE D.G., NDRI L., SANE B., COULIBALLY B., CUNY G. & SOLANO P. (2004). Mixed infection of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in sleeping sickness focus of Côte d'Ivoire. *Parasitology*, 129(6) : 693-702.
- JASINSKIENE N., COATES C.J., BENEDICT M.Q., CORNEL A.J., RAFFERTY C.S., JAMES A.A. & COLLINS F.H. (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7) : 3743–3747.
- JORDAN A. M. (1986). Trypanosomiasis control and African rural development. Longman, London, New York, 367p.

K

- KADIOGLU O. & EFFERTH T. (2016). Peptide aptamer identified by molecular docking targeting translationally controlled tumor protein in leukemia cells. *Investigational New Drugs*, 34(4) : 515-521.
- KARIITHI H. M., MEKI I. K., SCHNEIDER D. I., DE VOOGHT L., KHAMIS F. M., GEIGER, A., DEMIRBAS-UZEL G., VLAK J.M., INCE I.A., KELM S., NJIOKOU F., WAMWIRI F. N., MALELE II & ABD-ALLA A.M.M. (2018). Enhancing vector refractoriness to trypanosome infection: achievements, challenges and perspectives. In Abd-Alla A.M.M. (ed.), Boucias D.G. (ed.). Special issue on enhancing vector refractoriness to trypanosome infection-foreword. *BMC microbiology*, 18(1) : 1471-2180.
- KATO A. B., HYSENI C., OKEDI L. M., OUMA J.O., AKSOY S., CACCONE A. & MASEMBE C. (2015). Mitochondrial DNA sequence divergence and diversity of *Glossina fuscipes fuscipes* in the Lake Victoria basin of Uganda: implications for control. *Parasites and Vectors* 8(1) : 1-13.

- KAZADI J.M., LOSSON B. & KAGERUKA P. (2000). Vectorial competence of non-teneral *Glossina morsitans morsitans* (Mall strain) flies infected by *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense* IL 1180. *Bulletin de la Société de Pathologies Exotique* 1990. **93**, 125–128.
- KAZADI J.M., VAN HEES J., JOCHEMS M. & KAGERUKA P. (1991). Vectorial capacity of *Glossina palpalis gambiensis* (Bobo Dioulasso) for *Trypanosoma brucei brucei* EATRO 1125]. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **44**, 437–442.
- KENNEDY P.G.E. (2008). The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Annals of Neurology*, 64(2) : 116–126. <https://doi.org/10.1002/ana.21429>
- KETTLE. D.S. (1995). *Medical and Veterinary Entomology*. 2nd Edition, Eds CAB International.
- KOZICH J.J., WESTCOTT S.L., BAXTER N.T., HIGHLANDER S.K. & SCHLOSS P.D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17) : 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- KUBI C., VAN DEN ABEELE J., DE DEKEN R., MARCOTTY T., DORNY P. & VAN DEN BOSSCHE P. (2006). The effect of starvation on the susceptibility of teneral and non-teneral tsetse flies to trypanosome infection. *Medical and Veterinary Entomology* **20**, 388–392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00644.x>
- L**
- LAVEISSIERE C., GREBAUT P., HERDER S. & PENCHENIER L. (2000). Les Glossines vectrices de la trypanosomiase humaine africaine. Edition OCEAC, 246p.
- LAZARO J.E., NITCHEU J., PREDICALA R.Z., MANGALINDAN G.C., NESSLANY F., MARZIN D., CONCEPCION G.P. & DIQUET B. (2002). Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro. *Journal of Natural Toxins*, 11(4) : 367–377.
- LEHANE M.J., AKSOY S., GIBSON W., KERHORNOU A., BERRIMAN M., HAMILTON J., SOARES M.B., BONALDO M.F., LEHANE S. & HALL N. (2003). Adult midgut

expressed sequence tags from the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* and expression analysis of putative immune response genes. *Genome Biology* **4**, R63. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-10-r63>

LEHANE M.J., AKSOY S. & LEVASHINA, E. (2004). Immune responses and parasite transmission in blood-feeding insects. *Trends in Parasitology*. **20**, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.002>

LEHANE M.J., ALLINGHAM P.G. & WEGLIICKI P. (1996). Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Cell and Tissue Research* **283**, 375–384. <https://doi.org/10.1007/s004410050548>

LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.E., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R., LOM J., LYNN D., MERINFELD E.G., PAGE F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J. & WALLACE F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27(1) : 37–58.

