

N° ORDRE de la thèse : 3887

THESE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

Mention : Biologie

par

Claire BECKER, née DELAUNAY

Equipe d'accueil : UMR INRA ENVN Bio-agression, Epidémiologie, Analyse de Risque,
Equipe Interactions Tique-Parasite-Hôte

Ecole Doctorale : Vie Agro Santé

Composante universitaire : Sciences de la vie et de l'environnement

Etude des stades de transmission de *Babesia divergens*

Soutenue le 28 avril 2009 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

Joseph SCHREVEL	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris	Rapporteur
Bernard CARCY	Faculté de Pharmacie, Montpellier	Rapporteur
Daniel BOUJARD	Université de Rennes 1	Président du jury
Jean-Pierre GANGNEUX	Faculté de Médecine, Rennes	Examineur
Jacques GUILLOT	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Examineur
Alain CHAUVIN	Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes	Directeur de thèse

Remerciements

A Messieurs B. Carcy et J. Schrével, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon travail.

A Messieurs D. Boujard, J.-P. Gangneux et J. Guillot pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A M. A. Chauvin pour avoir dirigé cette thèse.

A Mesdames S. Bonnet et L. Malandrin pour leur encadrement scientifique et technique durant cette thèse.

A M. E. Bischoff pour son travail, sa formation et son aide en bioinformatique.

A Mme S. Bosch pour son apprentissage du clonage.

A Mlle D. Depoix pour son travail sur les gamétocytes de *P. berghei*.

A Mlle E. Moreau pour sa formation sur toutes les techniques immunochimiques du laboratoire.

A M. T. Larcher pour les marquages immunohistochimiques sur les tiques.

A M. O. Gauthier pour les opérations chirurgicales réalisées sur les veaux.

A M. F. Beaudou pour son soutien et ses conseils.

A Mesdames M. Jouglin, A. Bouju, F. Armand, B. Oberhauser, N. Brisseau, A. Hermouet et Messieurs P. Roy et J-M. Allard pour leur aide technique.

A Mme S. Martin pour sa précieuse aide administrative.

A l'INRA et à la Région Pays de Loire pour avoir financé ma thèse.

A ma mère pour son temps et son aide au quotidien.

A mon père : Ca y est, Papa, j'ai fini mes études !

A mes frères, mes belles-sœurs et mes beaux-parents pour leur soutien.

A Florian, pour son soutien constant, sa patience et son amour.

A Judith, ma joie de vivre.

Sommaire

Remerciements.....	1
Sommaire.....	2
Liste des Figures.....	3
Liste des Tableaux.....	5
Liste des Annexes.....	6
Liste des Abréviations.....	7
Introduction.....	9
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	11
I. <i>Babesia divergens</i> , parasite des bovins, transmis par les tiques.....	11
II. Le sporozoïte : stade de transmission du vecteur au vertébré.....	25
III. Les stades sexués : stades de transmission du vertébré au vecteur.....	32
Objectifs de la thèse.....	59
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	61
I. Matériel biologique.....	61
II. Entretien du matériel biologique.....	64
III. Infections de l'hôte vertébré et du vecteur par <i>B. divergens</i>	68
IV. Production expérimentale et recherche des sporozoïtes de <i>B. divergens</i>	70
V. Essais d'induction de la différenciation sexuée <i>in vitro</i>	76
VI. Identification de gènes spécifiques de gamétocytes.....	77
VII. Validation de la protéine BdCCp2 comme marqueur des gamétocytes de <i>B. divergens</i>	83
Chapitre 3 : Etude des sporozoïtes de <i>B. divergens</i>	89
I. Production et collecte de tiques infectées.....	89
II. Capacité infectante d' <i>I. ricinus</i> après acquisition et transmission trans-stadiale de <i>B. divergens</i>	92
III. Capacité infectante d' <i>I. ricinus</i> après acquisition, transmission trans-ovarienne et trans-stadiale de <i>B. divergens</i>	94
IV. Analyse de tiques issues de populations infectées naturellement.....	99
V. Discussion.....	103
Chapitre 4 : Identification des stades sexués de <i>B. divergens</i>	113
I. Essais d'induction de la différenciation sexuée <i>in vitro</i>	113
II. Identification de trois nouveaux gènes de <i>B. divergens</i>	114
III. Marqueurs des stades sexués de <i>B. divergens</i>	125
IV. Discussion.....	136
Conclusion et perspectives.....	141
Annexes.....	145
Références bibliographiques.....	199
Table des matières.....	209

Liste des Figures

Figure 1 : Cycle de développement de <i>B. divergens</i> chez ses hôtes, vertébré et arthropode ...	12
Figure 2 : Cycle biologique d' <i>I. ricinus</i>	14
Figure 3 : Ultrastructure d'un sporozoïte de <i>Babesia</i> sp. observé au microscope électronique (grossissement : x 33 750)	28
Figure 4 : Les gamétocytes de <i>P. falciparum</i>	34
Figure 5 : Gamétocytes de <i>B. divergens</i> dans du sang de gerbille parasitée	39
Figure 6 : Gamètes de <i>B. microti</i> dans le tube digestif d' <i>I. dammini</i>	42
Figure 7 : Intensité moyenne de fluorescence représentant la quantité d'ADN des stades de développement de <i>B. divergens</i> dans la nymphe d' <i>I. ricinus</i>	44
Figure 8 : Stades d'expression des protéines de <i>P. falciparum</i> spécifiques des stades sexués et de ceux présents chez le vecteur	48
Figure 9 : Représentation graphique de l'organisation des domaines protéiques de la famille CCp pour <i>P. falciparum</i> et <i>C. parvum</i>	49
Figure 10 : Structure tridimensionnelle du domaine LCCL.....	50
Figure 11 : Représentation schématique du système de gorgement artificiel de tiques sur membrane.....	66
Figure 12 : Expériences d'infection d' <i>I. ricinus</i> par <i>B. divergens</i> et tests de retransmission après transmission trans-stadiale	70
Figure 13 : Expériences d'infection d'adultes d' <i>I. ricinus</i> par <i>B. divergens</i> et tests de retransmission après transmission trans-ovarienne et trans-stadiale.....	71
Figure 14 : Système d'Ozaki pour la purification des sporozoïtes de <i>Plasmodium spp.</i>	74
Figure 15 : Suivi des récoltes de tiques <i>I. ricinus</i> gorgées et de l'infection des veaux n°3243 et 6805 par <i>B. divergens</i> (isolats 135 et C139 respectivement).....	90
Figure 16 : Poids des tiques <i>I. ricinus</i> partiellement gorgées sur le veau n°8818, en fonction de la date de gorgement.....	94
Figure 17 : Sporozoïtes de <i>Babesia</i> sp. EU1 mis en évidence dans les glandes salivaires d' <i>I. ricinus</i> adultes	101
Figure 18 : <i>Babesia</i> sp. EU1 intra-érythrocytaires obtenus par mise en culture des sporozoïtes contenus dans l'extrait de glandes salivaires d' <i>I. ricinus</i>	101
Figure 19 : Alignement d'une zone conservée de CCp3 entre différentes espèces de <i>Plasmodium</i> et <i>Babesia</i>	117
Figure 20 : Alignement des séquences nucléotidiques du gène <i>ccp3</i> chez <i>P. falciparum</i> (<i>Pf</i>), <i>B. bigemina</i> (<i>Bbi</i>) et <i>B. bovis</i> (<i>Bbo</i>) dans une zone très conservée et séquences des amorces dégénérées définies dans cette zone	118
Figure 21 : Amplification par PCR et amorces dégénérées (<i>Bbi/Bbo</i>) de fragments des gènes <i>ccp1, 2 & 3</i> de <i>B. divergens</i>	119
Figure 22 : Schéma représentant les différentes méthodes et la position des amorces utilisées pour obtenir la séquence des gènes <i>bdccp1, 2 & 3</i>	121
Figure 23 : Amplification partielle des transcrits des gènes <i>bdccp1, 2 & 3</i> par RT-PCR.....	122
Figure 24 : Structure introns-exons des gènes <i>bdccp1, 2 & 3</i>	123
Figure 25 : Représentation graphique à l'échelle des différents domaines protéiques présents dans BdCCp1, BdCCp2 et BdCCp3.....	124
Figure 26 : Détection par Western Blot (sérum anti-rpBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des globules rouges parasités (1, 2 et 3) et des mérozoïtes isolés (4, 5 et 6) de <i>B. divergens</i>	126
Figure 27 : Détection par Western Blot (sérum anti-rpBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des globules rouges de différentes origines, parasités par l'isolat 135 de <i>B. divergens</i> . 127	

Figure 28 : Détection par Western Blot (sérum anti-spBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des cultures de <i>B. divergens</i> ayant subi des conditions potentiellement inductrices de la différenciation sexuée.....	128
Figure 29 : Détection de CCp2 dans les gamétocytes de <i>P. berghei</i> , avec le sérum anti-rpBdCCp2	129
Figure 30 : Détection de CCp2 dans les gamétocytes de <i>P. berghei</i> , avec le sérum anti-spBdCCp2	129
Figure 31 : Détection par Western Blot (sérum anti-spBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des tubes digestifs d' <i>I. ricinus</i> partiellement gorgées sur bovins (élevage de La Verrie).....	131
Figure 32 : Détection par Western Blot (sérum anti-spBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des tubes digestifs d' <i>I. ricinus</i> partiellement gorgées <i>in vitro</i>	133
Figure 33 : Coupes longitudinales d'une tique <i>I. ricinus</i> infectée <i>in vitro</i> par la souche Bob2A de <i>B. divergens</i> , marquée en immunohistochimie par le sérum anti-rpBdCCp2.....	134

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Prévalences de <i>Babesia</i> spp. dans les tiques <i>I. ricinus</i> en Europe.....	23
Tableau 2 : Caractéristiques des sporozoïtes de différentes espèces de <i>Babesia s.l.</i>	27
Tableau 3 : Capacités des deux tailles de gorgeurs utilisés.....	67
Tableau 4 : Animaux utilisés et nombre de tiques pouvant être gorgées sur chaque animal ...	67
Tableau 5 : Durée du gorgement et taux de réplétion et de transformation des différents stades de tiques, en fonction du mode de gorgement	68
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la détection de <i>B. divergens</i> dans les tiques par amplification PCR	75
Tableau 7 : Protocole d'immunisation du lapin n°300 avec rpBdCCp2.....	84
Tableau 8 : Echantillons de <i>B. divergens</i> analysés par Western Blot pour rechercher la présence de la protéine BdCCp2	86
Tableau 9 : Infection de larves d' <i>I. ricinus</i> sur gorgeur et sur gerbilles et retransmission par les nymphes <i>in vitro</i>	92
Tableau 10 : Infection de larves d' <i>I. ricinus</i> sur gerbilles et retransmission par les nymphes <i>in vivo</i>	93
Tableau 11 : Essais d'infection de gerbilles splénectomisées par des larves d' <i>I. ricinus</i> , issues d'adultes infectées expérimentalement.....	96
Tableau 12 : Retransmission par des nymphes d' <i>I. ricinus</i> sur le veau n°8818.....	97
Tableau 13 : Analyse des glandes salivaires de nymphes d' <i>I. ricinus</i> (lot 2) partiellement gorgées sur le veau n°8840	98
Tableau 14 : Analyse par PCR nichée d' <i>I. ricinus</i> infectées (lot 2) : nombre de positives/nombre analysées.....	99
Tableau 15 : Protéines de la famille CCp : pourcentages d'identité et de similitude entre les protéines de <i>P. falciparum</i> et les orthologues d'autres Apicomplexes.....	114
Tableau 16 : Caractéristiques des protéines CCp1, 2 & 3 chez <i>B. divergens</i>	124
Tableau 17 : Données concernant les tiques prélevées sur les bovins de l'élevage de La Verrie, dont le contenu digestif a été analysé par Western Blot et les sérums des bovins correspondants.....	132

Liste des Annexes

1) Article 1 : Transstadial and transovarial persistence of <i>Babesia divergens</i> DNA in <i>Ixodes ricinus</i> ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique	145
2) Splénectomie de gerbilles.....	157
3) Traitement des peaux d'animaux pour gorgement sur membrane.....	158
4) Extraction d'ADN.....	159
5) Liste des amorces définies pour la caractérisation des gènes <i>ccp</i> chez <i>B. divergens</i> , classées par gènes et par méthodes d'utilisation	160
6) Extraction d'ARN total avec le TRIzol®.....	163
7) Peptide recombinant rpBdCCp2	164
8) Technique d'immunofluorescence sur lame.....	165
9) Production de gamétocytes de <i>P. berghei</i> chez la souris	166
10) IFI sur les gamétocytes de <i>P. berghei</i>	167
11) Electrophorèse SDS-PAGE	168
12) Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose	170
13) Immunorévélation	171
14) Immunohistochimie.....	173
15) Article 2 : Natural transmission of zoonotic <i>Babesia</i> spp. by <i>Ixodes ricinus</i> ticks	174
16) Matériel photographique complémentaire sur les sporozoïtes de <i>Babesia</i> sp. EU1 détectés dans des tiques récoltées sur des chevreuils de la réserve de Chizé.....	178
17) Alignements des séquences protéiques de CCp1, 2 & 3.....	179
18) Zones ciblées des alignements des séquences protéiques et nucléotidiques de <i>ccp1</i> , 2 & 3 chez <i>P. yoelii</i> , <i>P. berghei</i> , <i>P. chabaudi</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>B. bovis</i> et <i>B. bigemina</i> ayant servi à définir des amorces dégénérées.....	188
19) Séquences des gènes <i>bdccp1</i> , 2 & 3.....	194

Liste des Abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN: acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ADNr : acide ribonucléique ribosomique

Babesia spp. *s.l.* : espèces de *Babesia* au sens large (incluant *B. microti*)

Babesia spp. *s.s.* : espèces de *Babesia* au sens strict (excluant *B. microti*)

CCp : Coagulation factor C protein

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

GFP : Green Fluorescent Protein

GR : globules rouges

GRP : globules rouges parasités

GS : glandes salivaires

H₂OΔ : eau distillée

IFI : immunofluorescence indirecte

kb : kilobases

LAP : Lectin Adhesive_like protein

LB : Luria-Bertani

LCCL : *Limulus* clotting factor C, Cochlear protein Coch-5b2 et late gestation lung protein

Lg11

MGG : May-Grunwald-Giemsa

Mutants KO : mutants Knock-out

nr: non réalisé

Pbs : *Plasmodium berghei* sexual stages

PBS: phosphate buffered saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pfg : *Plasmodium falciparum* gametocyte

Pfpeg : *Plasmodium falciparum* protein of early gametocyte

Pfs : *Plasmodium falciparum* sexual stages

ppi : pour préparation injectable

RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends

qsp : quantité suffisante pour

rpBdCCp2 : peptide recombinant de BdCCp2 produit en *E. coli*

RPMI medium : Roswell Park Memorial Institute medium

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

s.l. : *sensu lato*

s.s. : *sensu stricto*

spBdCCp2 : peptide de synthèse de BdCCp2

SVF : sérum de veau fœtal

TBE : Tris, Borate, EDTA

Tm : melting temperature, température d'hybridation

Introduction

Babesia divergens appartient au phylum des *Apicomplexa*, qui comprend environ 4600 espèces, réparties dans le monde entier et ayant pour caractéristique commune un cycle de vie parasitaire obligatoire (Smith *et al.*, 2002). Au sein des Apicomplexes, certains genres ont une importance médicale majeure, tels que *Plasmodium*, *Toxoplasma* et *Cryptosporidium*. D'autres sont importants pour la santé animale, tels que *Babesia*, *Theileria* et *Eimeria*. Certaines espèces de *Babesia* sont de plus zoonotiques, notamment *B. microti*, *B. divergens*, *B. duncani* et *B. sp. EU1* (Hunfeld *et al.*, 2008). Les cycles biologiques des Apicomplexes sont extrêmement variés quant à leur durée, aux hôtes impliqués et aux modes de transmission mis en jeu par le parasite. Une classe d'Apicomplexes, les *Coccidiae*, présente un cycle homoxène, impliquant un seul hôte et une dispersion par l'environnement. Par contre, d'autres espèces comme celles appartenant au genre *Toxoplasma*, présentent un cycle hétéroxène complexe et la transmission du parasite peut s'effectuer naturellement de l'hôte définitif à l'hôte intermédiaire, mais aussi directement d'hôte intermédiaire à hôte intermédiaire. Les Apicomplexes qui ont une phase de multiplication dans les hématies de leur hôte, les Hématozoaires, présentent un cycle hétéroxène et sont obligatoirement transmis par un vecteur, un arthropode hématophage. Pour les espèces du genre *Plasmodium*, il s'agit des moustiques du genre *Anopheles*, tandis que la transmission des *Babesia* spp. et *Theileria* spp. est assurée par des tiques de la famille des Ixodidés.

Quel que soit le cycle biologique de l'Apicomplexe concerné, il est caractérisé par une alternance entre une ou plusieurs phases de développement asexué et une étape de reproduction sexuée. Chez les Apicomplexes vectorisés, la phase diploïde est limitée à l'étape brève de reproduction sexuée qui a lieu chez le vecteur, ce dernier étant donc l'hôte définitif. La stratégie utilisée par ces parasites, pour assurer leur transmission, est de produire dans le sang de l'hôte vertébré (donc avant ingestion par le vecteur) des stades sexués, appelés gamétocytes, seules formes susceptibles de continuer à évoluer chez le vecteur. Les gamétocytes représentent ainsi la forme parasitaire de transmission de l'hôte vertébré vers le vecteur. La forme de transmission, qui assure le passage du vecteur vers l'hôte vertébré, est le sporozoïte. Il est présent dans les glandes salivaires du vecteur au moment où celui-ci effectue son repas sanguin. Le sporozoïte est issu d'une phase de multiplication parasitaire asexuée dans le vecteur, phase qui fait suite à l'étape de reproduction sexuée. La transmission parasitaire a alors lieu lors de la piqûre par le vecteur, via l'injection de salive.

L'acquisition de connaissances sur ces formes de transmission, gamétoocyte et sporozoïte, revêt tout d'abord un aspect fondamental, pour avoir une meilleure connaissance du cycle parasitaire, de ses étapes et de ses particularités. De la caractérisation de ces stades découlent les données nécessaires aux études plus générales sur la transmission parasitaire. D'un point de vue épidémiologique, il est essentiel de pouvoir estimer l'intensité de la transmission et donc de quantifier ces formes transmises. Ces données sont en effet indispensables pour l'élaboration de modèles mathématiques prédictifs de la transmission et aux analyses de risque de propagation des maladies vectorisées. De plus, la mise en évidence de facteurs induisant et influençant la différenciation parasitaire, que ce soit pour le gamétoocyte ou le sporozoïte, est un élément majeur de compréhension du cycle. Ceci permet, par exemple, de déterminer les conditions optimales de transmission dans les conditions naturelles et de réaliser des infections expérimentales contrôlées.

Par ailleurs, l'étude de ces stades parasitaires et l'identification de protéines spécifiques de ces stades peuvent servir l'identification de cibles à visée vaccinale. Agir sur les stades de transmission, qui correspondent à une phase de goulot d'étranglement pour le parasite, est plus efficace pour tenter de bloquer le cycle parasitaire et donc la transmission. Par ailleurs, cibler des protéines communes aux stades présents chez le vertébré et chez le vecteur permettrait d'optimiser l'efficacité vaccinale.

Pour *B. divergens*, ni les sporozoïtes ni les gamétoocytes n'ont encore été mis en évidence et l'étude de ces stades de transmission représente l'objectif de cette thèse. Le manuscrit exposant cette étude est divisé en quatre chapitres. Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique présente d'abord les caractéristiques de *B. divergens*, de son cycle biologique et de sa transmission. Ensuite, pour l'étude des sporozoïtes, les connaissances sont élargies aux Apicomplexes transmis par des tiques, les *Babesia* spp. et les *Theileria* spp.. Concernant les gamétoocytes, peu de données sont disponibles pour les genres *Babesia* et *Theileria*, les connaissances acquises sur un autre parasite biologiquement et phylogénétiquement proche de *B. divergens*, *P. falciparum*, sont donc présentées. Les stades sexués de cette espèce sont en effet bien caractérisés : ils sont morphologiquement différenciables et de nombreuses données moléculaires sont disponibles. Après la description des protocoles expérimentaux utilisés (Chapitre 2), les résultats obtenus sont présentés et discutés en deux parties, l'une concernant la mise en évidence des sporozoïtes (Chapitre 3), l'autre les marqueurs de stades sexués (Chapitre 4). Une discussion générale de l'ensemble des travaux et de leurs perspectives clôt ce manuscrit.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. *Babesia divergens*, parasite des bovins, transmis par les tiques

B. divergens est un protozoaire appartenant au Phylum des *Apicomplexa*, Classe des *Piroplasmae*, Ordre des *Piroplasmida*, Famille des *Babesiidae*. Les premières classifications de la famille ont été établies sur les caractères morphologiques et sur les spécificités d'hôte vertébré de ces parasites. Deux groupes sont ainsi distingués : les grandes formes de *Babesia* (longueur du parasite supérieure au rayon de l'hématie) incluant : *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi*, *B. canis* et les petites formes de *Babesia* : *B. divergens*, *B. gibsoni*, *B. microti*, *B. rodhaini*. Les analyses moléculaires ultérieures basées sur le séquençage de l'ADN ribosomal ne recoupent pas cette répartition : *B. divergens* est une petite forme de parasite, mais est génétiquement plus proche des grandes formes de *Babesia* (Homer *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'appartenance de *B. microti* au genre *Babesia* ou *Theileria* n'est pas clairement définie (Uilenberg, 2006). Tout au long de ce manuscrit, la précision *s.l.* a donc été apportée, pour les cas où *Babesia* spp. inclut *B. microti* ou *s.s.* lorsque cette espèce est exclue.

B. divergens est l'agent pathogène principal responsable de la babésiose bovine européenne. Il est très fréquent en Europe, mais engendre peu de cas cliniques. Les bovins sont le plus souvent porteurs asymptomatiques de ce parasite. Occasionnellement, l'homme peut aussi être infecté par *B. divergens* : la babésiose est actuellement reconnue comme une zoonose émergente (Homer *et al.*, 2000; Hunfeld *et al.*, 2008). Les cas récents de babésiose humaine ont montré l'implication d'autres espèces de *Babesia*, proches de *B. divergens* mais dont les hôtes réservoirs sont différents : *B. sp.* EU1 (chevreuil) et *B. sp.* MO1 (lapin) (Gray, 2006; Hunfeld *et al.*, 2008).

A. Cycle de développement parasitaire

B. divergens présente un cycle dixène (Figure 1). Pour une partie de son cycle, il se multiplie de manière asexuée dans les globules rouges des bovins. Il est ensuite acquis à la faveur d'un repas sanguin puis se développe chez *Ixodes ricinus*, tique dure de la famille des Ixodidés.

