

**Capacité vectorielle du type sauvage
et du mutant *salmon*
de *Glossina morsitans morsitans*
Westwood, 1850 (Diptera : Glossinidae)
dans la transmission
de *Trypanosoma brucei*
Plimmer et Bradford, 1899**

A. M. MAKUMYAVIRI ⁽¹⁾, W. DISTELMANS ⁽²⁾ ⁽³⁾,
Y. CLAES ⁽¹⁾, F. D'HAESELEER ⁽²⁾,
D. LE RAY ⁽¹⁾ et R. H. GOODING ⁽⁴⁾

Résumé

Les capacités vectorielles respectives du phénotype *salmon* et du phénotype sauvage de *Glossina morsitans morsitans* vis-à-vis de *Trypanosoma brucei brucei* ont été comparées. Les taux les plus élevés d'infestation intestinale (proventricule et intestin moyen) furent rencontrés chez les femelles *salmon* (74,6 %) et les mâles *salmon* (64,4 %). Par contre, le taux d'infestation des glandes salivaires parut être influencé principalement par le sexe de la glossine, les mâles présentant les taux d'infestation les plus élevés (33,9 % des mâles *salmon* et 16,7 % des mâles sauvages). Chez les mouches ayant une infestation intestinale, 52,6 à 60 % des mâles développèrent une infestation métacyclique alors que celle-ci ne fut observée que chez 14,9 à 17,9 % des femelles. Il apparaît donc que la colonisation de l'intestin est favorisée par l'allèle *salmon* tandis que l'acquisition de l'infestation salivaire est sous l'influence du sexe de la glossine.

Mots-clés : *Glossina morsitans morsitans* — *Trypanosoma brucei brucei* — Capacité vectorielle — Génétique.

Summary

VECTORIAL CAPACITY OF THE WILD AND *salmon* TYPES OF *Glossina morsitans morsitans* IN THE TRANSMISSION OF *Trypanosoma brucei brucei*. The ability of *salmon* and wild types of *Glossina morsitans morsitans* to transmit *Trypanosoma brucei brucei* was determined. The highest rates of midgut infection were found in the *salmon* females (74.6 %) and *salmon* males (64.4 %). However, the rate of salivary gland infection was strongly influenced by sex of the fly, males having the highest infection rates (33.9 % among *salmon* males).

(1) Laboratoire de Protozoologie, Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen, Belgique.

(2) Laboratorium voor Oekologie, Rijksuniversitair Centrum Antwerpen, Groenenborgerlaan 171, 2000 Antwerpen, Belgique.

(3) Adresse actuelle : Laboratory of Oncology, Department of Life Sciences, Janssen Pharmaceutica Research Laboratories, Turnhoutsebaan 30, 2340 Beerse, Belgique.

(4) Department of Entomology, University of Alberta, Edmonton, T6G 2E3, Canada.

and 16.7 % among wild type males). Among the flies having a midgut infection, 52.6 to 60.0 % of the males developed a metacyclic infection while only 14.9 to 17.9 % of the females did so. Thus colonization of midgut is favoured by the allele salmon and acquisition of salivary gland infection is influenced by sex.

Key words : *Glossina morsitans morsitans* — *Trypanosoma brucei brucei* — Vectorial capacity — Genetics.

Introduction

La capacité de la mouche tsétsé à transmettre les trypanosomes est sous l'influence de facteurs écologiques et physiologiques (revues de Lambrecht, 1980 ; Molyneux, 1980 ; Makumyaviri *et al.*, en préparation). Nombreux sont les aspects des relations vecteur-parasite qui restent obscurs. Les méthodes utilisables pour ce genre d'études comprennent notamment l'usage des marqueurs génétiques (Gooding, 1984). Dans ce travail nous avons examiné l'influence de l'allèle salmon de *Glossina morsitans morsitans* sur la capacité de cette espèce à transmettre *Trypanosoma brucei brucei*. Le mutant salmon fut choisi à cause de son métabolisme réduit du tryptophane (Davis et Gooding, 1983 ; Gooding et Rolseth, 1984), un acide aminé essentiel métabolisé par plusieurs espèces de trypanosomes, dont *T. brucei* (Hall *et al.*, 1981).