LINDNER A.K., LEJON V., CHAPPUIS F., SEIXAS J., KAZUMBA L., BARRETT M.P., MWAMBA E., ERPHAS O., AKL E.A., VILLANUEVA G., BERGMAN H., SIMARRO P., EBEJA A.K., PRIOTTO G. & FRANCO J.R. (2020). New WHO guidelines for treatment of *Trypanosoma gambiense* Human African Trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(2) : e38–e46.

M

MACLEOD E.T., MAUDLIN I., DARBY A.C. & WELBURN S.C. (2007). Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology* **134**, 827. <https://doi.org/10.1017/S0031182007002247>

MAGNUS E., VERVOORT T. & VAN MEIRVENNE N. (1978). A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 58(3) : 169–176.

MAHAMAT M.H., PEKA M., RAYAISSSE J.B., ROCK K.S., TOKO M.A., DARNAS J., BRAHIM G. M., ALKATIB A.B., YONI W., TIRADOS I., COURTIN F., BRAND S.P.C., NERSY C., ALFAROUKH I.O., TORR S.J., LEHANE M.J. & SOLANO P.

- (2017). Adding tsetse control to medical activities contributes to decreasing transmission of sleeping sickness in the Mandoul focus (Chad). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7) : e0005792.
- MAHE F., ROGNES T., QUINCE C., DE VARGAS C. & DUNTHORN M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2 : e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- MANAIA C.M., NOGALES B. & NUNES O.C. (2003). *Tepidiphilus margaritifera* gen. Nov., sp. nov., isolated from a thermophilic aerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5) : 1405–1410.
- MARTIN M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal*, 17(1) : 10–12.
- MASIGA D. K., SMYTH A. J., HAYES P., BROMIDGE T. J. & GIBSON W. C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International journal for parasitology*, 22(7) : 909-918.
- MAUDLIN I. (1982). Inheritance of susceptibility to *Trypanosoma congolense* infection in *Glossina morsitans*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 76(2) : 225–227. <https://doi.org/10.1080/00034983.1982.11687531>
- MAUDLIN I. & ELLIS D. S. (1985). Association between intracellular rickettsial-like infections of midgut cells and susceptibility to trypanosome infection in *Glossina* spp. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71(5) : 683-687.
- MAUDLIN I., KABAYO J.P., FLOOD M.E. & EVANS D.A. (1984). Serum factors and the maturation of *Trypanosoma congolense* infections in *Glossina morsitans*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70(1) : 11–19.
- MAUDLIN I. & WELBURN S. C. (1987). Lectin mediated establishment of midgut infections of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* in *Glossina morsitans*. *Tropical Medicine and Parasitology*, 38(3) : 167–170.
- MAUDLIN I., WELBURN S.C. & MILLIGAN P. (1990). Salivary gland infection: a sex-linked recessive character in tsetse? *Acta Tropica*, 48(1) : 9–15. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(90\)90060-D](https://doi.org/10.1016/0001-706X(90)90060-D)
- MAXMEN A. (2017). Sleeping sickness can now be cured with pills. *Nature*, 550 : 441. <https://doi.org/10.1038/nature.2017.22856>