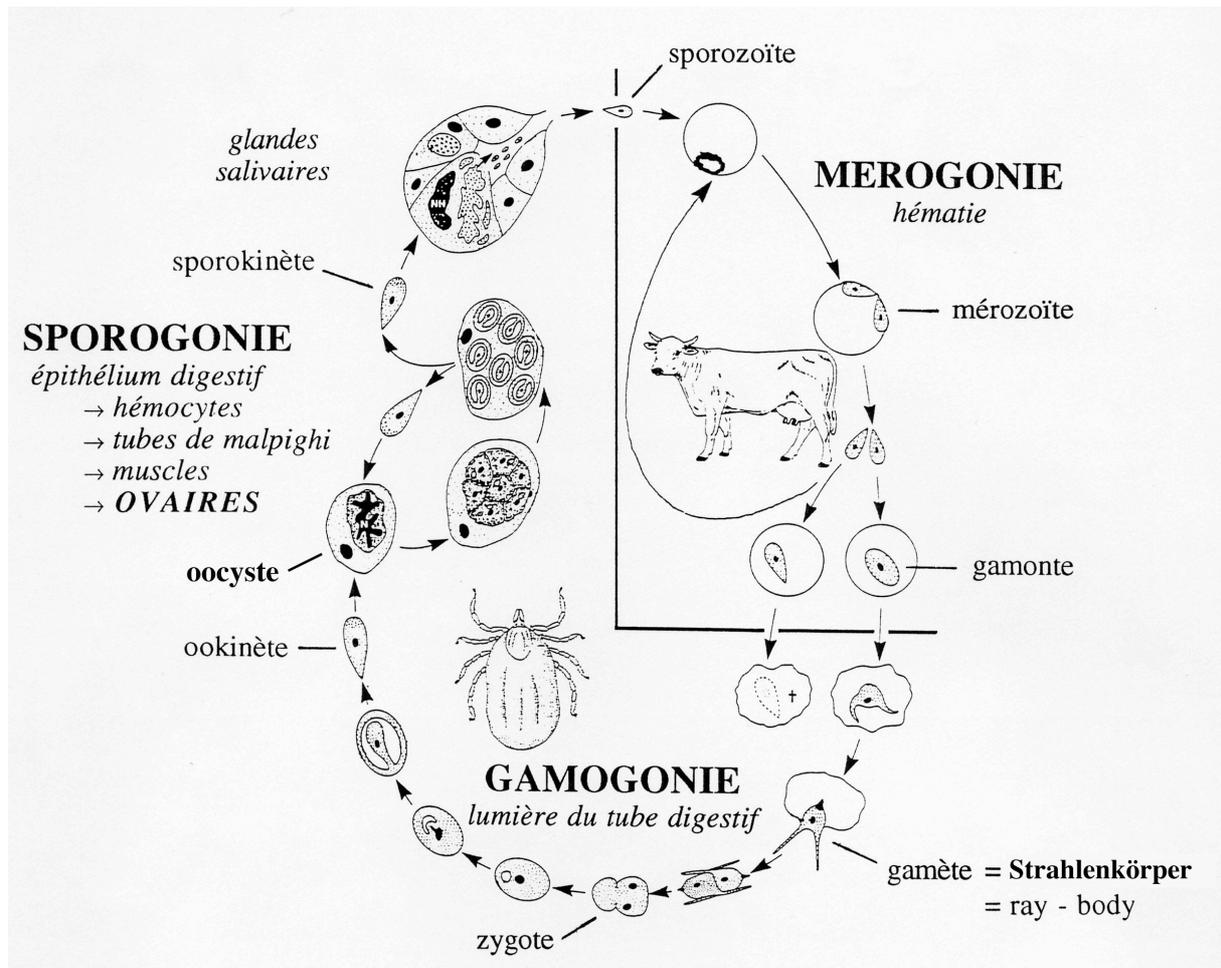


Figure 1 : Cycle de développement de *B. divergens* chez ses hôtes, vertébré et arthropode
(modifié d'après Mehlhorn & Walldorf, 1988)

Bien que ses hôtes soient tous deux identifiés, les phases du développement de *B. divergens*, ayant lieu dans le vertébré et dans le vecteur, ne sont pas connues avec la même précision. Le cycle parasitaire chez le bovin peut être facilement suivi et reproduit *in vitro*, le parasite se multipliant exclusivement dans les érythrocytes (Zintl *et al.*, 2003). Le développement parasitaire dans le vecteur est, quant à lui, beaucoup plus difficile à étudier et les données sont rares pour *B. divergens*.

L'infection du bovin par *B. divergens* débute, lors d'une piqûre de tique, par l'injection de sporozoïtes produits dans les glandes salivaires du vecteur. Après son passage dans le courant sanguin et suite à sa pénétration active dans le globule rouge, le parasite se retrouve dans le cytoplasme entouré de la membrane érythrocytaire, formant la vacuole parasitophore qui est détruite ensuite (Mehlhorn & Schein, 1984). La phase de mérogonie proprement dite intervient alors. Un trophozoïte est formé (de forme arrondie, dite en anneau), par doublement du matériel parasitaire (nucléaire et cytoplasmique), il se divise ensuite par scission binaire et

forme des mérozoïtes. Les mérozoïtes, libérés par lyse du globule rouge, peuvent alors directement infecter de nouvelles hématies (Mehlhorn & Schein, 1984). *B. divergens* peut poursuivre sa multiplication dans les globules rouges de son hôte vertébré, pendant plusieurs années.

Certains trophozoïtes ne se divisent pas : ils grossissent et restent dans le globule rouge. Ils ne poursuivront leur évolution que s'ils sont ingérés par une tique (Mehlhorn & Schein, 1984). Ils sont appelés gamontes ou gamétocytes, formes de transmission entre le bovin et la tique.

Le développement de *B. divergens* dans la tique est connu avec bien moins de précision, aucune étude n'ayant été réalisée pour cette espèce en particulier. Les différentes phases sont donc pour la plupart extrapolées à partir d'observations faites chez d'autres espèces de *Babesia* (Mehlhorn & Schein, 1984).

Lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté, la tique ingère des globules rouges parasités. Seuls les gamétocytes vont évoluer dans le tube digestif de la tique, toutes les formes asexuées ingérées étant détruites. C'est dans la lumière intestinale de la tique qu'a lieu la transformation en gamètes, ou corps rayonnants (corps cellulaires avec une épine et des protrusions cytoplasmiques). Deux gamètes fusionnent alors pour former un zygote. Ce zygote migre dans les cellules épithéliales intestinales et se différencie en ookinète (7 à 8 μm de longueur). Suite à la pénétration de l'ookinète dans l'épithélium digestif, une phase de multiplication asexuée commence (Friedhoff, 1981; Young & Morzaria, 1986). L'oocyste se divise pour donner naissance à de nombreux sporokinètes. Ces derniers peuvent ensuite migrer dans tout le corps de la tique via l'hémolymphe. Les multiplications sporogoniques suivantes ont lieu principalement dans les hémocytes, les fibres musculaires, les tubes de Malpighi, les glandes salivaires et les ovaires (Mehlhorn & Schein, 1984; Young & Morzaria, 1986). Ces divisions permettent la production de nouveaux sporokinètes qui peuvent aller se multiplier dans d'autres cellules. Certains organes jouent un rôle particulièrement important pour la transmission : les ovaires (cf. paragraphe suivant) et les glandes salivaires. Dans les glandes salivaires, le parasite entame un développement particulier. Les sporokinètes infectent les cellules des acini et se différencient en sporoblastes. La poursuite de la différenciation parasitaire n'a lieu que sous l'influence d'un nouveau repas sanguin, au moment où la tique s'attache à un hôte et se nourrit. Des sporozoïtes infectants sont alors formés dans les glandes salivaires et transmis au vertébré par le biais de la salive. Une nouvelle phase de mérogonie peut alors commencer dans les globules rouges du bovin nouvellement infecté.

B. Biologie d'*I. ricinus* et lien avec le développement de *B. divergens*

I. ricinus est une tique triphasique (trois stades de développement : larve, nymphe et adulte) et polytrope (hôte différent pour chaque stade). Son cycle de vie, décrit dans la Figure 2, dure en moyenne 3 ans, chaque stade ne se nourrissant qu'une seule fois.

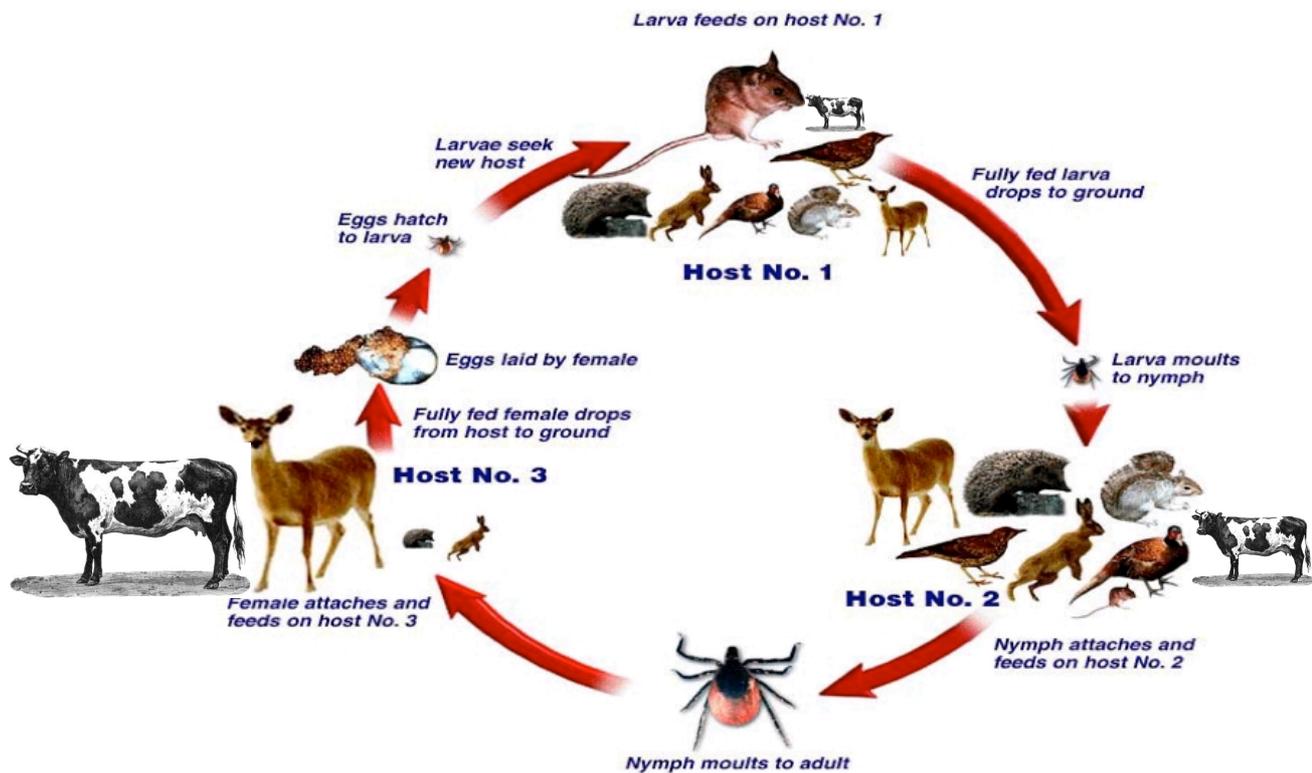


Figure 2 : Cycle biologique d'*I. ricinus*

(modifié d'après Gray J. et Kaye B.)

La taille relative des animaux représentés sur le cycle donne une indication approximative de leur participation quantitative en tant qu'hôtes des différents stades de la tique. L'homme n'a pas été représenté sur la figure mais peut être un hôte occasionnel de cette tique.

Les larves, libres, présentes dans le milieu trouvent un hôte (rongeurs principalement) et se nourrissent en 2 à 3 jours (Sonenshine, 1991). A réplétion, elles se détachent, tombent au sol et muent. Les nymphes émergeant cherchent un nouvel hôte et se gorgent en 4 à 5 jours. Une fois au sol, une nouvelle phase de mue a lieu, pour donner un individu adulte, mâle ou femelle. Les femelles cherchent un hôte (bovin ou cervidé principalement) pour leur unique repas sanguin. Elles trouvent leur partenaire sexuel soit au sol, soit directement sur l'hôte. Le mâle ne se gorge pas et féconde seulement la femelle. La femelle ne se gorge totalement (en 7

à 8 jours) que si elle a été fécondée. A réplétion, elle se détache, trouve au sol un endroit favorable pour y pondre (entre 2000 et 5000 œufs) puis meurt. Les œufs éclosent et donnent des larves, prêtes à se gorger sur un nouvel hôte. Chaque phase de transformation (mues ou éclosion) dure un mois environ. Des phases de diapause interviennent dans ce cycle biologique de la tique, notamment en période froide. La durée totale du cycle, d'une génération à l'autre, dure en moyenne de 2 à 4 ans.

Les tiques constituent ainsi le réservoir majeur de *B. divergens* grâce à la transmission trans-stadiale et trans-ovarienne (Zintl *et al.*, 2003). Après l'infection d'une tique adulte par gorgement sur un bovin infecté, les sporokinètes formés au niveau du tube digestif de la tique envahissent ses ovaires et infectent les œufs, assurant la transmission trans-ovarienne. Par ailleurs, les nombreux cycles sporogoniques ayant lieu dans les différents organes de la tique permettent la persistance du parasite dans l'individu au cours de la mue, assurant la transmission trans-stadiale. Ceci permet le maintien de l'infection parasitaire au sein de la population de vecteurs, sans nouvelle acquisition. Le parasite peut ainsi persister au sein de la population de tiques au moins 4 ans, étant donnée la durée du cycle de la tique (Joyner & Donnelly, 1979). La survie à court terme de *Babesia* dans l'environnement ne dépend donc pas seulement de la présence d'hôtes vertébrés infectés.

C. La babésiose bovine à *B. divergens*

B. divergens est responsable d'une maladie touchant principalement les bovins : la babésiose, ou piroplasmose, bovine. Mais ce parasite montre peu de spécificité d'hôte aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Gorenflot *et al.*, 1991; Chauvin *et al.*, 2002; Zintl *et al.*, 2002). Il peut infecter notamment le mouton, la gerbille (*Meriones unguiculatus*, seul rongeur de laboratoire sensible à *B. divergens* (Lewis & Williams, 1979)) et l'homme. Le mouton infecté est porteur asymptomatique, alors que la gerbille présente les signes cliniques d'une infection aigue. L'expression clinique chez l'homme n'a été mise en évidence que chez des individus splénectomisés (Zintl *et al.*, 2003; Hunfeld *et al.*, 2008).

1. Epidémiologie

En France, l'incidence de la babésiose bovine est de 0,4% par an en moyenne, avec une plus forte prévalence dans l'Ouest et le Centre (L'Hostis *et al.*, 1995). Les cas de babésiose sont plutôt observés (72,6%) sur des animaux âgés (plus de 3 ans). La résistance à la maladie

décroît en effet avec l'âge des animaux (Christensson, 1989). Les veaux, jusqu'à un an, sont sensibles à l'infection, mais résistants à la maladie.

De nombreux bovins sont infectés sans exprimer de signes cliniques. Ces porteurs asymptomatiques constituent une source de contamination constante et continue pour les tiques. Ils entretiennent ainsi la présence du parasite au sein du troupeau ou d'une région (Zintl *et al.*, 2003).

La distribution de la babésiose chez les bovins est très large : elle coïncide avec la distribution de la tique vectrice, *I. ricinus*. L'apparition de la maladie est directement dépendante de l'activité des tiques. Deux pics de babésiose sont ainsi observés dans l'année : un au printemps et un à l'automne, correspondant aux deux pics d'activité des nymphes et des adultes (Gray, 1980; L'Hostis & Chauvin, 1999). L'incidence maximale des cas de babésiose a lieu en général deux semaines après le pic d'activité des tiques. Ce délai correspond au temps requis pour l'attachement des tiques, leur gorgement et l'incubation de la maladie (Gray, 1980).

La recherche d'hôtes sauvages réservoirs de *B. divergens* n'a mis en évidence l'implication d'aucun autre vertébré (Zintl *et al.*, 2003). En revanche, les études récentes sur la faune sauvage comme réservoir potentiel de *Babesia* spp. ont conduit à l'identification de nombreux isolats, distincts d'un point de vue moléculaire, de *B. divergens* (Bonnet *et al.*, 2007a; Schmid *et al.*, 2008; Tampieri *et al.*, 2008).

2. Symptômes

Les principaux symptômes de la babésiose sont dus à la lyse des globules rouges et au syndrome infectieux général. On observe principalement fièvre, anémie et hémoglobinurie. Les symptômes peuvent parfois s'aggraver jusqu'à la mort de l'animal (Zintl *et al.*, 2003). Les formes cliniques sont à l'origine de pertes économiques, à cause du retard de croissance et de la baisse de production de lait qu'elles peuvent entraîner (McCosker, 1981).

Mais le plus fréquemment la parasitémie reste basse, entraînant peu de signes cliniques (Zintl *et al.*, 2003). Les infections asymptomatiques par *B. divergens* sont quant à elles très fréquentes (L'Hostis *et al.*, 1995).

3. Diagnostic

Le diagnostic de la babésiose peut se faire suivant plusieurs méthodes (Homer *et al.*, 2000; Hunfeld *et al.*, 2008).

Le diagnostic direct (recherche du parasite), plutôt utilisé pour confirmer une suspicion clinique, se fait par hématologie (prélèvement de sang, étalement sanguin, coloration au May Grünwald Giemsa, observation directe), xénodiagnostic (inoculation de sang à la gerbille), mise en culture du sang ou recherche de l'ADN parasitaire par PCR. Le diagnostic par analyse moléculaire, avec séquençage du fragment amplifié par PCR, est le seul qui permette de confirmer l'identité de l'agent pathogène incriminé dans une infection (Hunfeld *et al.*, 2008). Aucune méthode standardisée n'est disponible actuellement.

Le diagnostic indirect (sérologique, recherche de traces de passage du parasite) est plutôt utilisé pour les études épidémiologiques. L'immunofluorescence indirecte (IFI) permet de déterminer le statut immunologique d'un troupeau. Dans le but de confirmer l'identité d'un agent pathogène, les techniques sérologiques ne sont cependant pas assez spécifiques, du fait de l'existence de réactions croisées entre différentes espèces de *Babesia* (Hunfeld *et al.*, 2008).

4. Traitement et prévention

Le traitement de choix lors de cas clinique de babésiose chez les bovins est l'imidocarbe à la dose de 121,15 mg par 100 kg de poids vif (soit 1 mL de Carbesia®, Schering-Plough Vétérinaire) (Homer *et al.*, 2000). Cette molécule est aussi utilisée en chimioimmunisation, à la dose de 303 mg par 100 kg de poids vif (soit 2,5 mL de Carbesia®).

Aucun vaccin réellement efficace contre le parasite n'est disponible actuellement (Zintl *et al.*, 2003).

D. Transmission de *B. divergens* par *I. ricinus*

Différents points clés du développement de *B. divergens* vont avoir une influence essentielle sur la transmission de ce parasite par la tique vectrice *I. ricinus* : l'acquisition du parasite par la tique, sa transmission aux stades de tique suivants, et sa retransmission à un hôte vertébré. Seulement cinq études portent sur l'analyse expérimentale de la transmission de *B. divergens* par *I. ricinus* (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975; Lewis & Young, 1980; Mackenstedt *et al.*, 1990; Bonnet *et al.*, 2007b). Ainsi, certains aspects de la transmission exposés ici proviennent de données acquises sur d'autres espèces de *Babesia*.

1. Transmission de l'hôte vertébré à la tique

L'initiation du développement parasitaire chez la tique ne se résume pas à la seule ingestion de parasites par le vecteur. Il est nécessaire que deux gamétocytes, un mâle et une femelle, soit ingérés simultanément et que la reproduction sexuée ait lieu dans le tube digestif du vecteur. On considère que l'infection du vecteur est établie dès lors que le parasite s'installe au niveau de l'épithélium digestif sous forme d'oocyste, comme décrit chez *P. falciparum* (Vermeulen *et al.*, 1985). Cependant, comme il paraît peu probable de réussir à identifier les oocystes de *B. divergens* par simple observation de tiques (chez qui le tube digestif est constitué d'une multitude de diverticules), le seul moyen de confirmer qu'une tique a acquis efficacement le parasite, est donc pour l'instant de prouver la retransmission du parasite (*in vitro* ou sur animal), ou encore de mettre en évidence directement les stades transmis, les sporozoïtes, dans les glandes salivaires des tiques (soit par observation microscopique soit par PCR).

L'acquisition du parasite à partir d'un hôte vertébré, quel qu'il soit, ne peut se faire que si des gamétocytes sont présents dans ses globules rouges. Le bovin, hôte naturel de *B. divergens*, permet nécessairement le développement de ces stades parasitaires. D'autre part, les études de Mackenstedt *et al.* prouvent que les gamétocytes de *B. divergens* sont également produits chez la gerbille de Mongolie, hôte expérimental du parasite (Mackenstedt *et al.*, 1990).

L'acquisition du parasite est fonction de la parasitémie de l'animal pondérée par le taux de gamétocytes circulants, seule forme infectante. Cependant, certaines études ont montré que, pour *B. divergens*, la parasitémie du bovin, mesurée par comptage des formes intra-érythrocytaires, ne jouerait pas sur la probabilité d'infection des tiques. Que le bovin soit en période de forte parasitémie (1 à 30% selon les expériences) ou bien porteur du parasite à très faible taux (parasite non visible sur un étalement sanguin), les tiques peuvent acquérir l'infection (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975). La quantité de gamétocytes présents, ou leur infectivité, n'est ainsi peut-être pas directement liée à la parasitémie globale de l'animal.

Comme décrit précédemment, les 3 stades de la tique peuvent se gorger sur le bovin : la larve, la nymphe et la femelle adulte. Le volume de sang que chaque stade peut ingérer dépend de sa taille et on estime que la larve ingère environ 10 μL , la nymphe 100 μL et l'adulte 1 mL. Pour que les tiques acquièrent l'infection, il est nécessaire que dans le volume de ce bol alimentaire des stades de transmission soient présents. La probabilité pour une

adulte de s'infecter est donc supérieure à celle d'une larve. D'autre part, il est envisageable que les compétences des différents stades de tiques à acquérir, maintenir et transmettre *B. divergens* varient.

Ainsi, les infections expérimentales *in vivo* de tiques sur veaux infectés par *B. divergens*, réalisées par les équipes de Joyner et de Donnelly ont montré que, parmi les trois stades de développement d'*I. ricinus*, seule la femelle adulte est capable d'acquérir l'infection parasitaire (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975). Les essais d'infection de larves et de nymphes, réalisés en même temps que des adultes sur un même veau infecté, ont été négatifs. Seules les tiques ayant acquis le parasite au stade adulte ont été capables de le retransmettre (Donnelly & Peirce, 1975). Cependant, d'autres données basées sur la détection directe des parasites dans la tique tendent à démontrer que les autres stades pourraient aussi acquérir le parasite et permettre son développement. Les études de Mackenstedt *et al.* ont ainsi démontré que les stades parasitaires de *B. divergens* issus du développement sexué et des sporogonies suivantes sont bien présents dans les organes de nymphes infectées sur gerbilles. La mesure des taux d'ADN cellulaire des formes observées a aussi confirmé l'existence d'une phase de reproduction parasitaire sexuée chez la nymphe (Mackenstedt *et al.*, 1990). De plus, une étude récente réalisée au sein de notre laboratoire a montré, par le biais d'infections *in vitro* d'*I. ricinus*, que l'ADN de *B. divergens* était bien retrouvé dans les glandes salivaires de nymphes et femelles adultes suite à l'infection de larves et nymphes, respectivement. Couplés à la détection d'ADN chez des larves issues de femelles infectées, ces résultats suggèrent qu'en conditions expérimentales, tous les stades de la tique sont à même d'acquérir le parasite (Bonnet *et al.*, 2007b).