Matériel et méthodes

GLOSSINES

La souche de *G. m. morsitans* utilisée dans ce travail est originaire de Kariba, Zimbabwe. Elle a été colonisée au Langford Laboratory, Bristol (Jordan *et al.*, 1977) et secondairement à Edmonton, où fut identifié et isolé le mutant salmon (Gooding, 1979). Pupes et imagos furent maintenues en cages Geigy ou en cages PVC (Van der Vloedt, 1981) à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ et $65 \pm 5\%$ h.r. avec une alternance lumière-obscurité de 12 h. A l'éclosion, les mouches ténères furent récoltées quotidiennement et prirent un repas infestant dans les 32 h suivantes.

Les pupes ($n = 422$) résultaient de l'accouplement de femelles hétérozygotes (+/sal) avec des mâles hémizygotés (sal/Y). Elles furent transportées par avion et train par l'un de nous (R. H. G.) et arrivèrent à Anvers âgées de 16 à 31 jours. Les adultes émergeant de ces pupes présentèrent les phénotypes suivants : femelles hétérozygotes à œil de type sauvage (+/sal), femelles à œil saumon (sal/sal), mâles à œil de type sauvage (+/Y) et mâles à œil saumon (sal/Y).

TRYPANOSOMES

Le stock de *T. b. brucei* MAVUBWE/66/EATRO/1125 a été isolé en Uganda en 1966 à partir d'un guib harnaché *Tragelaphus scriptus* (Pallas). Ce stock s'est montré non-infectant pour l'homme. Il exprime le répertoire d'antigènes variables AnTAR 1 caractérisé par diverses études sérologiques et géniques (Le Ray, 1975 ; Van Meirvenne *et al.*, 1975 ; Barry *et al.*, 1979 ; Pays *et al.*, 1981).

Dans ce travail, une population clonée, transmise cycliquement et ayant subi trois sub-inoculations à la seringue avant d'être conservée à -196°C , a servi à initier l'infection de souris NMRI femelles (KUL, Leuven) âgées de six à dix semaines. Les souris ont reçu par voie intrapéritonéale 5×10^7 trypanosomes. Afin d'inhiber la réponse immune, 100 mg/kg de cyclophosphamide (Endoxan[®], Cilag, Herentals) ont été administrés tous les quatre jours. L'évolution de la parasitémie a été contrôlée quotidiennement au microscope à contraste de phase par examen de sang frais et quantification de la parasitémie selon la technique de la « matching method » proposée par Herbert et Lumsden (1976). Les sub-inoculations ultérieures ont été effectuées comme décrit ci-dessus.

REPAS INFESTANT

Les repas infestants ont eu lieu du cinquième au huitième passage mécanique des trypanosomes, entre le jour 3 et le jour 7 de l'infection, alors que les souris présentaient un plateau parasitémique pléomorphe de l'ordre de 2×10^8 trypanosomes par ml de sang. Des mouches ténères âgées de 8 à 32 h et encagées par groupes de 10 à 20 individus furent placées pendant 30 mn à l'obscurité sur des souris parasitées. Celles-ci avaient été préalablement anesthésiées par inoculation intrapéritonéale d'une association de kétamine (25 mg/kg, Imalgène[®], Iffa-Mérieux) et de xylazine (2 mg/kg, Rompun[®], Bayer).

MAINTENANCE

Après le repas infestant, les mouches gorgées

furent séparées par sexes, regroupées en cages de dix individus de même sexe et laissées à jeûn pendant 48 h. Du jour 3 au jour 23, les mouches furent nourries quotidiennement sur oreille de lapin Full Lop (Ranch Rabbits, Crawley Down, UK). Les lapins reçurent *ad libitum* eau et granulés sans coccidiostatiques. Ces lapins, aux environs du jour 19, manifestèrent de la fièvre et développèrent une tuméfaction (chancre) des oreilles. L'examen du sang pratiqué quotidiennement démontra une parasitémie patente à partir du jour 23.