- MBIDA MBIDA J. A. (2006). Glossines et transmission de la trypanosomiase humaine africaine en zone forestière du sud Cameroun. Thèse de Doctorat 3ème Cycle, Université de Yaoundé I, 154p.
- MCNAMARA J.J., LAVEISSIERE C. & MASIGA D.K. (1995). Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Côte d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta Tropica*, 59(2) : 85-92.
- MERCADO T.I. & COLON-WHITT A. (1982). Lysis of *Trypanosoma cruzi* by *Pseudomonas fluorescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(6) : 1051–1057.
- MIHOK S., OTIENO L.H., DARJI N. & MUNYINYI D. (1992). Influence of d(+)-glucosamine on infection rates and parasite loads in tsetse flies (*Glossina* spp.) infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Tropica*. **51**, 217–228. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(92\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0001-706X(92)90040-5)
- MOGI M. & TEJI S. (1991). *Advances in Disease Vector Research*. Springer, New York. pp. 47-76.
- MOLOO S.K. (1993). The distribution of *Glossina* species in Africa and their natural hosts. *International Journal of Tropical Insect Science* **14**, 511–527. <https://doi.org/10.1017/S1742758400014211>
- MOLOO S.K., GROOTENHUIS J.G., KAR S.K. & KARSTAD L. (1988). Survival and reproductive performance of female *Glossina morsitans morsitans* when maintained on the blood of different species of wild mammals. *Medical and Veterinary Entomology*, 2(4) : 347–350.
- MOLOO S.K., ZWEYGARTH E. & SABWA C.L. (1994). Comparative study on the susceptibility of different laboratory strains of *Glossina* species to *Trypanosoma simiae*. *Medical and Veterinary Entomology* **8**, 225–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00503.x>
- MOREIRA L.A., ITURBE-ORMAETXE I., JEFFERY J.A., LU G., PYKE A.T., HEDGES L.M., ROCHA B.C., HALL-MENDELIN S., DAY A., RIEGLER M., HUGO L.E., JOHNSON K.N., KAY B.H., MCGRAW E.A., VAN DEN HURK A.F., RYAN P.A. & O'NEILL S.L. (2009). A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* **139**, 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>

- MORLAIS I., GREBAUT P., BODO J. M., DJOHA S., CUNY G. & HERDER S. (1998). Detection and identification of trypanosomes by polymerase chain reaction in wild tsetse flies in Cameroon. *Acta Tropica*, 70(1) : 109-117.
- MOSER D.R., COOK G.A., OCHS D.E., BAILEY C.P., MCKANE M.R. & DONELSON J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, 99(1) : 57–66.
- MOSS M. (2002). Bacterial pigments. *Microbiologist*, 3 : 10–12.
- MOUCHET J., GARIOU J. & RATEAU J. (1958). Distribution géographique et écologique de *Glossina palpalis palpalis* Rob-Desv. et *G. fuscipes fuscipes* Newst. au Cameroun. *Bulletin de la société de pathologie exotique*, 51(4) : 652-661.
- MULLIGAN H.W. (1970). The African trypanosomes. Edition *George Allen and Unwin LTD*, London, 950p.
- MURANJAN M., WANG Q., LI Y.L., HAMILTON E., OTIENO-OMONDI F.P., WANG J., VAN PRAAGH A., GROOTENHUIS J.G. & BLACK S.J. (1997). The trypanocidal Cape buffalo serum protein is xanthine oxidase. *Infection and Immunity* **65**, 3806–3814.
- MWANGELWA M.I., OTIENO L.H. & REID G.D.F. (1987). Some barriers to *Trypanosoma congolense* development in *Glossina morsitans morsitans*. *International Journal of Tropical Insect Science* **8**, 33–37. <https://doi.org/10.1017/S1742758400006913>
- N**
- NAKAYIMA J., NAKAO R., ALHASSAN A., MAHAMA C., AFAKYE K. & SUGIMOTO C. (2012). Molecular epidemiological studies on animal trypanosomiasis in Ghana. *Parasites and Vectors*, 5(1) : 217.
- NAYDUCH D. & AKSOY, S. (2007). Refractoriness in tsetse flies (Diptera: Glossinidae) may be a matter of timing. *Journal of Medical Entomology*, **44**, 660–665.
- NDEGWA P.N., IRUNGU L.W. & MOLOO, S.K. (1992). Effect of puparia incubation temperature: increased infection rates of *Trypanosoma congolense* in *Glossina morsitans centralis*, *G. fuscipes fuscipes* and *Glossina brevipalpis*. *Medical and Veterinary Entomology* **6**, 127–130.