Les premières études de la transmission *in vivo* de *B. divergens* ont cependant montré que tous les individus adultes d'une population ne s'infectent pas forcément (ou ne transmettent pas le parasite à leur descendance) : les lignées issues de différentes femelles, pourtant gorgées sur un même animal, ne sont pas toutes capables de retransmettre le parasite (proportions de larves infectées variant de 40 à 75%) (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975). Un résultat similaire a été rapporté pour l'espèce *B. sp.* EU1, à la fois *in vivo* (Bonnet *et al.*, 2007a) et *in vitro* (Bonnet *et al.*, 2009).

Enfin, aucune donnée n'est disponible sur des variations éventuelles d'infectivité entre souches parasitaires comme cela a pu être démontré pour d'autres parasites (Dixon *et al.*, 2008).

2. Transmission d'un stade à l'autre de la tique

En raison de la longueur du développement de *B. divergens* dans son vecteur, une tique ne peut acquérir et transmettre le même parasite au cours du même repas. Sachant que cette dernière ne prend qu'un seul repas sanguin par stade, le parasite doit donc persister au fil des transformations du vecteur, au minimum entre deux stades pour pouvoir être retransmis à un nouvel hôte vertébré. Deux modes de transmission sont distingués ici : la transmission trans-ovarienne de l'adulte femelle aux œufs puis aux larves, et la transmission trans-stadiale entre larves et nymphes et entre nymphes et adultes.

a. Transmission trans-ovarienne

La transmission trans-ovarienne chez les tiques est une caractéristique du genre *Babesia*. (Mehlhorn & Schein, 1984; Young & Morzaria, 1986). Cette étape est nécessaire pour que le parasite acquis par l'adulte puisse être retransmis par la génération suivante. Les différentes expériences d'infection de tiques au stade adulte par *B. divergens* et de retransmission par les larves prouvent bien le passage efficace du parasite par les ovaires et les œufs (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975; Lewis & Young, 1980). En outre, des observations microscopiques de *Babesia* spp. *s.s.* se développant dans les ovaires des tiques indiquent que la transmission des parasites à la génération suivante peut bien avoir lieu par cette voie (Morzaria *et al.*, 1976; Friedhoff, 1981; Buscher *et al.*, 1988).

La transmission trans-ovarienne de *B. ovis* par *Rhipicephalus bursa* a été étudiée expérimentalement de manière quantitative, pour des femelles infectées de deux manières différentes : infection lors du repas sanguin en cours ou acquisition du parasite aux stades précédents (Friedhoff & Smith, 1981; Buscher *et al.*, 1988; Friedhoff, 1988). Dans le premier cas (infection alimentaire), les sporokinètes n'étaient visibles dans l'hémolymph que 5 à 6 jours après la réplétion de la tique (temps nécessaire au parasite pour effectuer son développement jusqu'à ce stade), la ponte ayant alors déjà débuté. Les premiers œufs de cette lignée n'étaient donc pas infectés. Par contre, sur la fin de la ponte, le taux d'infection était alors élevé avec jusqu'à 50% des œufs infectés. Dans le second cas, les parasites étaient présents dans l'hémolymph de la tique en continu et donc les œufs étaient infectés tout au long de la ponte, mais en faible proportion (environ un tiers). Lors d'infection combinée, les œufs produits tout au long de la ponte étaient infectés, avec des taux allant jusqu'à 75%.

b. Transmission trans-stadiale

Une fois l'infection acquise *in vivo* au stade adulte, tous les stades d'une lignée de tiques se sont avérés capables de retransmettre *B. divergens* à un vertébré, sans nouvelle acquisition (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975). Le parasite est donc nécessairement aussi transmis de manière trans-stadiale, au cours des mues. Les études récentes d'infections expérimentales *in vitro* ont également montré la persistance d'ADN de *B. divergens* dans les tiques, d'un stade à l'autre, et ceci quel que soit le stade d'acquisition du parasite (Bonnet *et al.*, 2007b). La mise en évidence de *Babesia* spp. *s.s.* dans l'hémolymphe de tiques non gorgées démontre une circulation du parasite dans tout le corps de la tique et sa persistance au fil des transformations (Buscher *et al.*, 1988; Higuchi *et al.*, 1991; Guglielmone *et al.*, 1996).

La transmission trans-stadiale du parasite ne semble pas influencée par les hôtes sur lesquels la tique se nourrit. Des gorgements successifs sur hôte non sensible à *B. divergens*, n'altèrent pas les capacités de tiques infectées à transmettre l'infection à un bovin au stade suivant (Donnelly & Peirce, 1975). Ainsi, à partir de l'acquisition du parasite par une femelle, celui-ci peut persister dans les larves, nymphes et adultes de la génération suivante (F1), voire parfois jusqu'aux larves F2 en cas de gorgement sur un hôte non sensible (Donnelly & Peirce, 1975).

3. Transmission de la tique à l'hôte vertébré

La dernière étape du cycle parasitaire se déroulant au sein du vecteur est la transmission du parasite à un nouvel hôte vertébré, via l'injection des sporozoïtes présents dans les glandes salivaires de la tique. La transmission de *Babesia* spp. *s.s.* à un hôte vertébré implique donc, en tout premier lieu, la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires de la tique.

La compétence de chaque stade de tique à transmettre *B. divergens*, a été évaluée chez la descendance de tiques femelles infectées, dans le cadre de gorgements sur des bovins initialement sains, puis détection du parasite chez ces derniers. Les premières expériences montraient que la retransmission est plus probable par les larves (Joyner *et al.*, 1963). Mais les essais suivants ont prouvé que tous les stades, larve, nymphe et adulte, sont capables de retransmettre l'infection à un bovin (veau splénectomisé) (Donnelly & Peirce, 1975). D'autres expériences, utilisant avec succès la gerbille comme hôte réceptif, ont confirmé la retransmission par des larves provenant d'adultes infectées (Lewis & Young, 1980).

Il a été montré qu'une seule nymphe ou une seule adulte infectée par *B. divergens* est capable d'infecter un veau (Donnelly & Peirce, 1975). Le nombre minimum de larves nécessaires pour transmettre le parasite à un veau, serait quant à lui de 51, les auteurs

suggérant que le nombre limite puisse être inférieur, même si cela reste difficile à démontrer (Donnelly & Peirce, 1975).

Les travaux de Donnelly *et al.* ont déterminé que la transmission de *B. divergens* a lieu à la fin du gorgement (Donnelly & Peirce, 1975). Des nymphes gorgées seulement 48h sur un veau n'ont pas été capables de l'infecter et aucune forme parasitaire n'a été détectée dans le corps de la tique (hémolymphe et glandes salivaires) avant 48h. Au-delà de 72h de gorgement, des parasites ont été détectés dans l'hémolymphe et les glandes salivaires, et la transmission au bovin a été effective. Dans le cadre d'infections réalisées *in vitro*, il a été montré que, pour *B. sp.* EU1, de l'ADN parasitaire est transmis après 4 jours de fixation des femelles *I. ricinus* adultes (Bonnet *et al.*, 2009).

Enfin, des différences d'infectivité des tiques en fonction de leur l'âge ont été mises en évidence dans deux modèles (Friedhoff & Smith, 1981). Au bout de 76 jours d'inactivité, les larves de *Boophilus microplus*, au départ infectées par *B. bovis*, ne sont plus capables de transmettre le parasite. De même, pour les adultes de *R. bursa* infectées par *B. ovis*, la retransmission n'a été possible que durant 7,5 mois.

A l'analyse des travaux d'infections expérimentales décrits, il apparaît évident qu'il existe des variations d'efficacité en ce qui concerne l'acquisition du parasite par la tique et sa retransmission. Mais ces seuls essais d'infection-retransmission d'une population de tiques ne permettent pas de déterminer, en cas d'échec, quelle étape du développement parasitaire n'a pas eu lieu dans le vecteur. Il est impossible de prédire si les différences observées entre individus d'une même population proviennent de différences de capacités d'acquisition, de transmission trans-ovarienne, de transmission trans-stadiale ou de retransmission du parasite au vertébré.

4. Transmission en conditions naturelles

En conditions naturelles, les seules données établies concernent les prévalences d'infection des tiques non gorgées par différentes espèces de *Babesia*. Des études récentes basées sur la détection de l'ADN de différents agents pathogènes ont été menées pour mesurer le rôle vecteur d'*I. ricinus* en se basant sur la prévalence des dits agents pathogènes dans des tiques collectées sur le terrain. Le Tableau 1 présente différentes études qui concernent les prévalences de *Babesia* spp. *s.l.* dans les tiques en Europe.

Tableau 1 : Prévalences de *Babesia* spp. dans les tiques *I. ricinus* en Europe

Stades collectés	Origine des tiques	Pays	Nombre de tiques	Espèce de <i>Babesia</i> détectée	Prévalence (en %)	Technique de détection	Gène cible	Référence
N&A	v	Slovénie	135	<i>B. spp.</i>	9,6	PCR	18S	(Duh <i>et al.</i> , 2001)
				<i>B. mic</i>	7,4	PCR +séq		
L,N&A	v	Pologne	533	<i>B. div</i>	3,0	PCR	18S	(Skotarczak & Cichocka, 2001)
				<i>B. mic</i>	13,3			
N&A	v	Pologne	461	<i>B. spp.</i>	60,0	Obs GS		(Kuzna-Grygiel <i>et al.</i> , 2002)
				<i>B. mic</i>	1,9	PCR	18S	
N&A	v	Allemagne	3113	<i>B. spp.</i>	1,0	PCR	18S	(Hartelt <i>et al.</i> , 2004)
				<i>B. div</i>	0,9	PCR +séq		
				<i>B. mic</i>	0,1			
N&A	v & a	Suisse	1159	<i>B. spp.</i>	0,8	PCR	18S	(Casati <i>et al.</i> , 2006)
				<i>B. div</i>	0,2	PCR +séq		
				<i>B. EU1</i>	0,3			
				<i>B. mic</i>	0,2			
N&A	v	France	94	<i>B. spp.</i>	20,2	PCR	18S	(Halos <i>et al.</i> , 2005)
A	a	Suisse	700	<i>B. spp.</i>	3,7	PCR	18S	(Hilpertshauer <i>et al.</i> , 2006)
				<i>B. div</i>	0,6	PCR +séq		
				<i>B. EU1</i>	1,6			
L,N&A	v	Italie	1931	<i>B. spp.</i>	1,6	PCR	18S	(Piccolin <i>et al.</i> , 2006)
			4056	<i>B. spp.</i>	2,0	PCR en pool		
L,N&A	v	Pologne	1328	<i>B. spp.</i>	2,1	PCR		(Pieniazek <i>et al.</i> , 2006)
				<i>B. div</i>	2,0	PCR +séq		
				<i>B. mic</i>	0,2			
L	a	France	42	<i>B. spp.</i>	64,0	PCR	18S	(Bonnet <i>et al.</i> , 2007a)
A	a	Pays-Bas	251	<i>B. div</i>	0,4	PCR-RLB	18S	(Nijhof <i>et al.</i> , 2007)
				<i>B. EU1</i>	1,2			
				<i>B. mic</i>	0,4			
L,N&A	v	Autriche	853	<i>B. spp.</i>	51,7	PCR	18S	(Blaschitz <i>et al.</i> , 2008)
A	a	Suisse	853	<i>B. spp.</i>	0,7	PCR	18S +	(Schmid <i>et al.</i> , 2008)
				<i>B. cap</i>	0,1	PCR +séq	ITS	
				<i>B. EU1</i>	0,6			
L,N&A	v	Pays-Bas	1488	<i>B. spp.</i>	1,1	PCR	18S	(Wielinga <i>et al.</i> , 2008)
				<i>B. div</i>	0,1	PCR +séq		
				<i>B. EU1</i>	0,9			
				<i>B. mic</i>	0,1			

L : larves ; N : nymphes ; A : adultes ; v : végétation ; a : animaux ; *B. spp.* : *Babesia* spp. *s.l.* ; *B. div* : *B. divergens* ; *B. EU1* : *B. sp.* genotype EU1 ; *B. mic* : *B. microti* ; *B. cap* : *B. capreoli* ; séq : séquençage des produits de PCR ; Obs GS : Observation microscopique des glandes salivaires après coloration de Feulgen ; RLB : reverse line blotting ; 18S : gène codant pour l'ADNr 18S ; ITS : internal transcribed spacer

Comme suggéré par Friedhoff, le taux d'infection de la population générale de vecteur sur le terrain est bien plus bas que ce que l'on peut obtenir au laboratoire avec des infections expérimentales (Friedhoff & Smith, 1981). Dans la plupart des cas, le taux d'infection d'*I. ricinus* par les *Babesia* spp. est de l'ordre de 1%. Certaines études rapportent toutefois des taux d'infection assez élevés (10 à 60%). Mais, au sein du genre *Babesia*, *B. divergens* n'est pas la seule espèce à être transmise par *I. ricinus*. D'autres espèces, en particulier *B. sp. EU1* ou *B. capreoli* sont transmises par le même vecteur. Il est difficile de distinguer ces espèces par simple PCR, celles-ci étant phylogénétiquement très proches. D'autre part, la très grande majorité des études recensées, sont basées sur une détection d'ADN sur tiques entières par PCR, ce qui reflète le statut infecté des tiques mais non leur statut infectant. Ainsi des espèces non vectorisées par *I. ricinus* peuvent aussi interférer avec les résultats observés. Les résultats des études sur la transmission de *B. divergens* sur le terrain sont donc fortement influencés par la circulation de ces autres espèces dans la population de tiques *I. ricinus*.

Lorsque l'espèce *B. divergens* a été identifiée spécifiquement (Hartelt *et al.*, 2004; Casati *et al.*, 2006; Hilpertshauser *et al.*, 2006; Pieniazek *et al.*, 2006; Wielinga *et al.*, 2008), les prévalences de tiques infectées (détection d'ADN parasitaire par PCR et séquençage) sont basses, alors que les bovins sont fréquemment porteurs de *B. divergens* (L'Hostis & Chauvin, 1999). En mettant ces données en rapport avec les différentes étapes de la transmission, on peut supposer que la phase d'acquisition du parasite et/ou de transmission trans-ovarienne et trans-stadiale ne doivent pas être très efficaces. La probabilité de trouver une tique infectée étant assez faible, cela laisse penser qu'au contraire les tiques infectées sont très efficaces pour retransmettre le parasite.

Bien que les grandes lignes des caractéristiques de la transmission de *B. divergens* aient été établies, les connaissances sur ce parasite restent limitées, en particulier sur les formes sporozoïte et gamétoocyte, responsables des passages du vertébré au vecteur et du vecteur au vertébré. La caractérisation de ces stades de transmission, est une nécessité pour toutes les études plus larges sur la transmission de ce parasite.

II. Le sporozoïte : stade de transmission du vecteur au vertébré

Comme vu précédemment, le stade parasitaire faisant le lien entre la tique infectée et le bovin est le sporozoïte. C'est son passage chez le vertébré qui conditionne l'installation de l'infection parasitaire chez cet hôte. Toutes les études visant à analyser la transmission du vecteur au vertébré dépendent donc de la caractérisation et de la quantification de cette forme parasitaire. Il est donc nécessaire de pouvoir identifier les sporozoïtes, produits dans les glandes salivaires de la tique, mais aussi de connaître leur mode de production. Les sporozoïtes de *B. divergens* n'ont jamais été identifiés et aucune donnée n'est disponible sur ce stade de transmission dans cette espèce.

La synthèse présentée ici regroupe les connaissances sur les sporozoïtes des *Babesia* spp. *s.l.*, en élargissant les données aux *Theileria* spp., groupe d'Apicomplexes phylogénétiquement et biologiquement très proches, aussi transmis par des tiques. Les données disponibles sont peu nombreuses car l'étude des sporozoïtes nécessite la maîtrise des techniques de production de parasites intra-cellulaires obligatoires au cycle complexe, avec des techniques d'élevage, de gorgement et d'infection du vecteur complexes aussi qui font souvent intervenir de nombreux animaux. De plus, les délais liés aux cycles de la tique et du parasite dans son vecteur rendent les expérimentations longues. Le développement récent de techniques d'infection de tiques *in vitro* (Voigt *et al.*, 1993; Waladde *et al.*, 1993; Musyoki *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2007b) devraient alléger les protocoles, à condition d'être en mesure de reproduire au mieux les conditions naturelles d'infection.

A. Formation et caractères morphologiques des sporozoïtes

1. Production des sporozoïtes dans les glandes salivaires de tiques

Pour presque toutes les espèces de *Babesia* (*s.l.*) étudiées, ainsi que les *Theileria* spp., le développement des parasites dans les glandes salivaires se déroule de façon similaire (Potgieter & Els, 1976; Schein *et al.*, 1979; Weber & Walter, 1980; Moltmann *et al.*, 1982; Karakashian *et al.*, 1983; Mehlhorn & Schein, 1984; Piesman *et al.*, 1986; Yano *et al.*, 2005). Les sporokinètes, produits au niveau de l'épithélium digestif à partir de l'oocyste, circulent dans l'hémolymphe de la tique et certains pénètrent dans les cellules des glandes salivaires. La pénétration des sporokinètes des différentes espèces de *Babesia s.l.* dans les glandes salivaires a lieu à des moments différents par rapport au repas de la tique. *B. microti* est déjà présent dans les glandes salivaires avant le début du gorgement de la tique (Karakashian *et al.*, 1983). D'après les résultats positifs d'analyses par PCR de glandes salivaires de tiques non

gorgées, *B. divergens* et *B. sp. EU1* sont aussi déjà présents dans les glandes salivaires avant le repas sanguin (Bonnet *et al.*, 2007a; Bonnet *et al.*, 2007b; Bonnet *et al.*, 2009). Mais pour *B. ovis* et *B. canis*, c'est seulement lorsque la tique se fixe sur l'hôte et débute son repas sanguin que les sporokinètes circulant dans l'hémolymphe envahissent les glandes salivaires (durant les 2 premiers jours de gorgement) (Schein *et al.*, 1979; Moltmann *et al.*, 1982). Les parasites pénétrant dans les cellules des glandes salivaires perdent alors leur forme caractéristique et se transforment en un large sporoblaste (60 µm pour *B. bovis* et *B. microti* (Potgieter & Els, 1976; Yano *et al.*, 2005) à 90 µm de diamètre pour *B. bigemina* (Mosqueda *et al.*, 2004b)).

Pour toutes les espèces étudiées, c'est uniquement sous l'influence d'un repas sanguin que la maturation parasitaire débute. Le sporoblaste se fragmente en nombreux cytomères, portions de cytoplasme (contenant des morceaux de noyau) reliées par des ponts cytoplasmiques au reste de la masse parasitaire et forment ainsi un réseau tridimensionnel complexe dans la cellule-hôte. Les sporozoïtes se forment à partir de ces cytomères, en commençant par la périphérie. Les parasites formés sont libérés par bourgeonnement à partir du sporoblaste dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Ils gagnent le conduit salivaire et sont injectés à l'hôte vertébré via la salive de la tique.

La formation des sporozoïtes de *B. canis* dans les glandes salivaires des adultes de *Dermacentor reticulatus* diffère de celle des autres espèces de *Babesia* étudiées (Schein *et al.*, 1979). Dès son entrée dans la cellule-hôte, le parasite commence une série de fissions binaires. De nombreux parasites sont ainsi formés par multiples divisions successives. Ces parasites sont distinguables seulement au microscope électronique ; au microscope optique la cellule-hôte apparaît comme remplie d'une masse compacte. Au fur et à mesure de ces divisions, les parasites deviennent de plus en plus petits et perdent progressivement les caractéristiques morphologiques des sporokinètes, pour adopter celles des stades infectants. Après 4 à 5 jours de gorgement, la cellule-hôte est remplie de parasites piriformes, qui sont alors libérés dans la salive. Aucun sporoblaste n'a jamais été observé pour cette espèce.

La pénétration puis le développement parasitaire dans les cellules des glandes salivaires provoquent leur hypertrophie, les organites cellulaires et le noyau sont repoussés à la périphérie. L'hypertrophie des cellules infectées par le parasite ne gêne apparemment pas l'activité de la glande salivaire, les conduits salivaires ne sont pas bouchés et la sécrétion de salive n'est pas altérée (Moltmann *et al.*, 1982).

Les durées nécessaires à la formation des sporozoïtes sont similaires pour toutes les espèces de *Babesia* étudiées à ce jour (par observation microscopique) et sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des sporozoïtes de différentes espèces de *Babesia s.l.*

Parasite	Tique		Durée de formation (jours)	Taille (µm)		Référence
	Espèce	Stade		Lo	la	
<i>B. microti</i>	<i>I. ricinus</i>	N		1,3		(Weber & Walter, 1980)
<i>B. microti</i>	<i>I. dammini</i>	N	2	2,2	0,8	(Karakashian <i>et al.</i> , 1983)
<i>B. microti</i>	<i>I. dammini</i>	A	4	2,4	0,7	(Piesman <i>et al.</i> , 1986)
<i>B. microti</i>	<i>I. ovatus</i>	A	2	1,4	1	(Yano <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. bovis</i>	<i>B. microplus</i>	L		2,5	1,3	(Potgieter & Els, 1976)
<i>B. bigemina</i>	<i>B. microplus</i>	N	9 à 10*			(Mosqueda <i>et al.</i> , 2004b)
<i>B. ovata</i>	<i>H. longicornis</i>	N	3 à 4	1 à 2		(Higuchi <i>et al.</i> , 1994)
<i>B. ovis</i>	<i>R. bursa</i>	A	4 à 5	2,8	1,2	(Moltmann <i>et al.</i> , 1982)
<i>B. gibsoni</i>	<i>R. sanguineus</i>	L	3 à 4	1 à 2		(Higuchi <i>et al.</i> , 1995)
<i>B. canis</i>	<i>D. reticulatus</i>	A	4 à 5	2,5	1,5	(Schein <i>et al.</i> , 1979)

L : larve, N : nymphe, A : adulte, Formation : durée en jours de formation des sporozoïtes depuis le début du gorgement de la tique, Lo : longueur, la : largeur. *H.* : *Haemaphysalis*

*pour *B. microplus*, tous les stades se gorgeant sur le même hôte, on compte la durée de gorgement depuis le dépôt des larves.

Chez une tique infectée, 5000 à 10 000 sporozoïtes peuvent être formés par cellule de glandes salivaires infectée par *Babesia spp. s.l.* (Mehlhorn & Schein, 1984) et 40 à 50 000 sporozoïtes pour *Theileria spp.* (Bishop *et al.*, 2004). Ces sporozoïtes ne sont pas injectés massivement à l'hôte vertébré, mais progressivement au cours de leur formation et du repas sanguin de la tique (Bishop *et al.*, 2004).

Pour *B. microti*, le pourcentage d'acini infectés varie de 25 à 40%, dans une population de nymphes d'*I. dammini* ayant été infectées expérimentalement au stade larvaire. La proportion d'acini parasités chez les femelles adultes (infectées au stade nymphe) est bien inférieure : 0,1 à 0,9% (Piesman *et al.*, 1986).