INFESTATIONS PROCYCLIQUE ET MÉTACYCLIQUE

Les performances vectorielles furent évaluées en distinguant d'une part la colonisation du tube digestif au niveau de l'intestin moyen et du proventricule par des trypanosomes (infestation procyclique) et d'autre part la présence de ces flagellés dans les glandes salivaires (infestation mature ou métacyclique).

Par mesure de sécurité, avant tout transfert, les mouches furent anesthésiées sous atmosphère d'azote pendant 135 à 150 s. Au jour 23, les mouches furent transférées en tubes individuels (conteneur universel 30 ml, Sterilin), identifiées selon le sexe et le phénotype, et laissées à jeûn pendant deux jours. Au jour 25, les mouches furent disséquées par la méthode rapide de Penchenier et Itard (1981) en sérum de veau foetal (Boehringer) dans la cupule d'une lame à cavité (VEL, Leuven). Le tube digestif et les glandes salivaires furent séparés et examinés au microscope à contraste de phase (oc. 10x, obj. 16, 25 et 40x).

Les glandes salivaires positives furent conservées sur glace en sérum de veau foetal dans un tube de broyeur (Duall 20, Kontes Glass Co.). A la fin de la séance de dissection, les glandes furent homogénéisées à l'aide d'un piston en téflon. Les trypanosomes métacycliques furent comptés à la cellule de Burker. La suspension fut ensuite congelée à -196°C en présence de diméthylsulfoxyde (Le Ray, 1975).

Avant dissection, 25 mouches, dont 5 du phénotype sauvage et 20 du phénotype *salmon* furent soumises à l'épreuve de salivation provoquée sur lame (Burt, 1946).

Les trypanosomes métacycliques fournis par le phénotype sauvage (+/sal et +/Y) et par le phénotype *salmon* (sal/sal et sal/Y) firent l'objet d'une épreuve comparative de titration d'infectivité selon la méthode de Lumsden *et al.* (1973).

ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été pratiquée par calcul du G-stat, avec correction de Williams, à partir d'un tableau de contingence 2×2 (Sokal et Rohlf, 1981).

Résultats

Les performances physiologiques et vectorielles des mouches à œil saumon (sal/sal et sal/Y) ont été comparées à celles du phénotype sauvage (+/sal et +/Y).

PERFORMANCES PHYSIOLOGIQUES

Des 422 pupes mises en expérience, 414 (98 %) ont éclos. Un total de 323 glossines (78 %, 145 femelles et 178 mâles) se gorgèrent entre 8 et 32 h suivant l'émergence. Au cours des 25 jours de l'expérience, 13 mouches (4 %) moururent, soit sept femelles (4,8 %) et six mâles (3,4 %). La mortalité respective des mâles et des femelles ne fut pas significativement différente ($G = 0,387$; 1 d.d.l. ; $p > 0,05$).

INFLUENCE DU PHÉNOTYPE *salmon*

L'infestation procyclique fut significativement plus fréquente chez les femelles *salmon* (sal/sal) que chez les femelles hétérozygotes (+/sal) (tabl. I et II). Cependant ces différences ne se traduisirent pas par un taux plus élevé d'infestation métacyclique (tabl. I et II).

TABLEAU I

Infestation de *Glossina morsitans morsitans* par *Trypanosoma brucei brucei* (F = femelle, M = mâle; Œil (pigmentation) : sau = saumon, ts = type sauvage (brun foncé); P = mouches avec trypanosomes procycliques dans le tube digestif; M = mouches avec trypanosomes métacycliques dans les glandes salivaires; R = rapport M/P).