- NGUU E.K., OSIR E.O., IMBUGA M.O. & OLEMBO N.K. (1996). The effect of host blood in the in vitro transformation of bloodstream trypanosomes by tsetse midgut homogenates. *Medical and Veterinary Entomology* **10**, 317–322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00751.x>
- NJIOKOU F., LAVEISSIERE C., SIMO G., NKININ S., GREBAUT P., CUNY G. & HERDER S. (2006). Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infection, Genetic and Evolutions*, 6(2) : 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2005.04.003>
- NJIOKOU F., SIMO G., MBIDA MBIDA A., TRUC P., CUNY G. & HERDER S. A. (2004). Study of host preference in tsetse flies using a modified heteroduplex PCR- based method. *Acta Tropica*, 91(2) : 117-120.
- NJIOKOU F., SIMO G., NKININ S.W., LAVEISSIÈRE C. & HERDER S. (2004). Infection rate of *Trypanosoma brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* “forest type”, and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroon. *Acta Tropica*, 92(2) : 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.04.011>
- NOLAN T., BOWER T.M., BROWN A.E., CRISANTI A. & CATTERUCCIA F. (2002). *piggyBac* -mediated Germline Transformation of the Malaria Mosquito *Anopheles stephensi* Using the Red Fluorescent Protein dsRED as a Selectable Marker. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11) : 8759–8762. <https://doi.org/10.1074/jbc.C1007-66200>
- O**
- OLIVRY J.C. (1986). Fleuves et rivières du Cameroun. Collection “Monographies Hydrologiques ORSTOM”, volume 9, MESRES-ORSTOM, Paris, 733p.
- OLUBAYO R.O., MIHOK S., MUNYOKI E., & OTIENO L.H. (1994). Dynamics of host blood effects in *Glossina morsitans* spp. infected with *Trypanosoma congolense* and *T. brucei*. *Parasitology Research*, 80(3), 177–181. <https://doi.org/10.1007/BF009-32670>
- OMS. (2013). Trypanosomiase humaine africaine : lutte et surveillance. *Série Des Rapports Techniques de L’oms*, n° 984.
- OMS. (2017). Centre des médias. Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil). Aide-mémoire, n° 259, janvier 2017.

OMS. (2019). Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)). Accessed 11 October 2019.

ORR H. A. (1997). Haldane's rule. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28 : 195- 218.

P

PAIS R., LOHS C., WU Y., WANG J. & AKSOY S. (2008). The Obligate Mutualist *Wigglesworthia glossinidia* Influences Reproduction, Digestion, and Immunity Processes of Its Host, the Tsetse Fly. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5965–5974. <https://doi.org/10.1128/AEM.00741-08>

PAYS E. & STEINERT M. (1988). Control of Antigen Gene Expression in African Trypanosomes. *Annual Review of Genetics*, 22 : 107–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.000543>

PENCHENIER L., GREBAUT P., EBO'O EYENGA V., BODO J. M., NJIOKOU F., BINZOULI J. J., SIMARRO P., SOULA G. & HERDER S. (1999). Le foyer de la Trypanosomiase Humaine Africaine de Campo (Cameroun) en 1998 : Aspects épidémiologiques, état de l'endémie et comparaison des CATT 1.3 et CATT Latex dans le dépistage de masse. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 92 : 185-190.

PENCHENIER L. & LAVEISSIERE C. (2000). Manuel de la lutte contre la maladie du sommeil en Afrique Centrale et Occidentale : généralités volume 1. *OCEAC*, 66p.

PODDAR A., LEPCHA R.T. & DAS S.K. (2014). Taxonomic study of the genus *Tepidiphilus*: transfer of *Petrobacter succinatimandens* to the genus *Tepidiphilus* as *Tepidiphilus succinatimandens* com. Nov., emended description of the genus *Tepidiphilus* and description of *Tepidiphilus thermophiles* sp.nov., isolated from a terrestrial hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(1) : 228–235.