Il est donc difficile d'estimer la quantité totale de sporozoïtes produits par une tique. De plus, la totalité des parasites n'est peut-être pas injectée lors du repas sanguin. La dose infectante (nombre de sporozoïtes nécessaires pour générer une infection chez le vertébré) n'est pas connue pour *Babesia spp.*.

La production des sporozoïtes chez une tique peut être influencée par l'âge de la tique (délai entre l'acquisition du parasite et sa retransmission). En effet, des nymphes infectées par *B. microti*, âgées de 30 semaines, sont capables, au cours d'un repas sanguin naturel, de produire des sporozoïtes mais apparemment en moins grande quantité et avec un retard par rapport aux nymphes âgées de 13 ou 22 semaines. Le parasite présent dans les nymphes du même lot, n'a plus la même sensibilité aux facteurs induisant la différenciation parasitaire : sous la simple stimulation d'une hausse de température, il reste à l'état de sporoblaste et ne produit plus de sporozoïtes (Lewengrub *et al.*, 1989). Pour *B. bovis* ou *B. ovis*, une perte d'infectivité, liée à l'âge des tiques (et donc potentiellement aussi celui du parasite), a également été rapportée par Friedhoff (cf. I.D.2.b) (Friedhoff, 1981). Au fil du temps, une baisse de la production de sporozoïtes, due à un vieillissement du parasite, bloqué au stade sporoblaste dans la glande salivaire inactive, est probable.

2. Caractères morphologiques des sporozoïtes

Les sporozoïtes des *Babesia* spp. *s.l.* ont une ultrastructure comparable, présentée sur la Figure 3.

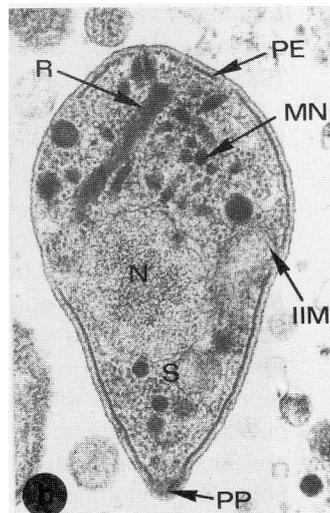


Figure 3 : Ultrastructure d'un sporozoïte de *Babesia* sp. observé au microscope électronique (grossissement : x 33 750)
(d'après Mehlhorn & Schein, 1984)

R : rhoptrie, PE : pellicule, MN : micronème, N : noyau, S : sporozoïte, IIM : interruption de la membrane interne, PP : pôle postérieur.

Les sporozoïtes sont piriformes, avec un apex large et un pôle postérieur en pointe. Ils sont entourés par une pellicule composée d'une membrane cellulaire extérieure et d'une couche interne osmiophile. Le cytoplasme contient un noyau et une mitochondrie, ainsi que des

microtubules. Les organites du complexe apical (micronèmes, rhoptries et anneau polaire), caractéristique des Apicomplexes, sont présents chez ce stade infectant.

Le Tableau 2 présente la taille des sporozoïtes de quelques espèces de *Babesia s.l.*, qui varie de 1 à 2,8 µm de longueur.

Les sporozoïtes de *Theileria* spp., qui ont globalement la même organisation cellulaire que celle des *Babesia* spp. *s.l.*, sont deux fois plus petits et sont entourés d'une pellicule plus simple (Mehlhorn & Schein, 1984).

B. Méthodes de production et d'isolement des sporozoïtes

Comme présenté ci-dessus, la différenciation du sporoblaste en sporozoïtes chez *Babesia* spp. *s.l.* a lieu sous l'influence du début du repas sanguin de la tique. Il est donc nécessaire, avant de procéder à l'isolement des sporozoïtes à partir des glandes salivaires de tique, de stimuler leur différenciation, soit par gorgement expérimental sur un hôte, soit en mimant les modifications liées à un repas sanguin (par exemple, incubation des tiques *I. dammini* à une température de 37°C pour la différenciation de *B. microti*, (Lewengrub *et al.*, 1989)).

Une fois la différenciation parasitaire activée, plusieurs méthodes simples ont été utilisées pour isoler les sporozoïtes et reproduire leur développement chez le vertébré (*in vivo* ou *in vitro*). Des adultes d'*I. dammini* infectées et pré-gorgées (4 jours sur lapin) ont été disséquées et leurs glandes salivaires isolées. Un broyat de ces glandes salivaires injecté à un hamster permet la transmission de *B. microti* à cet hôte vertébré (Piesman *et al.*, 1986). Pour des essais d'infection *in vitro* de globules rouges par les sporozoïtes de *B. bovis*, Mosqueda *et al.* ont utilisé des broyats de larves infectées, centrifugés à basse vitesse pour éliminer les cellules de tiques (Mosqueda *et al.*, 2002a; Mosqueda *et al.*, 2002b). L'utilisation d'un gradient de Percoll a permis d'obtenir à partir de nymphes infectées par *B. bigemina* des préparations pures de sporozoïtes viables. Ces parasites ont été utilisés pour des tests d'infections d'érythrocytes *in vitro* (Mosqueda *et al.*, 2004b).

Les techniques d'isolement des sporozoïtes de *Theileria* spp. sont plus développées que pour le genre *Babesia*. Des protocoles vaccinaux contre les theilérioses utilisent, depuis les années 1970, des parasites viables isolés à partir de tiques (Morrison & McKeever, 2006). Des doses maîtrisées de sporozoïtes, injectées simultanément avec de l'oxytétracycline, permettent un développement parasitaire de faible intensité et l'installation d'une immunité protectrice de longue durée. Différentes techniques sont utilisées pour purifier les sporozoïtes à partir des

glandes salivaires disséquées et broyées : une simple centrifugation (Marcotty *et al.*, 2003), un gradient de Percoll (Walker & McKellar, 1983), ou une purification sur colonne échangeuse d'ions (Madder *et al.*, 2003).

Les contraintes matérielles (vaccin à maintenir dans l'azote liquide jusqu'à administration) rendant l'utilisation de ces vaccins difficiles dans les zones d'endémie, des techniques de conservation des sporozoïtes ont été développées. La lyophilisation des sporozoïtes de *T. parva*, leur conservation et leur viabilité post-réhydratation ont été démontré par Marcotty *et al.*, rendant cette technique prometteuse pour tous les Apicomplexes (Marcotty *et al.*, 2003).

C. Caractérisation moléculaire des sporozoïtes

Les méthodes de production et d'isolement des sporozoïtes mises au point récemment chez *Babesia* spp. permettent maintenant d'étudier ces stades infectants d'un point de vue moléculaire. Comme vu précédemment, les sporozoïtes possèdent un complexe apical, ensemble d'organites nécessaires à l'invasion de la cellule-hôte et donc au développement de ces parasites intra-cellulaires obligatoires (Mehlhorn & Schein, 1984). L'expression de certaines protéines de ces organites telles que RAP1 (Rhoptrie Associated Protein) a été démontrée chez les sporozoïtes de *B. bovis* (Mosqueda *et al.*, 2002b) et *B. bigemina* (Mosqueda *et al.*, 2004b). D'autres protéines de surface caractéristiques du mérozoïte, MSA1 et MSA2 (Merozoite Surface Antigen 1 et 2) ont également été mises en évidence chez les sporozoïtes de *B. bovis* (Mosqueda *et al.*, 2002a; Mosqueda *et al.*, 2002b). L'existence chez *Babesia* spp. *s.s.* d'un panel moléculaire commun aux mérozoïtes et aux sporozoïtes n'est pas surprenante en raison de leur cible cellulaire commune, le globule rouge. Le rôle de ces protéines dans l'invasion de l'hématie par le sporozoïte a été confirmé par des tests d'inhibition d'invasion à l'aide d'anticorps monoclonaux (Mosqueda *et al.*, 2002a; Mosqueda *et al.*, 2002b; Mosqueda *et al.*, 2004b).

Le sporozoïte des *Babesia* spp. *s.s.* présente en effet de nombreux points communs avec le mérozoïte, ces deux formes parasitaires ayant la même cellule cible. La culture de *B. divergens in vitro* (multiplication des mérozoïtes) étant maîtrisée, il est probable qu'à partir de tiques infectées, l'isolement des sporozoïtes et leur mise en culture soit possible pour cette espèce, comme réalisé précédemment pour *B. bigemina* et *B. bovis* (Mosqueda *et al.*, 2002a; Mosqueda *et al.*, 2002b; Mosqueda *et al.*, 2004b).

Il existe peu de données sur le taux d'infection d'*I. ricinus* par *B. divergens* en conditions naturelles. Les seules données publiées sur la prévalence des tiques infectées par *Babesia* spp.

s.l. sont basées sur des détections d'ADN parasite, par PCR sur tiques entières (cf. Tableau 1). Or ces études ne reflètent que le statut infecté des tiques et non leur pouvoir infectant. Ces seules données ne permettent donc pas d'estimer une prévalence de tiques infectantes présentes sur le terrain. Il est donc nécessaire de détecter des sporozoïtes viables et infectants directement dans les glandes salivaires des tiques, pour confirmer le pouvoir infectant des tiques infectées. La probabilité de trouver des sporozoïtes de *B. divergens* dans des tiques prélevées sur le terrain semblant assez faible, la réalisation d'infections expérimentales contrôlées apparaît bien comme une nécessité pour étudier ces stades de transmission.

III. Les stades sexués : stades de transmission du vertébré au vecteur

Le passage du parasite de l'hôte vertébré au vecteur, ainsi que sa reproduction sexuée dans le vecteur, sont des phases essentielles et critiques du cycle de développement parasitaire. Très peu de données existent quant à cette étape pour *B. divergens*. En revanche de nombreuses études ont été faites sur un genre d'Apicomplexe proche, *Plasmodium*. Les connaissances acquises pour ces deux parasites sont présentées ici, suivant trois parties. La présence et la formation des stades transmissibles chez l'hôte vertébré, ainsi que les facteurs influençant cette partie du cycle parasitaire, sont d'abord détaillés. Puis la différenciation du parasite dans le vecteur et la phase sexuée de son développement sont rapportées. En lien avec toutes ces étapes, l'utilité et les modes d'obtention de marqueurs spécifiques sont présentés dans la dernière partie.

A. Le gamétocyte

Les Apicomplexes alternent entre des phases de développement asexué et une phase de reproduction sexuée, chez un ou plusieurs hôtes (Smith *et al.*, 2002). Même si la plupart des cycles complets de ces parasites d'importance médicale ou vétérinaire ont été élucidés, très peu de choses sont connues sur l'induction, le moment de l'engagement et les mécanismes moléculaires sous-jacents à la différenciation sexuée. Le gamétocyte est par définition le précurseur des gamètes. Cette cellule, responsable de la transmission parasitaire à l'hôte définitif, est présente à la fois chez l'hôte vertébré et chez le vecteur et fait le lien entre ces deux hôtes. La majorité des données disponibles sur les stades sexués des Apicomplexes le sont pour le genre *Plasmodium*, dont les gamétocytes sont visibles et facilement identifiables dans les globules rouges, que ce soit dans le sang d'un individu infecté ou bien en culture *in vitro*.

1. Le cas de *Plasmodium*

Au sein du genre *Plasmodium*, une partie des parasites se développant chez le vertébré subit une différenciation particulière dans les globules rouges : la gamétocytogenèse (Alano & Carter, 1990). Il existe pour ce processus des variations non négligeables entre espèces, notamment sur la vitesse de développement : *P. berghei* n'a besoin que de 24 à 26 heures pour la formation de ses gamétocytes, alors que pour *P. falciparum* environ 10 jours sont nécessaires (Alano, 2007). Malgré cela, les mécanismes de différenciation sont très conservés entre les espèces de *Plasmodium*, de même que les structures intra-cellulaires et de

nombreuses molécules impliquées dans la gamétocytogenèse. Toutes ces données concernant les stades de transmission, leur développement et les facteurs l'influençant dans le genre *Plasmodium* constituent donc une base comparative solide, surtout sur le plan moléculaire, pour l'étude d'autres Apicomplexes. La suite des données présentées sur les gamétocytes ne concerne que *P. falciparum*, agent responsable du paludisme humain, car il s'agit de l'espèce la plus connue et la plus proche phylogénétiquement de *B. divergens*.

a. Gamétocytogenèse et gamétocytes chez *P. falciparum*

Il est décrit que l'engagement de la population parasitaire vers la différenciation sexuée a lieu tôt dans le cycle de développement de *P. falciparum*, bien avant la différenciation morphologique des gamétocytes. En effet, tous les mérozoïtes provenant d'un même schizonte se développeront, après invasion de nouveaux globules rouges, vers les mêmes formes parasitaires : soit de nouveaux schizontes asexués, soit des gamétocytes mâles, soit des gamétocytes femelles (Alano, 2007).

Les gamétocytes commencent à se développer entre 7 à 15 jours après l'apparition des formes intra-érythrocytaires asexuées dans le sang.

La croissance et la différenciation des gamétocytes ont été divisées en 5 stades (I à V), représentés sur la Figure 4, A (Talman *et al.*, 2004).

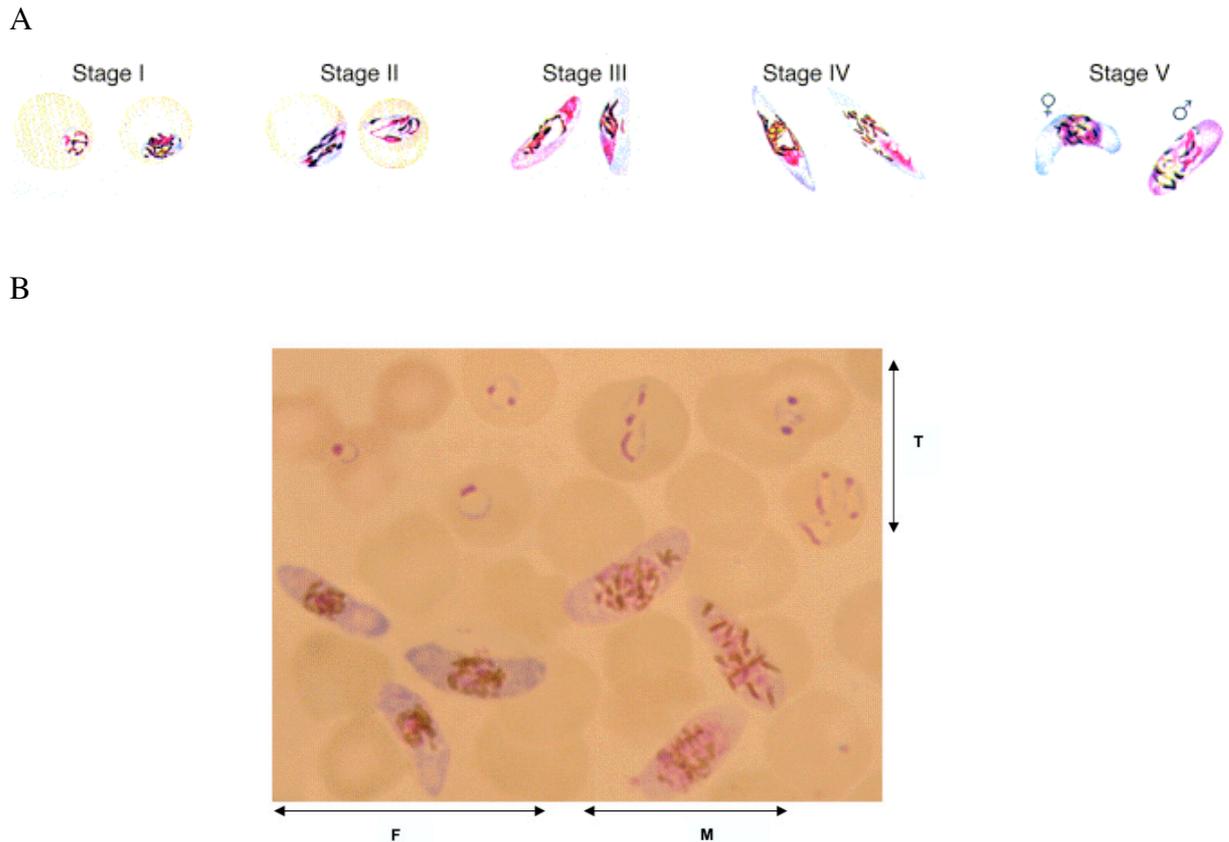


Figure 4 : Les gamétocytes de *P. falciparum*

A. Les 5 stades de gamétocytes de *P. falciparum* (d'après Lobo & Kumar, 1998).

B. Parasites (*P. falciparum*) visibles sur un étalement sanguin (d'après Talman *et al.*, 2004).
T : trophozoïtes, F : gamétocytes femelles, M : gamétocytes mâles.

Le stade I n'est pas différenciable de la forme trophozoïte. C'est à partir du stade II que l'on peut observer une différence morphologique : le parasite prend une forme de croissant ; au stade III le globule rouge hébergeant le parasite se trouve alors déformé et épouse la forme en croissant de celui-ci. Au stade IV, le parasite s'allonge pour finalement prendre une forme dite en « banane » au stade V.

A partir du stade III, les gamétocytes se différencient en 2 populations distinctes : les mâles et les femelles. Ces deux types sont facilement différenciables chez *P. falciparum* sur un étalement sanguin, avec une coloration de May Grünwald Giemsa (Figure 4, B) : les mâles présentent une coloration cytoplasmique rose et les femelles bleue (Talman *et al.*, 2004). Les gamétocytes femelles sont appelés macrogamétocytes, car ils ne donnent qu'un seul gros gamète femelle. Les mâles sont appelés microgamétocytes, car ils se divisent et donnent 8 gamètes mâles mobiles. Ces deux types de gamétocytes ont des fonctions et des devenir différents : le macrogamétocyte subira la méiose et servira à la croissance ultérieure du

zygote. Le microgamétoyte contient tout le matériel cellulaire nécessaire pour la réplication de l'ADN, la mitose et la production de gamètes mobiles (Khan *et al.*, 2005).

Les gamétoytes des stades I à IV sont séquestrés dans la moelle osseuse ou la rate, seuls les stades V sont circulants et deviennent infectants après 2 à 3 jours dans la circulation sanguine. La durée de vie de ces stades de transmission est assez courte : 2 à 6 jours (Talman *et al.*, 2004).

b. Facteurs induisant et influençant la gamétoctogénèse

La gamétoctogénèse repose tout d'abord sur des bases génétiques : il existe des différences entre les isolats dans leurs capacités à produire des gamétoytes, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Ces différences peuvent même être observées en fonction des lignées d'un même isolat, ou même des clones d'une même lignée (Dixon *et al.*, 2008). Il existe des phénotypes différents de production gamétoctaire : *in vitro* certaines souches sont totalement incapables d'en produire (ex : clone F12 de la souche 3D7) (Dyer & Day, 2000). Par ailleurs, après un an voire après seulement quelques semaines de culture *in vitro* dans des globules rouges, toutes les souches cessent de produire des gamétoytes (Talman *et al.*, 2004). Un passage régulier par le vecteur est souvent nécessaire pour entretenir la différenciation sexuée.

L'engagement de *Plasmodium* vers la différenciation sexuée ne repose pas seulement sur un déterminisme génétique. Toute forme de stress semble conduire la population parasitaire à s'orienter vers la reproduction sexuée (Dyer & Day, 2000). Des facteurs environnementaux ont été identifiés à la fois *in vitro* et *in vivo* comme favorisant la gamétoctogénèse de *Plasmodium* (Dyer & Day, 2000) et sont détaillés ci-dessous : la croissance asexuée et le contrôle de croissance autocrine parasitaire, les hormones et l'immunité de l'hôte, les médicaments anti-paludiques et la coinfection de l'hôte par plusieurs souches.

De manière générale, une forte parasitémie asexuée provoque une production élevée de gamétoytes (Alano & Carter, 1990). La dynamique de la population parasitaire est un facteur régulant aussi la production des stades sexués *in vitro*. En effet, lorsque la population parasitaire est en forte expansion (multiplication asexuée intense), peu de stades sexués sont produits. Mais quand la croissance globale est freinée, on note une augmentation de la production de gamétoytes, pouvant aller jusqu'à une proportion de schizontes donnant des gamétoytes multipliée par 70 (Lobo & Kumar, 1998).

La multiplication des parasites dans les globules rouges entraîne la lyse de ces derniers et donc le relargage dans le milieu d'un certain nombre de molécules de l'hôte qui semblent stimuler la gamétoctogénèse *in vitro* (Dyer & Day, 2000). Mais il existe sans doute des

facteurs libérés dans le milieu par le parasite lui-même qui influencent le développement sexué. Par ailleurs dans un milieu où le parasite se multiplie activement, le métabolisme général de tous les globules rouges est altéré, même celui de ceux qui sont non infectés, ce changement de métabolisme favorisant les divisions parasitaires asexuées. L'addition de globules rouges frais dans ces milieux saturés en formes asexuées favorise au contraire la gamétocytogenèse. De même, la présence de réticulocytes est un facteur augmentant le taux de gamétocytes *in vitro* (Trager *et al.*, 1999).

L'infection palustre peut avoir une influence sur le système endocrinien de l'individu infecté. En retour, les hormones de l'hôte agissent probablement sur le développement parasitaire. Ainsi l'insuline, la progestérone, l'oestradiol, la testostérone et les corticostéroïdes augmentent tous *in vitro* la conversion de la population parasitaire en gamétocytes (Dyer & Day, 2000).

Il est difficile d'évaluer les effets de la réponse immunitaire de manière absolue. *In vivo*, l'immunité de l'hôte vertébré fait baisser la charge parasitaire asexuée et donc la production potentielle de gamétocytes. Mais elle favorise aussi cette dernière en produisant un environnement défavorable au parasite (Alano & Carter, 1990). Le taux observé de gamétocytes est donc la résultante de ces deux phénomènes et peut varier suivant les situations.

Certains médicaments anti-paludiques (chloroquine, proguanil, association sulfadoxine et pyriméthamine) ont un effet favorable sur la production de gamétocytes. Au contraire, les traitements contenant de l'artémisinine ou ses dérivés ont des effets létaux sur les gamétocytes. Ces effets sont toutefois difficiles à évaluer *in vivo*, l'augmentation observée du taux de gamétocytes pouvant être directement liée à l'inhibition de la croissance asexuée ou à la redistribution précoce des gamétocytes immatures séquestrés dans la moelle osseuse sous l'action des xénobiotiques (Dyer & Day, 2000).

L'infection d'un même hôte par plusieurs souches d'une même espèce a des conséquences sur la dynamique des populations parasitaires, par le biais d'une supposée compétition entre les souches présentes. *In vivo*, la présence d'un second génotype fait baisser la densité de population du premier génotype et stimule sa transmissibilité (Dyer & Day, 2000). Par ailleurs, la production des stades de transmission dure plus longtemps chez un individu infecté par plusieurs souches (Babiker *et al.*, 2008). Les coinfections à plusieurs espèces de *Plasmodium* tendraient à agir de la même façon sur la dynamique de population parasitaire (Talman *et al.*, 2004).