Sexe	Œil	Génotype	No.		R	
			Exam.	No. Infestées		
F	sau	sal/sal	63	47 (74,6)	7 (11,1)	0,149
F	ts	+/sal	67	28 (41,8)	5 (7,5)	0,179
M	sau	sal/Y	59	38 (64,4)	20 (33,9)	0,526
M	ts	+/Y	108	30 (27,8)	18 (16,7)	0,600

TABLEAU II

Comparaison statistique des infestations de *Glossina morsitans morsitans* par *Trypanosoma brucei brucei* (les chiffres sont des G-stats (avec correction de Williams, Sokal et Rohlf, 1981); les nombres au-dessus de la diagonale des zéros se rapportent aux infections métacycliques, ceux au-dessous se rapportent aux infections procycliques; les valeurs significatives pour 1 d.d.l. sont : 2,706, $p = 0,10$; 3,841, $p = 0,05$; 5,024, $p = 0,025$; 6,635, $p = 0,01$; 7,879, $p = 0,005$; 10,828, $p = 0,001$, Rohlf et Sokal, 1981)

	sal/sal	+sal	sal/Y	+Y
sal/sal	0,000	0,496	9,271	0,996
+sal	14,490	0,000	14,115	3,215
sal/Y	1,479	6,420	0,000	6,141
+Y	35,992	3,587	21,055	0,000

D'autre part, un nombre significativement plus élevé de mâles *salmon* (sal/Y) que de mâles sauvages (+/Y) permet le développement d'infestations tant procyclique que métacyclique (tabl. I et II). Six mâles *salmon*, dont les glandes salivaires se montrèrent positives à la dissection, furent soumis à l'épreuve de salivation provoquée. Trois d'entre eux salivèrent, chacun émettant de nombreux trypanosomes métacycliques. Neuf glossines de phénotype sauvage et neuf glossines de phénotype *salmon* hébergeant une infestation mature furent disséquées, leurs glandes salivaires furent homogénéisées et les trypanosomes métacycliques furent dénombrés. Les mouches *salmon* hébergeaient une population métacyclique de densité ($2,4 \times 10^6$ métacycliques par glande) comparable à celle ($1,3 \times 10^6$ métacycliques par glande) trouvée chez les mouches sauvages. Les trypanosomes métacycliques provenant des glossines sauvages et *salmon* firent l'objet d'une titration comparée de leur infectivité. La dose infectieuse minimale pour la souris fut la même pour les deux phénotypes ($ID_{63} = 10^{2,3 \pm 0,3}$ trypanosomes métacycliques).

INFLUENCE DU SEXE

A une exception près, mâles et femelles de la même couleur d'œil ne différencèrent ni par la prévalence de l'infestation procyclique ni par celle de l'infestation métacyclique (tabl. I et II). L'exception fut celle des mâles *salmon* (sal/Y) chez qui fut observé un taux d'infestation métacyclique significativement plus élevé que chez les femelles *salmon* (sal/sal) (tabl. II).

LA BARRIÈRE DU TUBE DIGESTIF

Le rapport R du nombre de mouches ayant une infestation métacyclique à celui des mouches hébergeant une population procyclique ($M/P = R$, tabl. I) peut être considéré comme une mesure de la probabilité de voir les trypanosomes du tube digestif poursuivre leur évolution jusqu'aux glandes salivaires. La valeur R (tabl. I) est donc inversement proportionnelle à l'efficacité de la barrière intestinale.

Les valeurs de R se répartissent en deux groupes. Chez les femelles cette valeur est inférieure à 0,2 alors que chez les mâles R est supérieur à 0,5. Il semble donc que l'efficacité de la barrière intestinale soit liée au sexe de la tsétsé ($G = 12,5375$; 1 d.d.l.; $p < 0,001$). L'allèle *salmon* semble augmenter soit la réceptivité du tube digestif aux formes procycliques soit l'efficacité de la barrière intestinale, mais cet effet n'est pas statistiquement significatif.