POINAR JR G.O., WASSINK H.J., LEEGWATER-VAN DER LINDEN M.E. & VAN DER GEEST L.P. (1979). *Serratia marcescens* as a pathogen of tsetse flies. *Acta Tropica*, 36(3): 223–227.

POLLOCK J. N. (1982). Trainig manual for tsetse control personnel. Tsetse biology, systematic and distribution, technics. *F.A.O.*, 280p.

PUMPUNI C.B., DEMAIO J., KENT M., DAVIS J.R. & BEIER J.C. (1996). Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on Plasmodium sporogonic development. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54(2): 214–218.

R

REDUTH D., GROOTENHUIS J.G., OLUBAYO R.O., MURANJAN M., OTIENO-OMONDI F.P., MORGAN G.A., BRUN R., WILLIAMS D.J. & BLACK S.J. (1994). African buffalo serum contains novel trypanocidal protein. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41, 95–103.

RIO R.V.M., HU Y. & AKSOY S. (2004). Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *Trends in Microbiology*, 12(7) : 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.001>

RIO R.V.M., SYMULA R.E., WANG J., LOHS C., WU Y., SNYDER A.K., BJORNSON R.D., OSHIMA K., BIEHL B.S., PERNA N.T., HATTORI M. & AKSOY S. (2012). Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse (Diptera: *glossinidae*) obligate symbiont *Wigglesworthia*. *mBio*, 3(1) : e00240-e311. <https://doi.org/10.1128/mBio.00240-11>

RODGERS J. (2010). Trypanosomiasis and the brain. *Parasitology*, 137(14) : 1995–2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991806>

RODITI I., & CLAYTON C. (1999). An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 1(103), 99-100.

ROGNES T., FLOURI T., NICHOLS B., QUINCE C. & MAHE F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4 : e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

ROQUE C.G., WONG H.H., LIN J.Q. & HOLT C.E. (2016). Tumor protein TCTP regulates axon development in the embryonic visual system. *Development*, 143(7) : 1134-1148.

S

SALINAS M.B., FARDEAU M-L., CAYOL J-L., CASALOT L., PATEL B.K.C., THOMAS P., GARCIA J-L. & OLLIVIER B. (2004). *Petrobacter succinatimandens* gen. Nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an

Australian oil well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3) : 645-649.

SEGATA N., IZARD J., WALDRON L., GEVERS D., MIROPOLSKY L., GARRETT W.S. & HUTTENHOWER C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6) : R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>

SEO E-J. & EFFERTH T. (2016). Interaction of antihistaminic drugs with human translationally controlled tumor protein (TCTP) as novel approach for differentiation therapy. *Oncotarget*, 7(13) : 16818–16839.

SHAPIRO S.Z., NAESSENS J., LIESEGANG B., MOLOO S.K. & MAGONDU J. (1984). Analysis by flow cytometry of DNA synthesis during the life cycle of African trypanosomes. *Acta Tropica*, 41(4) : 313–323.

SHAW A.P., TORR S.J., WAISWA C., CECCHI G., WINT G.R., MATTIOLI R.C. & ROBINSON T.P. (2013). Estimating the costs of tsetse control options: an example for Uganda. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(3) : 290–303.

SIMARRO P.P., CECCHI G., PAONE M., FRANCO J.R., DIARRA A., RUIZ J.A., FÈVRE E.M., COURTIN F., MATTIOLI R.C. & JANNIN J.G. (2010). The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *International Journal of Health Geographics*, 9 : 57. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-9-57>

SIMARRO P.P., JANNIN J. & CATTAND P. (2008). Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next? *PLOS Medicine*, 5(2) : e55. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050055>

SIMO G., ASONGANYI T., NKININ S.W., NJIOKOU F. & HERDER S. (2006). High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3) : 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.026>