Tous les résultats sur les facteurs inducteurs de la gamétocytogenèse sont néanmoins à prendre avec précaution, qu'ils aient été étudiés *in vivo* ou *in vitro*. Pour la plupart des observations *in vivo*, les témoins ad hoc ne peuvent pas toujours être réalisés pour des raisons éthiques ou logistiques. Les résultats s'avèrent donc difficiles à interpréter. Concernant les études *in vitro*, la production de gamétocytes dépend de la dynamique de la population parasitaire, il est donc difficile d'évaluer de manière absolue l'effet d'un paramètre, en s'affranchissant de l'historique de la culture. On peut néanmoins conclure, que lorsqu'il est en conditions défavorables (c'est-à-dire soumis au stress), le parasite oriente son développement plutôt vers la différenciation sexuée, avec une augmentation du nombre de gamétocytes produits, ce qui augmente ses capacités à être transmis rapidement. Par ailleurs, le maintien d'une parasitémie asexuée faible pendant une longue période permet la présence au long cours des cellules productrices des stades de transmission, et donc une période de transmissibilité accrue (Dyer & Day, 2000).

c. Expression génique chez les gamétocytes

Le fait que des signaux environnementaux influencent le développement parasitaire indique l'existence de mécanismes de signalisation entre le parasite et son milieu, qui agissent sur des voies menant au contrôle de l'expression génique (Dyer & Day, 2000). La régulation de l'expression génique au moment de la gamétocytogenèse, ainsi que les voies de transduction qui participent à ce phénomène, attirent particulièrement l'intérêt de la communauté scientifique.

La mise en évidence des voies de transduction activées ou réprimées au début de la gamétocytogenèse permettraient de pouvoir mieux étudier les facteurs déclenchant la différenciation sexuée et d'envisager ainsi un blocage de ce processus. Deux voies principales de transduction ont été mises en évidence comme étant impliquées dans la différenciation sexuée : la voie de l'AMPC et la voie activée par le phorbol-ester (Dixon *et al.*, 2008). Mais les connaissances sur ces événements de signalisation et leur implication dans la formation des gamétocytes restent incomplètes.

Une fois la cellule activée, la différenciation moléculaire du gamétocyte a lieu bien avant sa différenciation morphologique visible. Toutefois, il y a peu de protéines exprimées spécifiquement durant le début de la différenciation sexuée (40-48h) (Silvestrini *et al.*, 2005). Le transcriptome des gamétocytes jeunes est plus proche de celui des trophozoïtes asexués que de celui des gamétocytes matures (Silvestrini *et al.*, 2005). L'engagement de la population parasitaire vers la reproduction sexuée et la réponse aux stimuli extérieurs doivent donc reposer sur des molécules exprimées de manière constitutive dans les stades asexués.

Peu de marqueurs des gamétocytes jeunes, qui permettraient de mieux étudier les facteurs induisant la gamétocytogenèse, sont donc disponibles.

Dans la suite de leur développement, les gamétocytes expriment un répertoire important de protéines spécifiques dont les principales concernent les processus du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN, ainsi que le métabolisme énergétique (Florens *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2002). Quelques protéines de surface et des protéines sécrétées, impliquées dans les interactions parasitaires avec le milieu extra-cellulaire ou les cellules-cibles et qui présentent souvent des propriétés adhésives, sont aussi spécifiquement exprimées à ce stade (Lasonder *et al.*, 2002). De telles molécules constituent d'excellents marqueurs pour détecter ces formes parasitaires.

Les gamétocytes modifient leur métabolisme et leur expression génique, pour affiner les niveaux de protéines en fonction des besoins immédiats pour leur transformation mais aussi pour les besoins des stades ultérieurs dans le moustique (voir la revue générale de (Kooij & Matuschewski, 2007)). La régulation de l'expression génique se fait grâce à plusieurs mécanismes de contrôle : la régulation de la transcription par les activités différentielles des promoteurs géniques spécifiques de stades, l'inhibition de la traduction des ARNm dans le gamétocyte femelle par le système de l'ARN-hélicase DOZI jusqu'à la fécondation, le stockage de protéines et d'éventuelles modifications post-traductionnelles.

Enfin, en lien avec leurs fonctions ultérieures, les deux sexes de gamétocytes expriment un répertoire différent de gènes, comme démontré par Khan *et al.* par l'analyse de leur protéome respectif. Le gamétocyte femelle stocke notamment de nombreux transcrits et protéines sous forme inactive, qui ne seront utilisés que plus tard, au moment de la formation du zygote ou de l'ookinète. Le gamétocyte mâle produit des protéines nécessaires à la division et à la formation des 8 gamètes mobiles (protéines de réplication de l'ADN et de l'axonème majoritairement). Le gamétocyte mâle apparaît, en comparant les protéomes de tous les autres stades étudiés, comme la cellule la plus différenciée, exprimant la plus large gamme de protéines spécifiques (Khan *et al.*, 2005).

2. Le cas de *Babesia*

Les données disponibles sur la différenciation sexuée des *Babesia* spp. *s.l.* dans le vertébré sont très limitées. D'après Smith, la différenciation morphologique des stades sexués de *Babesia* ne se fait que chez le vecteur. C'est pourquoi le terme gamonte est parfois utilisé, au lieu de gamétocyte, pour nommer les stades de transmission du vertébré au vecteur chez *Babesia* spp. (Smith *et al.*, 2002).

Au cours des multiples cycles de mérogonie ayant lieu chez l'hôte vertébré, une partie des mérozoïtes pénétrant dans les globules rouges ne subit pas de division asexuée (Mehlhorn & Schein, 1984). Ces parasites, les gamétocytes, ne sont pas morphologiquement différenciables des trophozoïtes intra-érythrocytaires. Ils ne se développent pas et ne changent pas d'apparence, tant qu'ils ne sont pas ingérés par une tique (Mehlhorn & Schein, 1984). Cette absence de dimorphisme sexuel chez les gamétocytes de *Babesia* spp. rend l'étude de la différenciation sexuée difficile dans l'hôte vertébré.

Seule une étude de Mackenstedt *et al.* a montré l'existence des gamétocytes de *B. divergens* dans du sang de gerbille parasitée (G sur la Figure 5).

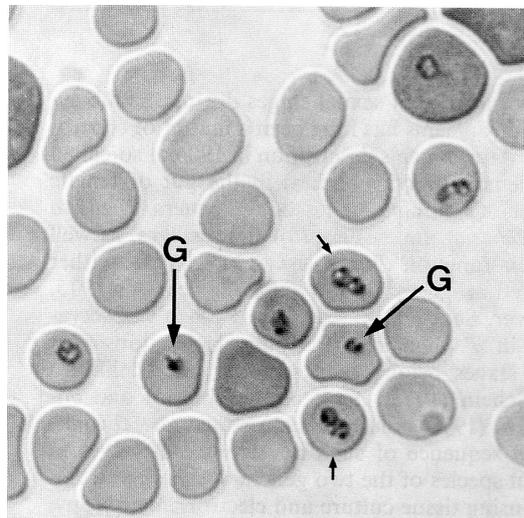


Figure 5 : Gamétocytes de *B. divergens* dans du sang de gerbille parasitée
(d'après Mackenstedt *et al.*, 1990)

Même si les gamétocytes existent bien chez *B. divergens*, en tant que stade responsable de la transmission, précurseur des gamètes et seule forme capable d'évoluer dans la tique, ce stade parasitaire n'est pas facilement identifiable dans le vertébré. Il semble quasiment impossible de distinguer morphologiquement, dans les globules rouges, ces stades sexués, des autres stades parasitaires présents chez le vertébré.

B. Développement du parasite chez le vecteur : émergence des gamètes et reproduction sexuée

Le passage de l'hôte vertébré au vecteur représente un changement radical pour la population parasitaire. Seule une partie de la population va survivre et poursuivre son développement dans l'arthropode et y réaliser sa reproduction sexuée.

1. Le cas de *Plasmodium*

a. Différenciation des gamétocytes en gamètes

Lors de son gorgement sur un individu parasité, le moustique ingère des globules rouges infectés. Seuls les gamétocytes sont capables de se développer dans ce nouvel environnement qu'est le tube digestif du moustique (Alano & Carter, 1990). Suite à leur ingestion, les parasites reçoivent de nombreux signaux indiquant le changement d'hôte (température et pH notamment). En 10 minutes, l'émergence des gamètes a lieu, le parasite devient extracellulaire. Pour cela, les gamétocytes mâles subissent en plus une réorganisation cytoplasmique : il y a réplication du génome et division du gamétocyte en 8 gamètes. Puis c'est le phénomène de l'exflagellation : les 8 gamètes flagellés sortent du globule rouge. La fécondation peut alors avoir lieu entre un macrogamète et un microgamète. Le zygote ainsi formé se différencie en 24h en ookinète avant de traverser l'épithélium digestif pour se loger sous la lame basale, où il se différencie en oocyste, installant ainsi avec succès l'infection dans le vecteur.

b. Facteurs influençant l'émergence des gamètes

L'arrivée dans le tube digestif du moustique constitue pour le parasite un changement de milieu radical, auquel il doit répondre rapidement pour survivre dans ce nouvel environnement et continuer son développement. Les principaux facteurs reconnus comme pouvant induire la gamétogenèse, ou émergence des gamètes, sont : la température, le pH, la concentration en CO₂ et des facteurs chimiques du moustique. Une baisse d'environ 5°C, ainsi qu'une hausse de pH de 7,2 à 8,1 correspondent toutes deux aux conditions physicochimiques du tube digestif du moustique et sont capables d'induire l'émergence des gamètes. La gamétogenèse est aussi favorisée par des molécules du vecteur (Alano & Carter, 1990). Le principal facteur du moustique, d'abord nommé GAF (gametocyte activating factor), a été identifié par Billker *et al.* en 1998 comme étant l'acide xanthurénique (Billker *et al.*, 1998).

L'émergence des gamètes a lieu normalement dans le tube digestif du moustique, mais il est possible de reproduire expérimentalement ce phénomène *in vitro* pour *Plasmodium*, en

appliquant aux gamétocytes les mêmes conditions physicochimiques que celles présentes dans le moustique. Une simple exposition à l'air peut même provoquer l'exflagellation spontanée des microgamètes (Alano & Carter, 1990). L'acide xanthurénique est aussi capable d'induire seul l'émergence des gamètes *in vitro*.

2. Le cas de *Babesia*

La phase sexuée des piroplasmes a été qualifiée par T. Smith de syzygie (Smith *et al.*, 2002). Cette caractéristique est définie comme le processus de rapprochement de 2 parasites (gamontes indifférenciés), soit en contact direct, soit à proximité, avant même la formation des gamètes et la fécondation.

a. Description du développement parasitaire dans le tube digestif de la tique

Les stades sexués du genre *Babesia* spp. s.s. ont été décrits pour la première fois et nommés « Strahlenkörper » il y a plus d'un siècle (1906) par Koch pour l'espèce *B. bigemina* et par Kleine pour *B. canis*. L'existence de ces stades sexués a longtemps été controversée.

Les descriptions plus précises faites chez *Theileria* spp. par Schein *et al.* en 1975 ont poussé les scientifiques à plus d'investigations concernant le genre *Babesia*, les « Strahlenkörper » de Koch (ou corps rayonnants, ou ray-bodies) ont été ainsi de nouveau mis en évidence en 1976 pour *B. bigemina* (Friedhoff & Buscher, 1976). L'existence de ces stades sexués a été confirmée au cours des années 1970-1980 par de nombreuses observations au microscope électronique dans des contenus digestifs de tiques gorgées (Weber & Friedhoff, 1977; Rudzinska *et al.*, 1979; Mehlhorn *et al.*, 1980; Rudzinska *et al.*, 1983). Pour *B. canis* et *B. microti*, il a été possible d'étudier la formation des stades sexués en l'absence de molécules de tiques, directement dans les érythrocytes (Rudzinska *et al.*, 1979; Mehlhorn *et al.*, 1981).

Grâce aux observations faites pour *B. bigemina*, *B. canis*, *B. microti* et *Theileria equi*, une description générale des stades sexués des *Babesia* et de leur développement peut être résumée comme ci-après (Mehlhorn & Schein, 1984). Toutes les formes parasitaires intra-érythrocytaires asexuées, piriformes dans la plupart des espèces, dégénèrent rapidement dans le tube digestif de la tique après ingestion du sang de l'hôte vertébré. Seuls les gamétocytes, de forme ovoïde, survivent et se développent, dans les 2 jours qui suivent le début du gorgement. Ils se transforment en corps rayonnants qui peuvent être sphériques, polymorphes ou pyramidaux, avec une taille variant de 4 à 7 µm. Ces corps rayonnants (Figure 6) peuvent être considérés comme les gamètes des *Babesia* spp. s.l.. Parfois sont aussi observés des

agglomérats de parasites avec des protrusions, qui peuvent être interprétés comme des formes de dégénérescence (Mehlhorn *et al.*, 1980).

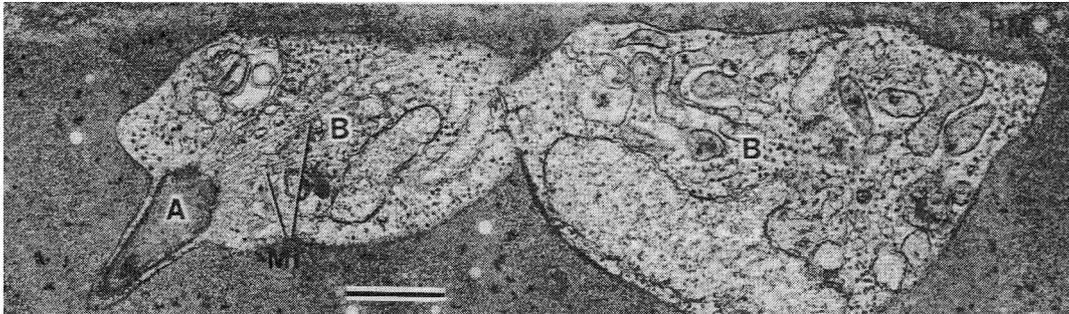


Figure 6 : Gamètes de *B. microti* dans le tube digestif d'*I. dammini*
(d'après Rudzinska *et al.*, 1983)

Deux gamètes de *B. microti* (B), en cours de fusion, sont présentés. Seul l'un des deux possède une épine apicale (A), d'où partent de nombreux microtubules (Mi). Barre : 0,5 μm .

Les corps rayonnants sont caractérisés par la présence à un pôle de la cellule d'une structure en épine (arrow-head) de 1 à 1,2 μm de long et d'environ 0,8 μm à la base. La fonction de cette épine reste inconnue. Une autre particularité de ces formes parasitaires est la présence de protrusions cytoplasmiques, sorte de fins flagelles rigides d'environ 3 μm de long soutenus par des microtubules, qui peuvent être observées à l'autre pôle de la cellule. Les corps rayonnants présentent un nombre variable de protrusions, aussi bien au sein d'une même espèce, qu'entre les différentes espèces de *Babesia* (2 à 10 protrusions chez *B. canis* (Mehlhorn *et al.*, 1980), nombre plus restreint chez *B. microti* (Rudzinska *et al.*, 1979) et *B. bigemina* (Weber & Friedhoff, 1977)). Ces protrusions sont uniquement composées de microtubules, recouverts par la membrane plasmique. Le nombre de microtubules dans une protrusion ne semble pas constant et leur arrangement n'est pas classique comme pour les flagelles. Finalement, des micropores ou un cytostome sont aussi fréquemment décrits chez ces stades parasitaires (*B. microti* (Rudzinska *et al.*, 1979) et *B. bigemina* (Weber & Friedhoff, 1977)). Ces structures ne sont observées que chez les stades parasitaires présents chez la tique et jamais chez les stades intra-érythrocytaires.

Les premières observations des stades sexués de *B. microti* avaient conduit à la conclusion que tous les gamètes étaient identiques (Rudzinska *et al.*, 1979). Mais des études en microscopie électronique ont permis de distinguer deux types de gamètes sur la base de leur densité cytoplasmique (Mehlhorn *et al.*, 1981; Rudzinska *et al.*, 1983). De plus, pour *B.*

microti, seule une partie des gamètes possède l'épine apicale (cf. Figure 6) (Rudzinska *et al.*, 1983). Ceci permet de conclure que la formation des gamètes chez *Babesia* est une anisogamie.

Après 2 à 4 jours de développement dans le tube digestif de la tique, les corps rayonnants sont souvent observés deux par deux, étroitement attachés l'un à l'autre (Mehlhorn *et al.*, 1981; Rudzinska *et al.*, 1983). Le plus fréquemment, des gamètes de deux types différents sont accolés. Les deux cytoplasmes peuvent être en contact, voire fusionnés, les deux noyaux se retrouvant dans la même cellule et entrant en contact. Il y a alors fécondation et formation du zygote.

Les auteurs de ces différentes études reconnaissent la difficulté de distinguer avec précision les différents types cellulaires dans une matrice complexe comme le tube digestif de tique. En outre il est difficile à partir de telles observations ponctuelles de déterminer la chronologie précise des événements et d'affirmer si deux cellules intimement liées sont en cours de fusion ou de fission.

Les stades de *B. divergens* se développant dans les tiques n'ont jamais été étudiés au microscope électronique. Une seule étude indique l'existence d'une reproduction et de stades sexués chez cette espèce (Mackenstedt *et al.*, 1990). Les formes parasitaires présentes dans des gerbilles infectées, puis dans des tiques, ont été observées au microscope optique et semblent correspondre à ce qui est décrit pour les autres espèces de *Babesia*. Des mesures des quantités d'ADN intra-cellulaire par fluorescence ont permis de mettre en évidence le doublement de la quantité d'ADN dans des formes identifiées dans la tique comme zygotes par rapport aux mérozoïtes, gamétocytes et gamètes (Figure 7), validant ainsi l'existence d'une reproduction sexuée chez *B. divergens*.

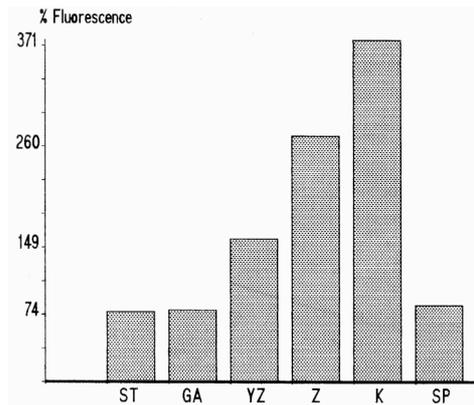


Figure 7 : Intensité moyenne de fluorescence représentant la quantité d'ADN des stades de développement de *B. divergens* dans la nymphe d'*I. ricinus*
(d'après Mackenstedt *et al.*, 1990)

ST : Strahlenkörper, GA : gamète ; YZ : zygote jeune ; Z : zygote ; K : kinète ; SP : sporozoïte.

D'autres travaux de l'équipe de Mackenstedt ont montré, par les mêmes méthodes, l'existence de différences de développement parasitaire entre *B. canis* et *B. bigemina*. Les mesures des quantités d'ADN contenues dans les différentes formes parasites indiquent que les gamétocytes de *B. bigemina* (contenant une quantité d'ADN plus importante), après leur ingestion par la tique, subissent une division supplémentaire avant la formation des gamètes. Les gamètes de *B. canis*, quant à eux, proviennent directement de la différenciation des gamétocytes, sans division supplémentaire (Mackenstedt *et al.*, 1995).

b. Induction de la différenciation morphologique des stades sexués *in vitro*

Les études réalisées dans les tiques ont été complétées par des analyses et des essais d'induction *in vitro* de la différenciation morphologique des stades sexués de *Babesia* spp. s.s., avec ou sans molécules de tiques.

Les stades sexués de *B. bovis* ont pu être observés *in vitro*, en présence de cellules de tiques (Droleskey *et al.*, 1983). Une culture monocouche de cellules de tiques (*B. microplus*) a été inoculée avec des globules rouges parasités (parasitémie à 8,5%) et incubée à 32°C. Après 24 h, deux types de formes parasites, ovoïdes (2 x 1,4 µm) et piriformes (3,3 x 1,3 µm), avec des protrusions cytoplasmiques, ont été observés. Ces formes ressemblent à celles identifiées *in vivo* chez les autres espèces de *Babesia* et sont donc assimilées aux gamètes de *B. bovis*.

Concernant *B. bigemina*, des observations en microscopie électronique, réalisées par Ribeiro et Patarroyo sur des parasites en culture dans des hématies ont permis de mettre en évidence des parasites présentant les mêmes caractéristiques morphologiques que les stades sexués décrits précédemment *in vivo* (Ribeiro & Patarroyo, 1998). De même, les études de Gough *et al.* ont montré qu'en présence de contenu digestif de tiques gorgées à réplétion, ces mêmes formes étaient retrouvées et qu'il était possible d'induire et de synchroniser de telles modifications parasitaires (Gough *et al.*, 1998). Comme pour les autres espèces de *Babesia*, le dimorphisme sexuel des formes parasitaires observées était évident (différence de densité cytoplasmique). Par contre l'absence d'épine apicale a été constatée. L'accolement des parasites, deux par deux, a été de nouveau observé lors de ces deux études *in vitro*, suivi par une fusion des cytoplasmes. Aucun développement n'a cependant été observé au-delà de ce stade dans les 2 études, et en particulier aucune fusion des noyaux n'a été mise en évidence. Gough *et al.* ont de plus observé la présence d'agrégats parasitaires et suggéré que cette phase d'adhésion pourrait représenter une multiplication et une division supplémentaires des stades sexués, avant leur fusion (Gough *et al.*, 1998).

Mosqueda *et al.* ont montré qu'en incubant une culture de *B. bigemina* à température ambiante, des stades sexués de cette espèce étaient induits *in vitro* et ceux-ci ont pu être séparés du reste de la culture par une centrifugation sur gradient de Percoll. Dans cette étude, la fécondation a été reproduite *in vitro*, la formation de zygotes ayant été rapportée. De plus, ces travaux ont validé le fait que l'ajout d'acide xanthurénique dans le milieu agit, *in vitro*, comme inducteur en synchronisant et augmentant la quantité de stades sexués produits naturellement lors du changement des conditions de culture (Mosqueda *et al.*, 2004a).

Toutes ces études montrent l'existence de formes parasitaires représentant les stades sexués de *Babesia* spp. *s.l.*. Ces stades sont observables dans le tube digestif des tiques, mais peuvent aussi apparaître *in vitro*, avec ou sans inducteur.

Bien que leur existence soit donc à présent admise par tous, l'identification des gamétocytes de *B. divergens* reste très difficile, notamment dans son hôte vertébré. Pour étudier la transmission de ce parasite et suivre son développement dans la tique, l'identification de marqueurs de ces stades de transmission s'avère donc nécessaire. Il est en effet très probable qu'il existe comme chez *Plasmodium*, des molécules exprimées spécifiquement par les stades sexués de *B. divergens* et qui constitueraient des marqueurs permettant de les détecter à la fois chez le bovin et chez la tique.

C. Les marqueurs des stades parasitaires sexués

Les progrès récents en matière de séquençage d'ADN ont permis de décoder les génomes d'une quinzaine d'Apicomplexes. Les études des génomes disponibles dans ce phylum et les comparaisons qui ont pu être faites entre les genres ont essayé de retracer l'histoire de l'évolution des Apicomplexes. Ces études ont aussi permis de montrer l'existence de caractères communs pour de nombreuses protéines de ces parasites, notamment la présence de domaines protéiques identifiés uniquement chez les Apicomplexes et les Métazoaires, leurs hôtes (Templeton *et al.*, 2004; Templeton, 2007).