Discussion

L'expression de l'allèle *salmon* augmente significativement la probabilité de voir s'établir les trypanosomes au niveau du tube digestif des tsétsés tant mâles que femelles, ceci toutefois sans que soit modifiée la probabilité de voir l'évolution des trypanosomes se poursuivre jusqu'au stade métacyclique (tabl. I et II). L'évolution ultérieure des trypanosomes procycliques vers l'infection mature paraît être influencée principalement par le sexe de la mouche. Il s'ensuit une capacité vectorielle plus élevée de la part des glossines mâles que des mouches femelles, comme nous l'avons signalé précédemment (Makumyaviri *et al.*, en préparation). De plus le taux d'infestation des mouches sauvages d'Edmonton fut comparable à celui des mouches sauvages de Bristol (Makumyaviri *et al.*, en préparation). D'autre part, la fonction vectorielle du mutant *salmon* apparaît au moins comparable à celle du phénotype sauvage du point de vue de la salivation de trypanosomes métacycliques, de leur densité dans les glandes salivaires et de leur infectivité pour le mammifère. Ces résultats ne militent pas en faveur de l'utilisation de la mouche *salmon* comme agent de contrôle génétique (Gooding, 1982).

La probabilité accrue, chez les *G. m. morsitans* mâles qu'une infection à *T. b. brucei* évolue jusqu'au stade métacyclique peut être due soit aux différences physiologiques et biochimiques liées au sexe, soit à des loci spécifiques portés par le chro-

mosome X. Dans ce dernier cas, dans l'hypothèse d'un seul locus du chromosome X on peut envisager que le caractère de résistance ou le caractère de sensibilité soient produits par un allèle soit dominant soit récessif. Nos résultats ne sont compatibles avec aucune de ces possibilités. Un modèle plus complexe pourrait être envisagé pour rendre compte des données actuelles, mais nous ne disposons pas pour l'instant de résultats de croisement permettant de tester ce modèle.

L'allèle *salmon* provoque une diminution du métabolisme du tryptophane, avec pour conséquence une réduction de l'ommochrome présent dans les yeux composés (Davis et Gooding, 1983; Gooding et Rolseth, 1984) ainsi qu'une excrétion fécale importante de tryptophane par les mouches à œil saumon (Gooding et Rolseth, 1984). Le tryptophane est un acide aminé essentiel qui est métabolisé intensivement par plusieurs espèces de trypanosomes, dont *T. brucei* (Hall *et al.*, 1981). Le taux élevé de tryptophane dans le tube digestif des mouches à œil saumon pourrait favoriser l'établissement des trypanosomes dans l'intestin de ces glossines. Le fait que la sensibilité à *T. congolense* (un trypanosome dont le cycle intéresse aussi le

tube digestif de la tsétsé) est maximale chez les mouches à œil saumon (Distelmans *et al.*, en préparation) vient à l'appui de cette hypothèse.

Bien qu'une influence maternelle ait été démontrée sur l'infestation de *G. m. morsitans* par des formes procycliques de *T. congolense* ingérées lors de repas sur membrane (Maudlin, 1982), nos résultats démontrent que le patrimoine génétique de la mouche tsétsé peut influencer sa sensibilité à l'infestation par *T. brucei*. La sensibilité de la glossine à l'infestation intestinale et le développement de l'infestation mature paraissent être contrôlés par des facteurs distincts.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de Simone De Doncker, Diane Jacquet et Michèle Delronche, que nous remercions vivement. Le voyage de R. H. G. a été rendu possible grâce à l'aide de l'Endowment Fund for the Future de l'Université d'Alberta. Ce travail a reçu le soutien financier du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (subvention A-3900 à R. H. G.), du Programme Spécial de Recherche et de Formation en Maladies Tropicales du PNUD/Banque Mondiale/OMS, de l'OTAN (contrat 024.81) et de l'IAEA (contrats 2476 et 2858/CF) pour D.L.R.