SIMO G., MBIDA J., EYENGA V., ASONGANYI T., NJIOKOU F. & GRÉBAUT P. (2014). Challenges towards the elimination of Human African Trypanosomiasis in the sleeping sickness focus of Campo in southern Cameroon. *Parasites and Vectors*, 7 : 374. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-374>

- SIMO G., NJIOKOU F., MBIDA MBIDA A., NJITCHOUANG G.R., HERDER S., ASONGANY T. & CUNY G. (2008). Tsetse fly host preference from sleeping sickness foci in Cameroon: epidemiologic implication. *Infection, genetics and evolution*, 8(1) : 34-39.
- SNYDER A.K. & RIO R.V.M. (2015). “*Wigglesworthia morsitans*” Folate (Vitamin B₉) Biosynthesis Contributes to Tsetse Host Fitness. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16) : 5375–5386. <https://doi.org/10.1128/AEM.00553-15>
- SOLANO P. & AMSLER-DELAFOSSÉ S. (1995). *Trypanosoma congolense* in different species of horse flies (Diptera: Tabanidae) in Burkina Faso. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 48 (2) : 145-146.
- SOLANO P., SALOU E., RAYAISSE J-B., RAVEL S., GIMONNEAU G., TRAORE I. & BOUYER J. (2015). Do tsetse flies only feed on blood? *Infection, Genetics and Evolution*, 36: 184–189.
- STIERUM R., GASPARI M., DOMMELS Y., OUATAS T., PLUK H., JESPERSEN S., VOGELS J., VERHOECKX K., GROTEN J. & VAN OMMEN B. (2003). Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1650(1-2) : 73–91.
- STRAIF S.C., MBOGO C.N.M., TOURE A.M., WALKER E.D., KAUFMAN M., TOURE Y.T. & BEIER J.C. (1998). Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *Journal of Medical Entomology*, 35(3) : 222–226.
- SUSINI L., BESSE S., DUFLAUT D., LESPAIGNOL A., BEEKMAN C., FIUCCI G., ATKINSON A.R., BUSSO D., POUSSIN P., MARINE J-C., MARTINOU J-C., CAVARELLI J., MORAS D., AMSON R. & TELERMAN A. (2008). TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death and Differentiation*, 15(8) : 1211–1220.
- SYMULA R.E., ALAM U., BRELSFOARD C., WU Y., ECHODU R., OKEDI L.M., AKSOY S. & CACCONE A. (2013). *Wolbachia* association with the tsetse fly, *Glossina fuscipes fuscipes*, reveals high levels of genetic diversity and complex evolutionary dynamics. *BMC Ecology and Evolution* **13**, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-31>

T

- TCHIOFFO M.T., BOISSIÈRE A., ABATE L., NSANGO S.E., BAYIBÉKI A.N., AWONO-AMBÉNÉ P.H., CHRISTEN R., GIMONNEAU G. & MORLAIS I. (2016). Dynamics of Bacterial Community Composition in the Malaria Mosquito's Epithelia. *Frontiers in Microbiology*, 6 : 1500. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01500>
- TERENIUS O., LINDH J.M., ERIKSSON-GONZALES K., BUSSIÈRE L., LAUGEN A.T., BERGQUIST H., TITANJI K. & FAYE I. (2012). Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3) : 556–565.
- TESSEMA M.B., GIRMA M. & DAGNACHEW S. (2014). African trypanosomes: virulence factors, pathogenicity and host responses. *Journal of Veterinary Advances*, 4(11) : 732–745.
- TRUC P., JAMONNEAU V., N'GUESSAN P., DIALLO P.B. & GARCIA A. (1998). Parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis: a comparison of the OBC and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3) : 288–289.
- TSAGMO NGOUNE J. M., REVEILLAUD J., SEMPERE G., [NJIOKOU F.](#), [MELACHIO T.T.](#), [ABATE L.](#), [TCHIOFFO M. T.](#) & [GEIGER A.](#) (2019). The composition and abundance of bacterial communities residing in the gut of *Glossina palpalis palpalis* captured in two sites of southern Cameroon. *Parasites and Vectors*, 12(1) : 151. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3402-2>