Pour étudier la transmission des parasites de l'hôte vertébré au vecteur, que ce soit de manière qualitative ou quantitative, des marqueurs spécifiques des stades de transmission sont nécessaires. Il existe peu d'études sur les stades transmissibles des Apicomplexes en général. Comme mentionné précédemment, les principales données biologiques concernent *P. falciparum*, dont le génome est entièrement séquencé. La comparaison moléculaire entre ce parasite et *B. divergens* peut donc permettre d'identifier des protéines, pouvant servir de marqueurs des stades sexués.

1. Protéines spécifiques des stades sexués et présents chez le vecteur, connues chez *Plasmodium*

a. Principales protéines connues chez *P. falciparum*

Dans l'espoir de contrôler l'endémie palustre et d'empêcher de nouvelles infections, de nombreuses études ont été menées chez *Plasmodium* spp. sur les stades de transmission, afin de trouver un moyen de bloquer le cycle parasitaire entre l'hôte vertébré et le moustique (Pradel, 2007). Le but est de produire des vaccins, capables de limiter ou bloquer la transmission, en éliminant les formes responsables du passage d'un hôte à l'autre. Ce type de vaccins repose donc sur la mise en évidence de protéines exprimées spécifiquement chez les stades parasitaires présents chez le vecteur ou présents à la fois chez le vertébré et chez le vecteur. Les anticorps, induits par une telle vaccination, peuvent agir, soit directement dans la circulation sanguine de l'hôte, pour bloquer les formes infectantes avant leur ingestion par un vecteur, soit dans le tube digestif du moustique une fois les stades sexués formés.

Les premières études concernant les vaccins bloquant la transmission étaient basées sur des caractéristiques parasitaires facilement accessibles : isolement des stades parasitaires d'intérêt, analyses de leurs principales protéines immunodominantes, production d'anticorps contre ces protéines purifiées. Ce type d'analyses a permis de sélectionner bon nombre de

candidats vaccins, sans que la fonction de la protéine ne soit connue. Le blocage effectif de la transmission par des anticorps dirigés contre ces protéines a été validé par des essais expérimentaux pour plusieurs d'entre elles.

Le séquençage complet du génome de *P. falciparum* en 2002 (Gardner *et al.*, 2002) et les études menées en parallèles sur le transcriptome (Bozdech *et al.*, 2003) et le protéome de ce parasite (Florens *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2002) ont permis une meilleure annotation du génome et un accès à des données plus riches et variées que la simple séquence nucléotidique. La quantité de données générées et disponibles a permis un essor fantastique pour la recherche et l'identification de nouvelles protéines, spécifiques d'un stade ou d'une fonction (Kooij *et al.*, 2006). Les principaux stades parasitaires accessibles et pouvant être purifiés facilement ont été étudiés (stades asexués intra-érythrocytaires, gamétocyte, ookinète, oocyste, sporozoïte), permettant une première approche de l'expression différentielle des gènes en fonction des stades parasitaires. Ceci a permis de mieux définir les fonctions potentielles de protéines hypothétiques suivant les stades auxquels elles ont pu être mises en évidence (Hall *et al.*, 2005). Si la majorité des protéines parasitaires sont exprimées par tous les stades, on peut considérer, en extrapolant à partir de toutes les études, que 5% des gènes ont une expression vraiment spécifique des stades sexués (Kooij & Matuschewski, 2007).

Grâce à ces analyses, diverses protéines intra-cellulaires, telles que des kinases ou des protéases, ont ainsi pu être identifiées comme étant spécifiques des stades sexués. Ces protéines, impliquées dans la signalisation, la régulation et les mécanismes essentiels au développement parasitaire, sont de potentielles cibles pour des vaccins ou des médicaments bloquant la transmission (Pradel, 2007). Les principales protéines spécifiques des stades sexués de *P. falciparum* sont présentées dans la Figure 8.

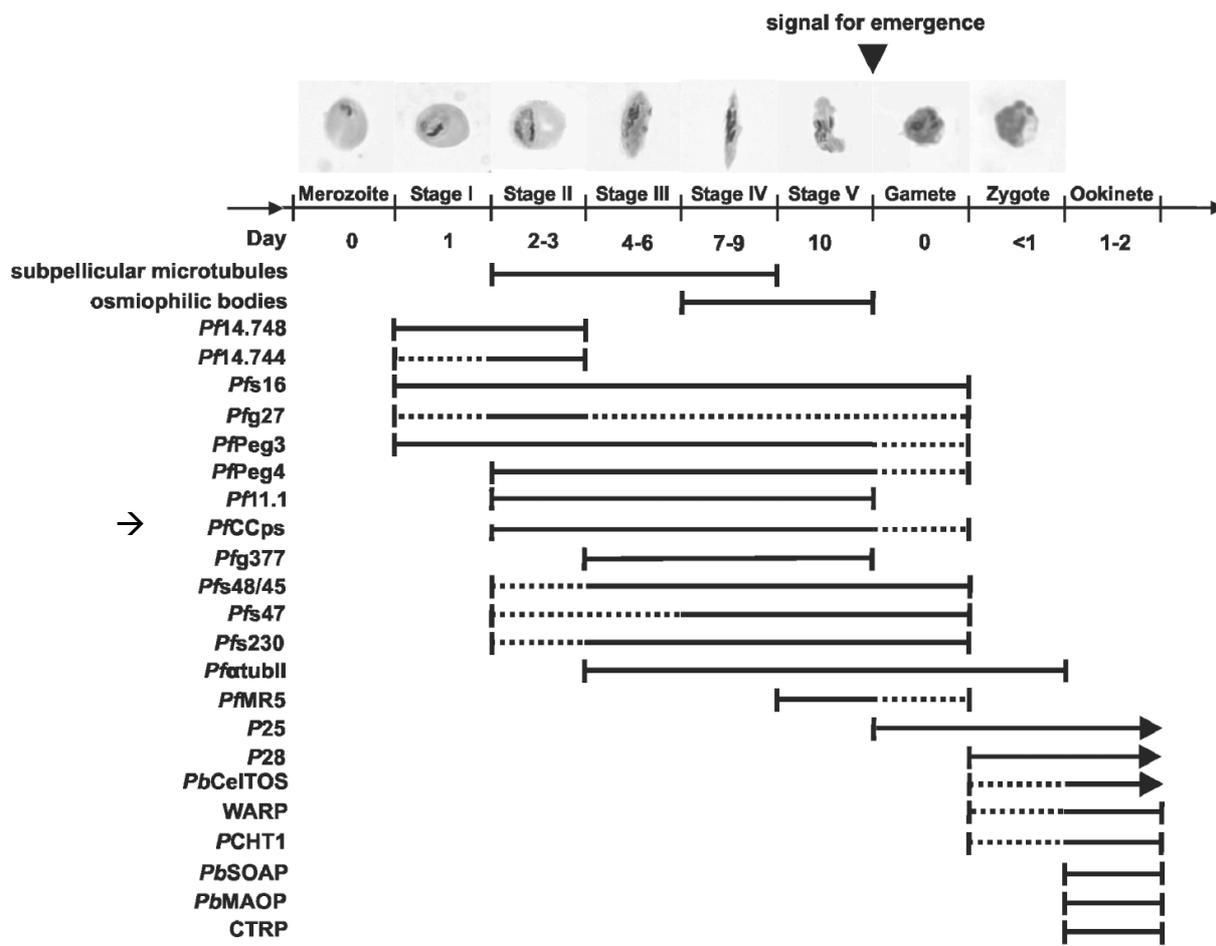


Figure 8 : Stades d'expression des protéines de *P. falciparum* spécifiques des stades sexuels et de ceux présents chez le vecteur

(d'après Pradel, 2007)

Pour identifier des marqueurs des stades sexuels de *B. divergens*, l'intérêt s'est porté plus particulièrement sur les PfCCp (flèche sur la Figure 8), à cause des caractéristiques de ces protéines (expression spécifique des stades sexuels, conservation au sein des Apicomplexes, présence de domaines protéiques adhésifs et d'un peptide signal,) qui vont être présentées maintenant.

b. La famille Ccp

Parmi les protéines spécifiques des stades sexuels identifiées grâce aux analyses bioinformatiques, on trouve la famille CCp. Les 6 membres de cette famille (CCp1 à 5 et FNPA) sont conservés parmi différentes espèces de *Plasmodium*, notamment *P. yoelii*, *P. chabaudi* et *P. knowlesi*, mais aussi au sein du phylum des Apicomplexes.

α. Les protéines et leurs domaines

La famille CCp a été initialement identifiée chez *Plasmodium* lors de la recherche de gènes codant des protéines comportant des domaines adhésifs (Delrieu *et al.*, 2002), ou étant impliquées dans les interactions avec le système immunitaire (Claudianos *et al.*, 2002).

Cette famille est définie par la présence d'un motif protéique adhésif particulier : le domaine LCCL (*Limulus* Clotting factor C, cochlear protein Coch-5b2 et late gestation lung protein Lg11). Ce domaine, présent dans le facteur C de coagulation de la limule, a conféré son nom à la famille : CCp (Pradel *et al.*, 2004). A l'exception de FNPA (FibroNectin type 2, anthrax toxin Protective Antigen), toutes les protéines de cette famille (CCp1 à 5) contiennent au moins un motif LCCL (Figure 9). Les domaines qui composent FNPA ne diffèrent de ceux de CCp5 que par l'absence du motif LCCL. Ceci laisse supposer que ces deux gènes pourraient être des paralogues qui ont évolué ensuite différemment et FNPA a donc été rattachée à la famille CCp. Ces protéines possèdent toutes un peptide signal, laissant supposer qu'elles sont secrétées ou transmembranaires (Pradel *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2004).

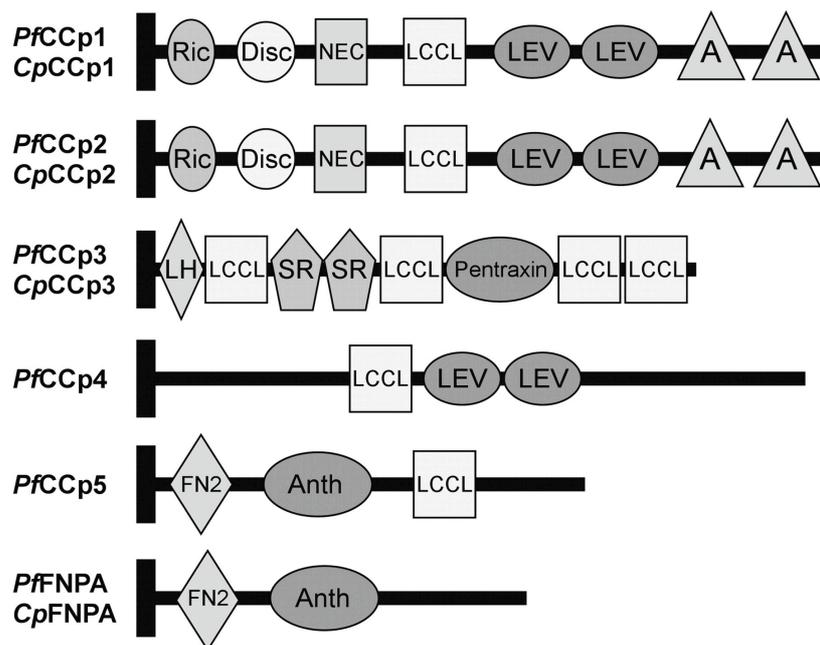


Figure 9 : Représentation graphique de l'organisation des domaines protéiques de la famille CCp pour *P. falciparum* et *C. parvum*
(d'après Pradel *et al.*, 2004)

Ric : domaine Ricin ; Dis : domaine Discoidin ; NEC : domaines neurexins and collagens; LCCL : domaine *Limulus* Clotting factor C, cochlear protein Coch-5b2 et late gestation lung protein Lg11; LEV : domaine levanase ; A : domaine ApicA ; LH : domaine lipoxygénase ; SR : domaine Scavenger Receptor Cystein Rich; FN2 : domaine fibronectin type II ; Ant : domaine anthrax toxin Protective Antigen.

Le domaine LCCL est un motif protéique identifié pour la première fois chez les Métazoaires. Il n'a jamais été mis en évidence chez d'autres Protozoaires que les Apicomplexes. Un transfert latéral de gènes de l'hôte à ces parasites durant l'évolution peut être une façon d'expliquer la présence de ce domaine particulier chez les Apicomplexes (Dessens *et al.*, 2004). Le domaine LCCL compte environ 100 acides aminés, dont 4 cystéines toujours présentes, formant deux ponts di-sulfure. La structure tridimensionnelle de ce motif protéique, représentée sur la Figure 10, est constituée d'une hélice α entourée par deux feuillets β (Liepinsh *et al.*, 2001). Ce domaine présente une grande conservation de séquence chez les Métazoaires, tandis qu'il est beaucoup plus variable chez les Apicomplexes (Dessens *et al.*, 2004). Les rôles supposés de ce domaine, qui est majoritairement retrouvé dans des protéines extra-cellulaires, sont les interactions avec un ligand, en particulier ceux de la matrice extra-cellulaire.

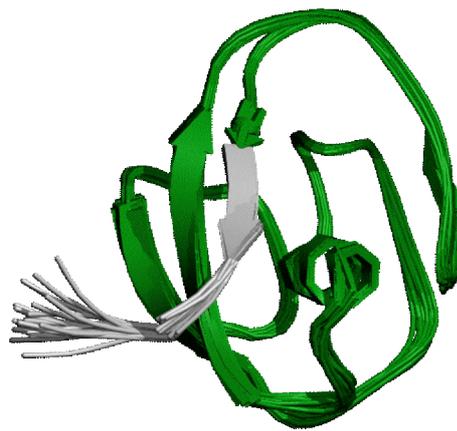


Figure 10 : Structure tridimensionnelle du domaine LCCL

(d'après Pfam, <http://pfam.sanger.ac.uk/>)

Les protéines de la famille CCp contiennent plusieurs autres domaines protéiques (cf. Figure 9), existant principalement chez les Métazoaires et ayant des implications dans des interactions avec des ligands (polysaccharides), dans les phénomènes immunitaires ou de coagulation (Dessens *et al.*, 2004).

β. Expression des différentes protéines de la famille CCp

L'expression des protéines de cette famille a été étudiée pour deux espèces : *P. berghei* et *P. falciparum*. Les méthodes d'analyse et les résultats n'étant pas toujours en accord, les deux espèces sont détaillées de manière indépendante dans les paragraphes suivants.

Pour *P. berghei*, les travaux ont débuté par l'étude de PbCCp3, parfois nommée PbSR (Claudianos *et al.*, 2002) ou PbLAP1 (Trueman *et al.*, 2004). Les différentes études publiées ne semblent pas concorder pour déterminer précisément les stades d'expression de cette protéine. Les études de Claudianos *et al.* avaient mis en évidence par RT-PCR la présence de l'ARNm de *ccp3* chez tous les stades étudiés (stades asexués intra-érythrocytaires, gamétocytes, ookinète, oocyste et sporozoïte). La recherche de la protéine par IFI a montré la présence de PbCCp3 dans les sporozoïtes uniquement (Claudianos *et al.*, 2002).

La famille entière de protéines a ensuite été étudiée par analyse protéomique, par l'équipe de Trueman. Cette fois, des peptides correspondant à PbCCp3 ont été détectés à tous les stades parasitaires étudiés (stades asexués, gamétocyte, gamète, ookinète, oocyste, sporozoïte). L'expression des autres membres de la famille (CCp1, 2, 5 et FNPA) a toutefois été trouvée comme spécifique des stades sexués et issus de la fécondation (gamétocytes, gamètes, ookinète, oocyste), sauf PbCCp4 qui a été détectée chez les sporozoïtes uniquement (Trueman *et al.*, 2004).

Par la suite, une autre étude sur PbCCp3 a montré, à l'aide de parasites mutants exprimant la protéine fonctionnelle marquée à la GFP, qu'elle est exprimée seulement par les gamétocytes femelles. Elle est sécrétée à l'émergence des gamètes, sa présence est toujours détectée dans le zygote et l'ookinète, et finalement sa disparition se produit progressivement lors de la transformation en oocyste. PbCCp3 se retrouve dans les corps cristalloïdes de l'ookinète et est impliquée dans la formation de ces organites (Carter *et al.*, 2008).

Enfin, l'analyse de la transcription de tous les gènes de la famille par RT-PCR quantitative en temps réel pour différents stades parasitaires (stades asexués intra-érythrocytaires, gamétocytes, ookinète, oocyste et sporozoïte) a été réalisée par Lavazec *et al.*. Leurs travaux ont montré des niveaux d'ARNm identiques pour tous les membres de la famille : majoritaires dans les gamétocytes et plus faible dans les oocystes. L'étude des promoteurs des gènes *ccp1* à *ccp4* a également confirmé la production exclusive des protéines correspondantes au stade gamétocyte (Lavazec *et al.*, 2009).

L'utilisation par les différentes équipes de méthodes de détection différentes, directes ou indirectes et ayant notamment des seuils de sensibilité différents, pourrait expliquer les divergences entre les résultats obtenus. En analysant tous les résultats, en particulier ceux de Carter *et al.* et de Lavazec *et al.*, qui utilisent des méthodes de détection directe de la protéine entière, il est possible de considérer que PbCCp3, et les autres protéines de la famille, sont majoritairement exprimées au stade gamétocyte chez *P. berghei*.

Pour *P. falciparum*, les études se sont focalisées principalement sur 3 des protéines de la famille CCp : PfCCp1, 2 et 3. Le gène *pfccp3* (ou *pslap*) a été d'abord découvert seul (Delrieu *et al.*, 2002). La protéine, avec ses domaines si particuliers, a été mise en évidence par IFI sur des parasites en culture, uniquement dans les gamétocytes (stades III et plus), dans des vésicules subpelliculaires. Par la suite l'équipe de Pradel a étudié tous les membres de la famille et plus précisément PfCCp1, 2 et 3 sur le plan fonctionnel (Pradel *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2006; Scholz *et al.*, 2008). Ces 3 protéines sont exprimées dans les gamétocytes (stades III et plus) à la fois mâles et femelles, à la surface des parasites, associées à la membrane de la vacuole parasitophore (Pradel *et al.*, 2004). Puis au moment de l'émergence des gamètes, elles sont sécrétées et restent associées à ces derniers. Les protéines sont encore détectées dans le zygote, mais très faiblement, leur expression cessant au moment de la gamétogenèse. Aucun signal d'expression n'a été mis en évidence pour les stades se développant à la suite du zygote (ookinète, oocyste, sporozoïte). Une autre étude de cette équipe concernant les 6 protéines de la famille, utilisant les anticorps spécifiques dirigés contre celles-ci et des marqueurs du sexe des gamétocytes, a montré une expression plus importante de toutes les protéines par les gamétocytes femelles par rapport aux mâles et surtout un arrêt de l'expression lors de l'émergence des microgamètes (Scholz *et al.*, 2008). Pourtant en présence de sérum humain et d'anticorps spécifiques dirigés contre ces protéines, un blocage de l'exflagellation des gamètes mâles médié par le complément a été observé.

L'étude conjointe des protéines CCp1 à 3 a montré une colocalisation et une expression co-dépendante (Pradel *et al.*, 2006). Ceci laisse penser que ces trois protéines forment un complexe et agissent de façon dépendante les unes des autres.

En résumé, les protéines de la famille CCp sont clairement exprimées chez les stades sexuels de *P. falciparum*, cela semble être aussi le cas pour *P. berghei*. L'expression des 3 protéines les plus étudiées (CCp1 à 3) a lieu majoritairement chez les gamétocytes (femelles plus particulièrement).

γ. Fonction des protéines de la famille CCp

Les premières hypothèses sur le rôle des protéines de la famille CCp ont été fondées sur la présence remarquable et intéressante des nombreux domaines adhésifs (Claudianos *et al.*, 2002; Delrieu *et al.*, 2002; Pradel *et al.*, 2004). Un rôle dans les interactions avec le milieu extra-cellulaire, en tant que ligand avec des molécules de l'hôte a été supposé. Ces protéines pourraient intervenir dans l'évasion ou la protection contre l'immunité du vertébré ou de l'arthropode, et avoir ainsi un rôle immuno-modulateur (Dessens *et al.*, 2004).

Pour étudier plus précisément les fonctions de ces protéines, des lignées parasitaires ont été modifiées génétiquement, afin d'inactiver les gènes correspondants chez *P. berghei* et *P. falciparum*.

Chez *P. berghei*, lorsque les gènes *pbccp3* (Claudianos *et al.*, 2002), *pbccp1*, 2 ou 4 (Raine *et al.*, 2007) ou *pbfnpa* (Ecker *et al.*, 2008) sont inactivés, les lignées parasitaires KO présentent toutes le même phénotype. Les stades intra-érythrocytaires asexués, les gamétocytes, les gamètes, le zygote et l'ookinète se développent de façon comparable à une lignée sauvage. Dans des moustiques infectés par ces lignées mutantes, les oocystes sont produits en nombre comparable au type parasite sauvage, mais dégèrent et sont incapables de former des sporozoïtes. L'inactivation de *pbccp5* a été réalisée mais le phénotype parasite correspondant n'a pas été étudié car les parasites de la lignée mutante générée n'ont pas pu être clonés (Ecker *et al.*, 2008).

Par ailleurs, divers croisements entre ces lignées mutantes et avec d'autres lignées ne produisant des gamétocytes que d'un seul sexe (femelle ou mâle, par inactivation des gènes *pbs48/45* ou *pbs47* respectivement) ont été réalisés (Raine *et al.*, 2007). Cela a permis de déterminer que, pour un développement parasite normal, l'apport de ces protéines doit se faire impérativement par le gamétocyte femelle.

Ces protéines étant exprimées au même stade (et de manière co-dépendante chez *P. falciparum* (Pradel *et al.*, 2006)), il est probable qu'elles aient des fonctions redondantes, ce qui expliquerait le phénotype normal des gamétocytes mutants générés précédemment. Des lignées mutantes, dont 2 gènes de la famille étaient inactivés (*ccp1+3* et *ccp1+4*), ont été créées pour vérifier cette hypothèse (Lavazec *et al.*, 2009). Les phénotypes observés pour ces doubles mutants sont identiques à ceux observés auparavant : malgré un nombre équivalent d'oocystes, leur développement et la formation des sporozoïtes sont bloqués, alors que tous les stades précédents sont normaux.

Chez *P. falciparum*, les gènes *pfccp2* et *3* ont été inactivés : les sporozoïtes sont non fonctionnels et incapables d'atteindre les glandes salivaires (Pradel *et al.*, 2004). Comme pour *P. berghei*, la transmission est bloquée chez ces mutants. Une lignée mutante a aussi été créée en inactivant le gène *pfccp4*, mais le phénotype observé alors est normal quel que soit le stade étudié (Scholz *et al.*, 2008). PfCCp4 ne semble donc pas essentielle au développement parasitaire de *P. falciparum* dans son vecteur.