BIBLIOGRAPHIE

- BARRY (J. D.), HAJDUK (S.), VICKERMAN (K.) et LE RAY (D.), 1979. — Detection of multiple variable antigen types in metacyclic populations of *Trypanosoma brucei*. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 73 : 205-208.
- BURTT (E.), 1946. — Salivation by *Glossina morsitans* on to glass slides : a technique for isolating infected flies. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 40 : 141-144.
- DAVIS (J. C.) et GOODING (R. H.), 1983. — Spectral sensitivity and flicker fusion frequencies of the compound eye of salmon and wild-type tsetse flies, *Glossina morsitans*. *Physiol. Ent.*, 8 : 15-23.
- GOODING (R. H.), 1979. — Genetics of *Glossina morsitans morsitans* (Diptera : Glossinidae) : III. Salmon, a sex-linked, maternally influenced, semi-lethal eye color mutant. *Canad. Ent.*, 111 : 557-560.
- GOODING (R. H.), 1982. — Laboratory evaluation of the lethal allele *salmon* for genetic control of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* : 267-278, in : Sterile insect technique and radiation in insect control. IAEA, Vienna, STI/PUB/595.
- GOODING (R. H.), 1984. — Tsetse Genetics : A Review. *Quaest. Ent.*, 20 : 89-128.
- GOODING (R. H.) et ROLSETH (B. M.), 1984. — Genetics of *Glossina morsitans morsitans* (Diptera : Glossinidae). VIII. Tryptophan oxygenase deficiency, the lesion causing salmon colored eyes. *Can. J. Gen. Cytol.*, 26 : 62-66.
- HALL (J. E.), DAHM (K. H.) et SEED (J. R.), 1981. — *In vitro* tryptophan catabolism by *Trypanosoma (Trypano-*
- zoon) brucei gambiense*, *T. (T.) equiperdum*, *T. (Herpetosoma) lewisi* and *T. (H.) musculi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B : 617-620.
- HERBERT (W. J.) et LUMSDEN (W. H. R.), 1976. — *Trypanosoma brucei* : a rapid « matching » method for estimating the host's parasitemia. *Exp. Parasitol.*, 40 : 427-431.
- JORDAN (A. M.), TREWERN (M. A.), SOUTHERN (D. I.), PELL (P. E.) et DAVIES (E. D. G.), 1977. — Differences in laboratory performances between strains of *Glossina morsitans morsitans* Westwood from Rhodesia and Tanzania and associated chromosome diversity. *Bull. ent. Res.*, 67 : 35-48.
- LAMBRECHT (F. L.), 1980. — Ecological and physiological factors in the cyclic transmission of African trypanosomiasis. *Insect Sci. Applic.*, 1 : 47-54.
- LE RAY (D.), 1975. — Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei* (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoelectrophorétique et étude comparative. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 55 : 129-311.
- LUMSDEN (W. H. R.), HERBERT (W. J.) et McNEILLAGE (G. J. C.), 1973. — Techniques with trypanosomes. Churchill Livingstone, Edinburgh et London : 103-109.
- MAUDLIN (I.), 1982. — Inheritance of susceptibility to *Trypanosoma congolense* infection in *Glossina morsitans*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 76 : 225-227.
- MOLYNEUX (D. H.), 1980. — Patterns of development of trypanosomes and related parasites in insect hosts : 179-189, in : Isotope and radiation research on animal

- diseases and their vectors. IAEA, Vienna, STI/PUB/525.
- PAYS (E.), VAN MEIRVENNE (N.), LE RAY (D.) et STEINERT (M.), 1981. — Gene duplication and transposition linked to antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 78 : 2673-2677.
- PENCHENIER (L.) et ITARD (J.), 1981. — Une nouvelle technique de dissection rapide des glandes salivaires et de l'intestin des glossines. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 19, 1 : 55-57.
- ROHLF (F. J.) et SOKAL (R. R.), 1981. — Statistical Tables. W. H. Freeman and Company, San Francisco, U.S.A.
- SOKAL (R. R.) et ROHLF (F. J.), 1981. — Biometry (Second Edition). W. H. Freeman and Company, San Francisco U.S.A.
- VAN DER VLOEDT (A. M. V.), 1981. — Recent advances in tsetse mass rearing with particular reference to *Glossina palpalis palpalis* (Rob.-Desv.) fed *in vivo* on guinea pigs : 223-253, in : Sterile insect technique and radiation in insect control. IAEA, Vienna.
- VAN MEIRVENNE (N.), JANSSENS (P. G.) et MAGNUS (E.), 1975. — Antigenic variation in syringe passaged populations of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei*. 1. Rationalization of the experimental approach. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 55 : 1-23.