V

- VALE G. A. (1980). Field studies of the responses of tsetse flies (*Glossinidae*) and other dipteran to carbon dioxide, acetone and other chemicals. *Bulletin of Entomological Research*, 70 : 563-570.
- VAN DEN ABBEELE J., BOURTZIS K., WEISS B., CORDÓN-ROSALES C., MILLER W., ABD-ALLA A.M.M. & PARKER A. (2013). Enhancing tsetse fly refractoriness to trypanosome infection – A new IAEA coordinated research project. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112 : S142–S147. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.020>

- VAN DEN ABBEELE J., CLAES Y., VAN BOCKSTAELE D., LE RAY D. & COOSEMANS M. (1999). *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology*, 118(5) : 469–478.
- VAN DEN BOSSCHE P., AKODA K., DJAGMAH B., MARCOTTY T., DE DEKEN R., KUBI C., PARKER A. & VAN DEN ABBEELE J. (2006). Effect of isometamidium chloride treatment on susceptibility of tsetse flies (Diptera: *Glossinidae*) to trypanosome infections. *Journal of Medical Entomology*, 43(3) : 564–567.
- VAN DER PLANCK F. L. (1949). The classification of *Glossina palpalis*, including the descriptions of new subspecies and hybrids. *Proceedings of the Entomological Society of London*, 18(3-4) : 69-77.
- VAN MEIRVENNE N., MAGNUS E. & BÜSCHER P. (1995). Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Tropica*, 60(3) : 189–199.
- VICKERMAN K. (1978). Antigenic variation in trypanosomes. *Nature*, 273(5664) : 613–617.
- VINCENDEAU P., DAULOUEDE S., VEYRET B., DARDE M. L., BOUTEILLE B. & LEMESRE J. L. (1992). Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Experimental Parasitology*, 75(3) : 353–360.
- VREYSEN M.J.B. & ROBINSON A.S. (2011). Ionizing radiation and area-wide management of insect pests to promote sustainable agriculture: A review *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1) : 233–250.
- VREYSEN M.J.B., SALEH K.M., ALI M.Y., ABDULLA A.M., ZHU Z-R., JUMA K.G., DYCK V.A., MSANGI A.R., MKONYI P.A. & FELDMANN H.U. (2000). *Glossina austeni* (Diptera: *Glossinidae*) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique. *Journal of Economic Entomology*, 93(1) : 123–135. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.1.123>
- VREYSEN M.J.B., SECK M.T., SALL B. & BOUYER J. (2013). Tsetse flies: Their biology and control using area-wide integrated pest management approaches. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112 : S15–S25. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.026>

W

- WALSHE D.P., OOI CHER-PHENG., LEHANE M.J. & HAINES L.R. (2009). The Enemy Within: Interactions Between Tsetse, Trypanosomes and Symbionts. *Advances in Insect Physiology*, 37 : 119-175.
- WANG J., WEISS B.L. & AKSOY S. (2013). Tsetse fly microbiota: form and function. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3 : 69. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00069>
- WANG J., WU Y., YANG G. & AKSOY, S. (2009). Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.* **106**, 12133–12138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901226106>
- WEISS B.L., WANG J. & AKSOY S. (2011). Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *PLoS Biology*, 9(5) : e1000619. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000619>
- WEISS B.L., WANG J., MALTZ M.A., WU Y. & AKSOY S. (2013). Trypanosome infection establishment in the tsetse fly gut is influenced by microbiome-regulated host immune barriers. *PLoS Pathogens*, 9(4) : e1003318. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003318>
- WELBURN S.C. & MAUDLIN I. (1991). *Rickettsia*-like organisms, puparial temperature and susceptibility to trypanosome infection in *Glossina morsitans*. *Parasitology* **102**, 201. <https://doi.org/10.1017/S0031182000062491>
- WELBURN S.C. & MAUDLIN I. (1992). The nature of the teneral state in *Glossina* and its role in the acquisition of trypanosome infection in tsetse. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **86**, 529–536.
- WELBURN S.C. & MAUDLIN I. (1997). Control of *Trypanosoma brucei brucei* infections in tsetse, *Glossina morsitans*. *Medical and Veterinary Entomology*, 11(3) : 286–289.
- WELBURN S.C. & MAUDLIN I. (1999). Tsetse–Trypanosome Interactions: Rites of Passage. *Parasitology Today*, 15(10) : 399–403. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01512-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01512-4)
- WELBURN S.C. & MAUDLIN I. (2012). Priorities for the elimination of sleeping sickness. *Advances in Parasitology*, 79 : 299-337.