L'impact de l'inactivation des gènes *ccp* chez *P. berghei* et *P. falciparum* ne se fait pas sentir chez le stade principal d'expression des protéines (gamétocytes), mais plus tard, chez les sporozoïtes. Le délai important (8 jours) existant entre le moment de l'expression de ces protéines et le moment où ces protéines font défaut chez les mutants KO, complique la validation du rôle précis de ces protéines. Ainsi, la simple analyse phénotypique des mutants KO n'a pas permis de préciser la fonction exacte des différentes protéines de cette famille chez *Plasmodium*.

Dans leurs expériences sur *P. berghei*, Trueman *et al.* ont montré qu'en cas de coinfection d'un moustique par des ookinètes de type sauvage et des ookinètes mutants (PbCCp3 KO), l'absence de la protéine CCp3 n'est pas compensée par la présence de celle synthétisée par les parasites de type sauvage : les mutants dégèrent et ne sont pas transmis (Trueman *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent que cette protéine, si elle joue un rôle dans les défenses contre les molécules du moustique, doit se lier à des molécules du vecteur pénétrant et agissant dans l'oocyste.

Les expériences de Carter appréhendent l'implication de PbCCp3 dans le moustique de manière différente (Carter *et al.*, 2008). Pour la première fois les mutants KO ont été cultivés *in vitro* au-delà de la fécondation : en l'absence de molécules du vecteur, la lignée parasitaire mutante retrouve sa fonctionnalité et est capable de former des sporozoïtes. De plus, la localisation de PbCCp3 dans les corps cristalloïdes et la nécessité de la présence de la protéine pour la formation de ces organites de l'ookinète ont été mises en évidence pour la première fois. La protéine pourrait être stockée dans les corps cristalloïdes jusqu'à son utilisation dans l'oocyste. Elle pourrait alors agir pour favoriser le développement parasitaire, soit comme ligand capteur de facteurs du moustique nécessaires, soit comme inhibiteur de molécules du moustique qui au contraire empêchent ce développement, ou bien encore comme molécule permettant le stockage de facteurs humains indispensables.

Une autre hypothèse a été soulevée suite aux différentes expériences sur *P. berghei* (Raine *et al.*, 2007; Lavazec *et al.*, 2009). Les oocystes dont les gènes *ccp* ont été inactivés,

incapables de produire des sporozoïtes, sont de taille augmentée et semblent dégénérer : ils apparaissent vacuolisés. Cette apparence suggère un problème de régulation du cycle cellulaire et des relations noyau/cytoplasme qui contrôlent la cytodivision. Il est possible que les CCp aient un rôle pendant la fécondation et la formation du zygote, par exemple dans des processus liés à la réplication du génome pendant et après la méiose. L'absence de ces protéines n'engendrerait donc des troubles que lors de la méiose et des divisions nucléaires, avec des conséquences visibles uniquement au niveau de l'oocyste lors de la formation des sporozoïtes.

Les études menées par Scholz *et al.* chez *P. falciparum* indiquent d'autre part un rôle potentiel de cette famille de protéines au moment de la gamétogénèse. Même si les protéines ne sont pas retrouvées de manière prédominante dans les gamétocytes mâles, elles pourraient agir chez *P. falciparum* comme ligands permettant le rapprochement des gamètes lors de la fécondation (Scholz *et al.*, 2008).

δ. Orthologues connus chez les Apicomplexes

Par analyse bioinformatique, des orthologues de cette famille de protéines découverte chez *Plasmodium*, ont été mis en évidence dans les génomes d'autres genres d'Apicomplexes, comme *Theileria*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* ou *Eimeria* (Claudianos *et al.*, 2002; Pradel *et al.*, 2004; Tosini *et al.*, 2006). Mais très peu d'études fonctionnelles ont été réalisées chez les autres Apicomplexes, pour confirmer réellement l'existence de ces orthologues.

Seule une étude montre l'existence et étudie la fonction d'une protéine de cette famille chez *C. parvum*, Cpa135, qui contient les mêmes domaines protéiques que ceux de CCp1 & 2 chez *Plasmodium* (Tosini *et al.*, 2004). La protéine (135kDa), qui fait partie d'un complexe de plus haut poids moléculaire (200kDa), est présente durant quasiment tout le développement parasitaire, mais c'est vraiment durant la phase oocyste-sporozoïte qu'elle est activement synthétisée (accumulation dans le complexe apical du sporozoïte, dans les micronèmes probablement). Après l'invasion de l'entérocyte, la protéine reste associée à la vacuole parasitophore. Il semble probable que Cpa135 soit impliquée dans l'attachement et l'invasion de la cellule-hôte.

Cette protéine de *C. parvum*, CpCCp1, n'est apparemment pas spécifique des stades sexuels de ce parasite. Mais les cycles de développement étant très différents entre tous les Apicomplexes, les fonctions des protéines conservées peuvent sans doute varier. Toutefois, la

forte conservation des domaines existant entre CpCCp1 et les orthologues des autres genres indique sans doute un rôle crucial de cette famille de protéines dans les interactions protéiques avec les matrices extra-cellulaires ou avec des ligands de l'hôte (Tosini *et al.*, 2006).

En conclusion, la famille CCp n'a été vraiment étudiée que dans le genre *Plasmodium*, sans que son rôle exact puisse être précisé, mais elle semble exister chez de nombreux Apicomplexes. L'expression préférentielle de ces protéines chez les stades sexués en fait des cibles d'intérêt pour produire des marqueurs des parasites dans le vecteur. En outre, la complexité apparente du rôle de ces protéines est particulièrement intrigante ; l'étude de ces protéines dans un autre genre d'Apicomplexes pourrait aider à trouver les fonctions essentielles soutenues par leurs domaines, si l'on suppose qu'à une architecture protéique conservée correspondent des fonctions similaires chez les différentes espèces.

2. Marqueurs des stades sexués de *Babesia*

Il existe peu d'études sur les stades sexués de *Babesia* spp. *s.l.* (cf. III.B.2.b). Les travaux réalisés ont surtout été des observations systématiques de la morphologie des parasites visibles dans différentes conditions, en général dans les tiques et peu de recherches sur les marqueurs de stades sexués, qui permettraient d'identifier avec certitude ces stades, ont été réalisées.

Jusqu'à maintenant, seule l'équipe de Mosqueda *et al.* a produit des anticorps marqueurs de stades sexués de *Babesia*. Dans l'étude de l'induction des stades sexués de *B. bigemina* par l'acide xanthurénique, des anticorps contre les stades sexués de *B. bigemina* ont été générés par l'immunisation de deux lapins avec les stades parasitaires produits expérimentalement et purifiés par gradient de Percoll (Mosqueda *et al.*, 2004a). Les sérums produits ne sont pas dirigés contre une protéine en particulier. Ces sérums reconnaissent bien uniquement les stades sexués (produits expérimentalement *in vitro*), ainsi que les stades sexués présents naturellement dans le tube digestif de tiques infectées. Aucune réaction n'a été observée sur les stades parasitaires asexués ou sur le contenu digestif de tiques non-infectées. Toutefois, les investigations n'ont pas été poussées plus loin et ces marqueurs n'ont pour le moment jamais servi à étudier les stades de transmission de *B. bigemina*.

La méthode d'induction et de purification des stades sexués mise au point lors de l'étude précédente, a servi à Vichido *et al.* pour mettre en évidence l'expression des protéines RAP1 et HSP-20 chez les stades sexués de *B. bigemina* (Vichido *et al.*, 2008). Ces protéines sont

cependant exprimées chez tous les stades étudiés du parasite et ne peuvent donc constituer des marqueurs spécifiques.

Malgré la production d'un sérum spécifique des stades sexués de *B. bigemina* (Mosqueda *et al.*, 2004a) aucun marqueur moléculaire n'est donc disponible pour reconnaître les stades sexués de *Babesia*, quelle que soit l'espèce. L'identification de marqueurs des stades sexués de *B. divergens* apparaît donc essentielle pour pouvoir étudier plus finement le passage du parasite de l'hôte vertébré à la tique et caractériser les facteurs dirigeant et influençant la transmission. Au vu des connaissances disponibles sur les Apicomplexes, et sur *Plasmodium* spp. en particulier, les protéines de la famille CCp, fortement conservées dans le phylum, semblent être des cibles de choix pour l'identification de marqueurs et la caractérisation des stades sexués de *B. divergens*.

Objectifs de la thèse

Le but de cette thèse est d'étudier la transmission de *B. divergens* par *I. ricinus* et plus particulièrement de caractériser les stades responsables de la transmission, sporozoïte et gamétocyte.

Les publications traitant des sporozoïtes des *Babesia* et *Theileria* spp. indiquent que de très grandes quantités de parasites sont formés dans les glandes salivaires de tiques. De plus, les acini parasités sont facilement distinguables par observation microscopique (Potgieter & Els, 1976; Yano *et al.*, 2005). Des méthodes permettant de purifier les sporozoïtes de *Theileria* spp. existent depuis longtemps (Walker & McKellar, 1983) et ont été appliquées avec succès à des tiques infectées par *B. bovis* et *B. bigemina* (Mosqueda *et al.*, 2002a; Mosqueda *et al.*, 2002b; Mosqueda *et al.*, 2004b). Les parasites ainsi isolés ont permis l'infection de globules rouges *in vitro* avec succès. Aucune donnée similaire n'existe en revanche concernant *B. divergens* et l'objectif est donc ici de caractériser les sporozoïtes de ce parasite directement dans les glandes salivaires de son vecteur *I. ricinus*. La transmission du parasite par la tique, dans des conditions expérimentales visant à reproduire l'infection des globules rouges de l'hôte vertébré par son vecteur, a aussi été testée à l'aide de différents systèmes.

Concernant les gamétocytes, il existe très peu de données sur ces formes parasitaires dans le genre *Babesia* et aucune pour *B. divergens*. Il semble impossible de différencier morphologiquement les stades sexués du parasite potentiellement présents dans les globules rouges du vertébré. Au contraire, chez *P. falciparum*, les gamétocytes sont facilement identifiables, plusieurs conditions d'induction de la gamétocytogenèse sont connues (Talman *et al.*, 2004), et des protéines spécifiques de ces stades sexués sont identifiées et caractérisées (Pradel, 2007). Afin d'identifier avec certitude les gamétocytes de *B. divergens*, l'objectif de cette partie du travail a donc été de trouver des marqueurs des stades sexués de ce parasite. Des analyses bioinformatiques, utilisant les données post-génomiques de *P. falciparum* et les données génomiques d'autres Apicomplexes ont été réalisées, afin d'identifier chez *B. divergens*, des protéines conservées au sein des Apicomplexes et spécifiques des stades sexués.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I. Matériel biologique

A. Isolats et souches de *B. divergens*

Les isolats et souches de *B. divergens* utilisés au laboratoire proviennent de parasites isolés de bovins en phase clinique de babésiose ou porteurs asymptomatiques. Les isolats sont cultivés sur hématies de mouton ou de bovin et peuvent être clonés pour obtenir une souche pure à partir d'un seul parasite. Chaque souche est identifiée par une référence permettant de déterminer sa provenance (département, vétérinaire, référence de l'isolat) et le clone isolé. Les souches d'origine bovine qui ont été utilisées dans cette étude sont 0904B G9 et Bob2A, et les isolats sont 5311B, 1802A, 7211B, C139 et 135. Une autre souche de *B. divergens*, Rouen 1987, dont le clone F5 a été utilisé au cours de ces travaux, provient d'un cas clinique humain.

Tous ces isolats et souches sont conservés au laboratoire, congelés dans l'azote liquide.

B. Sang

Les globules rouges, utilisés pour la culture *in vitro* de *B. divergens*, proviennent d'animaux donneurs de sang, indemnes de parasites sanguins : les moutons de l'ENVN n° 3264 et 839 (qui possèdent des hématies très réceptives à *B. divergens*) et les vaches n° 4012 et 6007, maintenues en confinement dans l'animalerie expérimentale de type P2 au centre INRA de Nouzilly.

Le sang est prélevé par ponction à la veine jugulaire avec un porte-aiguille Venoject®, des aiguilles 0,9 × 40 mm et des tubes de 10 mL contenant de l'héparine ou 1,4 mL de Citrate Phosphate Dextrose (CPD, Sigma), comme anticoagulants. Le sang est centrifugé 10 minutes à 800 g. Le plasma est récupéré, additionné de gentamicine (50 µg/mL, Cambrex) et d'amphotéricine B (0,25 µg/mL, Sigma), et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Le buffy-coat est séparé du culot d'hématies et éliminé. Les culots d'hématies sont lavés en tube de 50 mL, avec 40 mL de RPMI 1640 (Lonza) (contenant 50 µg/mL de gentamicine et 0,25 µg/mL d'amphotéricine B) (centrifugation 10 min à 1200 g). Le surnageant et le reste du buffy-coat sont éliminés. Le culot d'hématies est alors dilué au 2/3 avec du RPMI et réparti en tubes de 50 mL. Les globules rouges ainsi préparés sont stockés à 4°C et conservés un mois maximum.

C. Tiques

1. Elevage de tiques saines

Le laboratoire dispose d'un élevage de tiques *I. ricinus*, indemnes de *Babesia* spp. s.s.. Les tiques d'origine proviennent de Belle Île en mer (Morbihan), zone insulaire où *B. divergens* n'a jamais été détecté. Les tiques sont stockées dans des boîtes de culture (25 cm²) à bouchon filtrant, mises dans des dessiccateurs étanches contenant du sulfate de magnésium à saturation qui permet de maintenir une humidité relative constante de 95%. Les saturateurs sont stockés dans une pièce à température (20°C) et photopériode (16 h de jour /24 h) régulées. Chaque stade de tiques est régulièrement nourri soit sur animaux, soit sur membrane comme décrit ci-après (cf. II.B).

2. Collecte de tiques sur la végétation

Des stades libres de tiques (nymphe et adultes principalement) ont été collectés en sous-bois et en bordure de chemin dans les forêts de Rennes (Ille-et-Vilaine), de Princé et du Gâvre (Loire-Atlantique), et de Clefs (Maine-et-Loire). Les tiques ont été collectées sur la végétation avec des drapeaux de coton et seules celles morphologiquement identifiées comme *I. ricinus* ont été exploitées.

3. Récolte de tiques sur animaux

Des tiques naturellement infectées ont été recherchées dans 2 élevages, où la forte présence d'*I. ricinus* et celle de *Babesia* spp. s.s. ont été mises en évidence. A Machecoul (Loire-Atlantique) en 2005, des cas cliniques de babésiose (dus à *B. divergens*) sont apparus dans un troupeau de vaches laitières. L'élevage a été suivi de début 2005 à mi-2006, avec prélèvement mensuel de sang des bovins et récoltes bimensuelles de tiques. Les vaches laitières présentes dans l'élevage de La Verrie (Vendée) sont très fortement infestées par les tiques et présentent une prévalence sérologique contre *B. divergens* élevée (40% en 2007). Des femelles adultes en cours de gorgement (et quelques nymphes) ont été récoltées sur les vaches laitières de ces 2 élevages et rapportées au laboratoire où seules celles identifiées comme *I. ricinus* ont été analysées.

D. Animaux expérimentaux

1. Moutons

L'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes possède un cheptel expérimental de moutons, de race vendéenne. Les moutons sont achetés au lycée Nature de La Roche-sur-Yon, puis maintenus en bergerie expérimentale et nourris *ad libitum*.

Des moutons infectés expérimentalement (n°3464 et 3490, avec la souche Rouen F5) et devenus porteurs chroniques de *B. divergens* (Malandrin *et al.*, 2009) ont servi à la réalisation d'infection de tiques.

2. Bovins

Des veaux ont été entretenus au sein de l'animalerie expérimentale « petits ruminants » de l'ENVN. Ces animaux provenaient d'élevages de bovins laitiers de la région nantaise. Les animaux arrivés dans le cheptel de l'ENVN à l'âge d'une semaine (n° 3243 et 6805) ont été sevrés à l'âge de 2 mois. Ces 2 animaux ont été splénectomisés par le Pr. Olivier Gauthier (ENVN), à l'âge de 4 semaines, en vue de la réalisation d'une infection expérimentale par *B. divergens*. Suite à l'opération, une phase de repos d'un mois minimum a été respectée. Les autres animaux sont arrivés sevrés à l'âge de 3 mois (n° 8818 et 8840) et ont été utilisés pour gorger des tiques infectées.

3. Gerbilles

L'ENVN dispose d'un élevage de gerbilles, dont les reproducteurs proviennent de l'Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, Mayenne).

Pour tester la retransmission de *B. divergens* par des tiques, certains animaux ont été splénectomisés. Le protocole opératoire est décrit en Annexe 2.

4. Lapin

Le lapin (n°300) utilisé pour générer des sérums dirigés contre *B. divergens* provenait de l'élevage Charles River Laboratories (Saint Germain Sur l'Arbresle, Rhône) et a été entretenu à l'animalerie expérimentale lapin de l'ENVN.

Tous les animaux qui ont servi à cette étude ont été traités selon les bonnes pratiques de laboratoire.

E. ADN d'autres Apicomplexes

L'ADN de *P. falciparum*, provenant de sang parasité de patients du Sénégal, atteints de paludisme, a été gracieusement fourni par Odile Mercereau Puijalon (Institut Pasteur, Paris). De l'ADN de *B. bigemina* a quant à lui été gracieusement fourni par Shelly Hope (CSIRO Livestock Industries, Australie).

II. Entretien du matériel biologique

A. Culture *in vitro* de *B. divergens*

1. Conditions générales de culture

B. divergens est maintenu *in vitro* en culture dans des globules rouges ovins ou bovins. Le milieu standard utilisé est le RPMI 1640, complémenté avec HEPES (25 mM) et L-glutamine (Lonza), auquel sont ajoutés gentamicine et amphotéricine B pour éviter les contaminations bactériennes et fongiques. Ce milieu est supplémenté à 20% avec du sérum de veau fœtal (SVF, Lonza) décomplémenté. Ce milieu de culture complet est appelé RPMI-SVF. Les hématies sont ajoutées, à raison de 0,75 mL de la solution de stockage pour 10 mL de RPMI-SVF, soit une concentration finale d'environ $5 \text{ à } 8 \cdot 10^8$ GR/mL. La culture est réalisée à 37°C, sous 6% de CO₂. Des plaques ou des flacons de culture sont utilisés selon les besoins.

Les parasites sont maintenus en culture en puits de 2 mL. Le surnageant est changé tous les 2 à 3 jours. Lorsque la parasitémie atteint 5 à 10% environ, un repiquage est effectué dans un nouveau puits avec du milieu frais, à partir de 10 µL d'hématies parasitées du puits précédent.

Si besoin, la culture peut être amplifiée en boîte de 10 ou 40 mL, avec les mêmes proportions de chaque composant du milieu. Lorsque la parasitémie atteint 10 à 15%, la culture est centrifugée et les globules rouges parasités sont récupérés afin d'être congelés à -20°C et stockés avant utilisation (préparation d'ADN génomique, analyse des protéines par Western Blot).

L'aspect des parasites en culture et la parasitémie (nombre d'hématies parasitées/nombre d'hématies totales) sont évalués par étalement des globules rouges sur lame et coloration au Diff Quik (Medion Diagnostics) (coloration de May Grünwald Giemsa rapide). La parasitémie est mesurée par comptage des hématies parasitées au microscope avec l'objectif à immersion (x1250) et un tube à dessin. Pour une évaluation du nombre de globules rouges dans le milieu de culture, celui-ci est dilué au 1/100 et les cellules sont comptées au

microscope (x500) à l'aide d'une cellule de Malassez. Ces deux résultats permettent de calculer la concentration parasitaire de la culture (globules rouges parasités / mL).

2. Conservation des souches et isolats

Les souches et isolats de *B. divergens* sont conservés à long terme en azote liquide avec du diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma), un agent cryoprotecteur. Pour cela, une culture avec une parasitémie de l'ordre de 10% minimum est préparée. Le culot d'hématies (un volume) est mélangé avec un volume de Solution 1 (RPMI 20% + SVF 80%) et deux volumes de Solution 2 (RPMI 85% + DMSO 15%). La congélation a d'abord lieu à -80°C (24 h minimum) puis le tube est transféré dans l'azote liquide.

Lors de la sortie de parasites du stock congelé, après décongélation au bain-marie à 37°C, la préparation de globules rouges parasités est lavée rapidement dans 10 mL de RPMI (10 min, 1200 g) pour éliminer le DMSO (toxique pour les cellules à température ambiante) et remise en culture dans le milieu classique (puits de 2 mL).

3. Purification des formes parasitaires libres

Le Percoll (Amersham Biosciences) est utilisé à une densité de 1,08 g/mL pour séparer des éléments de densités différentes au sein de la suspension de globules rouges parasités. Il permet de séparer les mérozoïtes libres présents dans les cultures de *B. divergens* du reste des hématies, parasitées ou non.

Un volume de Percoll (3 mL) est déposé dans des tubes de 15 mL, la même quantité de culture (hématies + RPMI-SVF) est déposée très délicatement par-dessus, de manière à ce que les 2 phases ne se mélangent pas. Le tout est centrifugé (10 min, 1800 g). Les globules rouges tombent au fond du tube. Les mérozoïtes libres, qui forment un anneau à l'interface entre le Percoll et le RPMI, sont récupérés puis lavés deux fois en RPMI en tube de 50 mL. Les mérozoïtes purifiés par cette méthode (à partir de 12 boîtes de culture de 40 mL) ont été utilisés pour produire de l'ADN parasitaire en grande quantité et pour servir d'antigènes en Western Blot.

B. Elevage des tiques

1. Système de gorgement artificiel sur membrane

Le laboratoire dispose d'un système de gorgement artificiel permettant de nourrir les tiques et de contrôler leur repas sanguin. Le système expérimental est représenté sur la Figure 11.

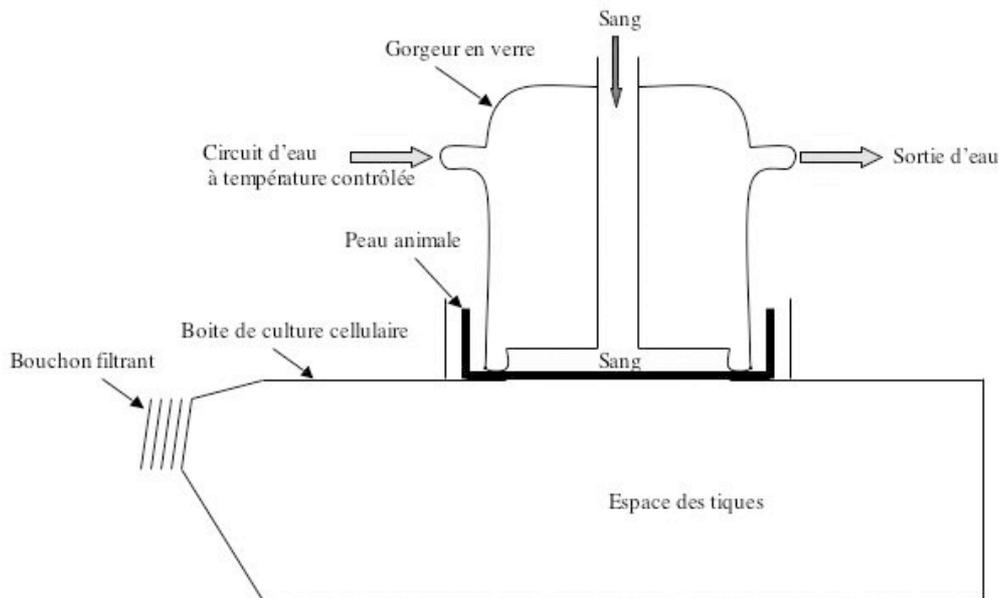


Figure 11 : Représentation schématique du système de gorgement artificiel de tiques sur membrane

(d'après Bonnet *et al.*, 2007b)

Un gorgoir en verre, à double paroi, est adapté sur une boîte de culture cellulaire. Le bas du gorgoir est fermé par une peau animale, préparée selon le protocole détaillé en Annexe 3. Les larves sont gorgées sur des peaux de gerbilles et les nymphes et adultes sur des peaux de lapins. Le sang est introduit par le haut du gorgoir, qui est ensuite fermé par du parafilm (Alcan Packaging), et se retrouve au contact de la peau, côté derme. Côté épiderme, les poils sont coupés à ras pour faciliter la manipulation et la visualisation des tiques, déposées dans la boîte de culture. Un circuit fermé d'eau avec un bain-marie maintient le gorgoir et le sang à une température contrôlée de 37°C, à la fois pour attirer les tiques et maintenir le parasite dans des conditions adéquates. Tout le système est maintenu dans une enceinte climatisée, avec une hygrométrie constante d'environ 80%. Tous les stades de tiques peuvent être nourris par ce système, avec des possibilités variant selon la taille des gorgoirs utilisés et les stades de tiques à gorgier (Tableau 3).