WELBURN S. C., MAUDLIN I. & ELLIS D.S. (1987). In vitro cultivation of rickettsia-like-organisms from *Glossina* spp. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 81(3) : 331-335.

WELBURN S.C., MAUDLIN I. & ELLIS D.S. (1989). Rate of trypanosome killing by lectins in midguts of different species and strains of *Glossina*. *Medical and Veterinary Entomology*, 3(1) : 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1989.tb00477.x>

WELBURN S.C., MAUDLIN I. & MILLIGAN P.J.M. (1995). Trypanozoon: Infectivity to Humans Is Linked to Reduced Transmissibility in Tsetse. *Experimental Parasitology* 81, 404–408. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1131>

WELBURN S.C., MAUDLIN I. & MOLYNEUX D.H. (1994). Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Medical and Veterinary Entomology*, 8(1): 81–87.

WELBURN S.C., MAUDLIN I. & SIMARRO P.P. (2009). Controlling sleeping sickness – a review. *Parasitology*, 136(14) : 1943–1949. <https://doi.org/10.1017/S00311-82009006416>

WIJERS D.J.B. (1958). Factors that may Influence the Infection Rate of *Glossina Palpalis* with *Trypanosoma Gambiense*: I.—The Age of the Fly at the Time of the Infected Feed. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 52, 385–390. <https://doi.org/10.1080/00034983.1958.11685878>

WOOLHOUSE M. E., MCNAMARA J. J., HARGROVE J. W. & BEALBY. K. A. (1996). Distribution and abundance of trypanosome (subgenus *Nannomonas*) infections of the tsetse fly *Glossina pallipides* in southern Africa. *Molecular Ecology*, 5(1) : 11-18.

X

XIAO-TONG W., JIAN-JIE S., XI-ZHE L., WEI L., JIAN-LONG X., DONG-AN L., YUN-ZENG Z. & LEI W. (2020). *Tepidiphilus olei* sp. nov., isolated from the production water of a water-flooded oil reservoir in PR China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(7) : 4364–4371.

Y

YAN J., CHENG Q., LI C.B., AKSOY S. (2001). Molecular characterization of two serine proteases expressed in gut tissue of the African trypanosome vector, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Molecular Biology* 10, 47–56.

YARZA P., YILMAZ P., PRUESSE E., GLÖCKNER F.O., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H., WHITMAN W.B., EUZÉBY J., AMANN R. & ROSSELLÓ-MÓRA R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9) : 635–645.

Z

ZAKRZEWSKI M., PROIETTI C., ELLIS J.J., HASAN S., BRION M-J., BERGER B. & KRAUSE L. (2016). Calypso: a user-friendly webserver for mining and visualizing microbiome–environment interactions. *Bioinformatics*, 33(5) : 782-783. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw725>

ZOUACHE K., RAHARIMALALA F.N., RAQUIN V., TRAN-VAN V., RAVELOSON L.H., RAVELONANDRO P. & MAVINGUI P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3) : 377–389.

ANNEXES

Annexe 1: Article publié tiré de la thèse

NGAMBIA FREITAS F. S., NJIOKOU F., TSAGMO NGOUNE J. M., SEMPERE G., BERTHIER D. & GEIGER A. (2021). Modulation of trypanosome establishment in *Glossina palpalis palpalis* by its microbiome in the Campo sleeping sickness focus, Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 90 : ISSN 1567-1348, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104763>.