Tableau 3 : Capacités des deux tailles de gorgeurs utilisés

		Grand gorgeur	Petit gorgeur
Volume total de milieu		8 mL	3 mL
Nombre moyen de tiques	Adultes	30	10
	Nymphes	300	100
	Larves	1000	500

Les manipulations de changement de sang du gorgeur sont effectuées quotidiennement et stérilement sous un poste de sécurité microbienne, durant toute la durée du gorgement, c'est-à-dire jusqu'à réplétion et détachement spontané des tiques. Du sang reconstitué est utilisé pour nourrir les tiques : 1/3 de globules rouges (bovins ou ovins) conservés à 4°C en RPMI et 2/3 de plasma (de l'espèce correspondante) (cf. I.B.). Le sang est évacué par le haut, le gorgeur rincé avec de l'eau ppi, puis du RPMI, avant ajout du sang reconstitué. Les tiques récupérées sont maintenues dans les saturateurs utilisés pour l'élevage, en attendant leur évolution.

2. Gorgement sur animaux

Les tiques peuvent aussi être gorgées sur différents animaux, en fonction du stade considéré. Les tiques libres sont déposées directement sur l'animal. Durant toute la durée du gorgement, les animaux sont maintenus sur une grille, au-dessus d'un bac d'eau. Les tiques repletes tombent dans l'eau et sont récupérées deux fois par jour, lors du nettoyage du bac, avec une passoire, à maille plus ou moins fine. Le Tableau 4 résume les différentes possibilités de gorgement *in vivo*.

Tableau 4 : Animaux utilisés et nombre de tiques pouvant être gorgées sur chaque animal

	Gerbillé	Mouton	Veau
Larves	500		
Nymphes	50	200	1000
Adultes		50	100

Le nombre de tiques récupérées est variable suivant les animaux : les principales pertes sont dues au grooming chez la gerbille. Pour les ruminants, les pertes lors de la récolte de nymphes peuvent être importantes car la taille des tiques est très faible par rapport à la taille du système de récupération.

Les deux systèmes de gorgement présentent des avantages et des inconvénients. Leurs atouts majeurs sont : pour le gorgement *in vitro*, la maîtrise du repas sanguin donné aux tiques et donc la possibilité d'infecter par des quantités contrôlées de parasites et l'absence d'utilisation d'animaux vivants ; et pour les gorgements *in vivo*, la rapidité du gorgement et la viabilité des tiques après gorgement. Le Tableau 5 indique les durées et les efficacités de gorgement pour les différents stades de tiques, en fonction du mode de gorgement.

Tableau 5 : Durée du gorgement et taux de réplétion et de transformation des différents stades de tiques, en fonction du mode de gorgement

	Gorgeur§			Animaux		
	Durée du gorgement (jours)	Taux de réplétion (%)	Taux de transformation ou de ponte (%)	Durée du gorgement (jours)	Taux de réplétion (%)	Taux de transformation ou de ponte (%)
Larves	3 à 5	81	nr	2 à 3	nr	90
Nymphes	4 à 10	91	70	3 à 5	90 (gerbille)	97
Adultes	10 à 15	78 *161mg (62-288)	72	6 à 8	65 (veau) *304 mg (96-530)	99

*Pour les adultes, l'efficacité du gorgement a aussi été estimée en fonction du poids moyen des femelles replètes. § Voir (Bonnet *et al.*, 2007b).

III. Infections de l'hôte vertébré et du vecteur par *B. divergens*

A. Infections expérimentales d'animaux par *B. divergens*

1. Gerbilles

Des gerbilles ont été infectées expérimentalement par les souches Rouen F5, 0904B G9 et par les isolats 5311B et 1802A de *B. divergens*. Pour cela, des globules rouges parasités sont injectés à l'animal par voie intra-péritonéale, à des doses comprises entre 10^6 et 10^8 GRP. Les préparations parasitaires proviennent soit de culture *in vitro* en cours, soit de parasites congelés, qui peuvent être injectés aux animaux directement après décongélation.

2. Veaux

Les veaux splénectomisés n°6805 et 3243 ont été infectés expérimentalement par *B. divergens*, respectivement avec les isolats C139 et 135 de *B. divergens*.

Les parasites ont été cultivés durant 15 jours dans les propres globules rouges des veaux à infecter, pour faciliter le passage parasitaire de l'*in vitro* à l'*in vivo*. Les 2 veaux ont été infectés par voie intra-veineuse, avec une dose de $2,5 \cdot 10^7$ globules rouges parasités pour 100 kg de poids vif. Le veau n° 3243 a reçu une dose supplémentaire de $2,5 \cdot 10^8$ GRP/100 kg à J3 car aucun parasite n'avait encore été détecté sur étalement sanguin à cette date. Le suivi de la parasitémie a été réalisé quotidiennement par observation d'un étalement sanguin. Le sang prélevé à la veine jugulaire a aussi été mis en culture, pour vérifier un portage parasitaire éventuel lorsque rien n'était visible à l'étalement. Lorsque des signes cliniques de babésiose sont apparus chez les veaux (fièvre, hémoglobinurie, diarrhée), ceux-ci ont été traités avec du de l'imidocarbe, à la dose de 121,15 mg pour 100 kg de poids vif (dose non stérilisante) (soit 1 mL de Carbésia® pour 100 kg).

B. Infections expérimentales de tiques par *B. divergens*

Les nombres exacts de tiques gorgées selon les différentes méthodes et par les différents isolats seront indiqués dans le Chapitre 3, afin de mieux appréhender les données de chaque expérience en globalité.

1. Infections *in vitro* sur membrane

Les tiques sont nourries avec du sang reconstitué comme décrit précédemment (cf. II.B.1.), mais en utilisant des globules rouges parasités, maintenus en culture. La parasitémie est contrôlée à chaque changement du milieu (2 fois par jour, ici) et est ajustée pour être comprise entre 5 et 10%. La souche Bob2A de *B. divergens* a été utilisée pour les gorgements *in vitro*.

La majorité des tiques infectées par ce biais a été gorgée à réplétion, pour étudier la transmission parasitaire au stade suivant. Pour une partie des tiques, le gorgement n'a été que partiel, les tiques ayant été décrochées au bout de 6 à 7 jours de gorgement, pour rechercher la présence de stades sexués de *B. divergens* dans leur tube digestif.

2. Infections *in vivo*

Les différents stades de tiques ont été gorgés sur animaux parasités, suivant les protocoles décrits précédemment (cf. II.B.2.) en vue de leur infection. Des larves et des nymphes sont infectées sur des gerbilles parasitées. Les tiques sont déposées sur les gerbilles au moment de l'infection de ces dernières. Des nymphes et des adultes sont infectées sur mouton ou sur veau parasité.

IV. Production expérimentale et recherche des sporozoïtes de *B. divergens*

A. Protocoles d'infections expérimentales de tiques en vue de l'isolement des sporozoïtes

En utilisant les différentes méthodes d'infection de tiques par *B. divergens* *in vitro* et *in vivo*, des protocoles ont été établis pour essayer d'isoler les sporozoïtes à partir de ces tiques infectées, une fois leur transformation accomplie.

1. Transmission trans-stadiale de *B. divergens*

Les protocoles ne mettant en jeu que la transmission trans-stadiale de *B. divergens* sont représentés dans la Figure 12. Un stade de tique est infecté (larve ou nymphe) et la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires du stade suivant (nymphe ou adulte, respectivement) a été recherchée.

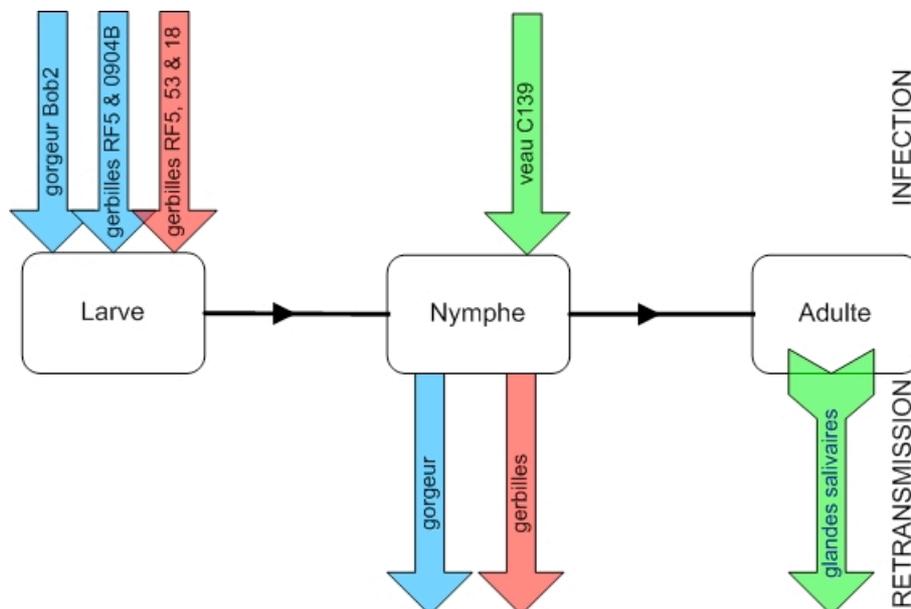


Figure 12 : Expériences d'infection d'*I. ricinus* par *B. divergens* et tests de retransmission après transmission trans-stadiale

Chaque flèche représente un gorgement (ou la recherche directe des sporozoïtes dans les glandes salivaires après gorgement partiel des tiques, flèche avec ailette). Chaque couleur correspond à un essai différent. Les systèmes de gorgement et les souches et isolats utilisés (Bob2A ; RF5 : Rouen 1987 F5 ; 53 : 5311B ; 18 : 1802A ; C139) sont indiqués dans les flèches.

2. Transmissions trans-ovarienne et trans-stadiale de *B. divergens*

Pour infecter des tiques *I. ricinus* par *B. divergens* avec une probabilité maximale et en fonction des publications sur la retransmission expérimentale *in vivo* de ce parasite (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975), des adultes ont été infectées et les stades de la génération

suiuante analysés (Figure 13). Dans cette situation, sont alors mises en jeu la transmission trans-ovarienne et la transmission trans-stadiale.

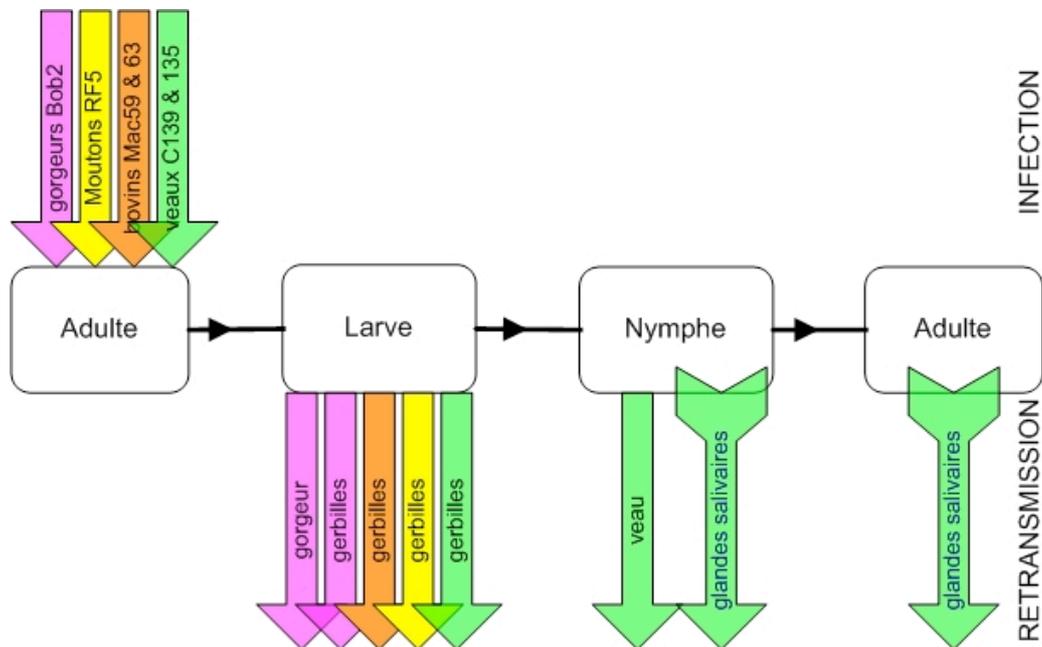


Figure 13 : Expériences d'infection d'adultes d'*I. ricinus* par *B. divergens* et tests de retransmission après transmission trans-ovarienne et trans-stadiale

Chaque flèche représente un gorgement (ou la recherche directe des sporozoïtes dans les glandes salivaires après gorgement partiel des tiques, flèches avec ailette). Chaque couleur correspond à un essai différent. Les systèmes de gorgement et les souches et isolats utilisés (Bob2A ; RF5 : Rouen 1987 F5 ; Mac59 & 63 : Mac59 et Mac63 ; C139 et 135) sont indiqués dans les flèches.

Au cours de l'expérience d'infection sur des veaux parasités (flèches vertes), les tiques (nymphe et adulte) ont été déposées en 3 séries sur le veau n° 6805 à J0, J4 et J7 post-infection et en 4 séries sur le veau n° 3243 à J0, J4, J7 et J11 post-infection.

Pour toutes les autres expériences d'infection, les tiques ont toutes été déposées en même temps, au moment de la mise en place du système de gorgement.

B. Méthodes utilisées pour mettre en évidence la présence des sporozoïtes dans les glandes salivaires

Pour isoler les sporozoïtes de *B. divergens*, les tiques infectées expérimentalement et les tiques récoltées sur animaux sur le terrain (cf. I.C.3.) ont été analysées. Les méthodes d'analyse sont décrites ici de manière générale, les détails de chaque expérience seront

indiqués dans le Chapitre 3 (système d'infection, méthode d'analyse de la retransmission, parasites utilisés, nombre de tiques analysées).

Deux méthodes ont été utilisées pour étudier la transmission parasitaire de la tique au vertébré. Soit les tiques potentiellement infectées ont été gorgées sur un animal réceptif ou avec le système de gorgement artificiel, la retransmission parasitaire étant alors évaluée par la détection éventuelle de parasites dans le sang de l'animal ou du gorgeur. Soit les glandes salivaires de nymphes ou d'adultes ont été isolées et analysées pour visualiser directement les sporozoïtes *in situ* et analyser la retransmission par mise en culture des glandes salivaires.

1. Essais de retransmission parasitaire par les tiques

Les essais de retransmission *in vitro* du parasite par des tiques infectées ont été réalisés sur gorgeur. Le sang (sain au départ), avec lequel les tiques sont nourries, a été récupéré dans le gorgeur, centrifugé et lavé en RPMI. La totalité du culot obtenu a été mise en culture en boîte de 10 mL, avec du RPMI-SVF (cf. II.A.). La mise en culture a été réalisée, à chaque lavage du système, pendant toute la durée du gorgement.

Tous les essais de retransmission *in vivo* de *B. divergens* par des larves potentiellement infectées ont été réalisés sur gerbilles splénectomisées, selon la méthode de Lewis et Young (Lewis & Young, 1980). Les larves ont été gorgées comme décrit précédemment. Un suivi quotidien de la gerbille a été réalisé, par étalement sanguin réalisé par prélèvement à la queue, coloration de la lame et évaluation de la parasitémie au microscope. A la fin de chaque gorgement, 4 à 5 jours après la réplétion des larves, la gerbille a été euthanasiée et le sang récupéré par ponction cardiaque. Le sang de la gerbille, partagé en deux lots, a été mis en culture en boîte de 10 mL, pour moitié avec des globules rouges bovins et pour l'autre moitié avec des globules rouges ovins (comme décrit précédemment). Cette méthode a aussi été utilisée pour évaluer la retransmission par des nymphes infectées.

Pour des essais de retransmission *in vivo* par des nymphes ou des adultes, les tiques ont été gorgées sur veau (n°8818 et 8840) (cf. II.B.2.). Durant toute la durée du gorgement des tiques et pendant la semaine suivante, des prises de sang ont été réalisées tous les deux jours. La parasitémie a été mesurée par étalement sanguin direct, puis la multiplication d'éventuels parasites a été contrôlée par mise en culture des globules rouges du veau en RPMI-SVF.

Dans les trois situations décrites ci-dessus, les globules rouges mis en culture ont été suivis pendant trois semaines maximum, avec un changement régulier du surnageant de culture et une évaluation de la parasitémie sur étalement.

2. Analyse des glandes salivaires

a. Dissection des tiques

Que ce soit pour l'étude des sporozoïtes ou des stades sexués, les tiques potentiellement infectées ont été disséquées selon la méthode suivante. La partie antérieure de la tique, en décubitus dorsal, est coupée au scalpel, entre les deux premières paires de pattes. A l'aide d'une loupe binoculaire, les organes d'intérêt sont isolés avec des pinces fines (High Precision Dumoxel® n°5, Dumont) dans du PBS. Entre chaque individu, les pinces ont été nettoyées, plongées dans le DNA off (Eurobio) et rincées à l'eau.

Les glandes salivaires sont isolées dans un tube 1,5 mL et analysées directement. Le tube digestif, mis en tube de 1,5 mL et additionné de Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) (1 à 2 µL pour un tube digestif de tique), est conservé à -20°C jusqu'à utilisation (cf. VII.C.2).

b. Recherche des sporozoïtes dans les glandes salivaires

Le contenu des glandes salivaires isolées à partir des tiques étudiées a été mis en culture, dans des puits contenant 150 µL de RPMI-SVF avec globules rouges (bovins ou ovins), en plaque de 96 puits, en utilisant différentes méthodes.

Au début de l'étude (36 femelles adultes de Machecoul), les deux glandes salivaires de chaque tique ont été traitées séparément. Une seule des 2 était mise en culture telle quelle, en RPMI-SVF avec un mélange d'hématies ovines et bovines, l'autre était congelée pour analyse ultérieure par PCR.

Dans la suite de l'étude (adultes de La Verrie, nymphes et adultes infectées expérimentalement), les deux glandes salivaires de chaque tique, isolées dans une goutte de PBS, ont été broyées dans un tube 1,5 mL avec un pilon adapté, dans 30 µL de PBS stérile. Après réalisation d'une lame pour coloration et observation au microscope (2 µL), 5 à 10 µL de la suspension ont été mis en culture dans 2 puits en présence de RPMI-SVF, l'un avec des globules rouges bovins, l'autre avec des globules rouges ovins. Le reste de la suspension a été congelé pour analyse par PCR.

Une troisième méthode a été utilisée pour tenter d'isoler les parasites contenus dans les glandes salivaires (22 adultes de Machecoul et nymphes infectées expérimentalement). Cette technique, dite d'Ozaki, est utilisée pour isoler les sporozoïtes de *P. falciparum* à partir de

moustiques infectés (Ozaki *et al.*, 1984). Les vecteurs sont disséqués, les glandes salivaires isolées dans du milieu de survie et placées dans un tube modifié, représenté sur la Figure 14.

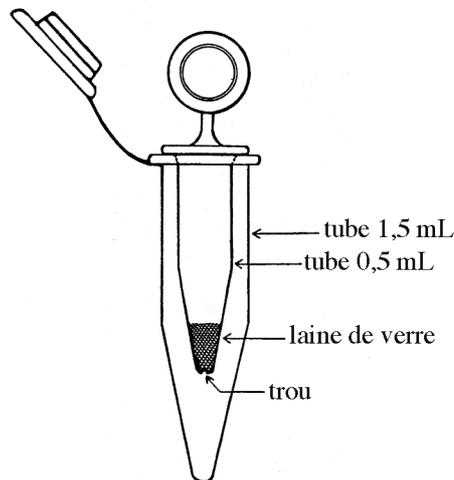


Figure 14 : Système d'Ozaki pour la purification des sporozoïtes de *Plasmodium* spp.
(d'après Ozaki *et al.*, 1984)

Dans le cas de *Plasmodium* sp., après centrifugation (2 min 380 g), les sporozoïtes se retrouvent dans le fond du deuxième tube, avec peu de contaminants (débris de cellules du vecteur).

Lors de l'utilisation de cette méthode, les glandes salivaires de tiques isolées ont été analysées en pool dans du PBS (à raison de 1 μ L de PBS par tique). Le culot obtenu après centrifugation a été remis en suspension dans le PBS contenu dans le tube, observé au microscope (après étalement et coloration) et mis en culture (10 μ L) en RPMI-SVF et hématies bovines. Le reste de la suspension a été congelé.

3. Recherche d'ADN de *B. divergens* par amplification par PCR sur tiques

Tout au long de cette étude des tiques entières ont été analysées (en pool ou individuellement) par PCR pour détecter la présence éventuelle d'ADN de *B. divergens*. Des mises au point ont été réalisées au fur et à mesure des expériences, notamment par la standardisation du nombre d'individus de chaque stade testés en pool (Annexe 4). Les échantillons de glandes salivaires congelées (isolées, broyées ou suspensions purifiées sur tube d'Ozaki, cf. paragraphe précédent), ont été aussi analysés par PCR.

Les extractions d'ADN ont été réalisées selon le protocole décrit en Annexe 4. Les amplifications par PCR ont été réalisées, à partir de 5 μ L de chaque extrait d'ADN de tique.

Les concentrations des réactifs dans la solution finale (volume de 30 µL) sont : 1,5 mM de MgCl₂, 0,33 mM de dNTP, 1 µM de chaque amorce et 1,5 u de EUROBIOTAQ® ADN Polymerase par réaction. Les réactions d'amplification ont été réalisées avec les thermocycleurs PTC200 (MJ Research) ou MJ Mini (BioRad), selon le protocole suivant. Après une dénaturation de 2 min à 94°C, 40 cycles sont effectués. Un cycle comprend 30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation à la température d'hybridation recommandée (T_m, adapté au couple d'amorces utilisé) puis 1 min d'élongation (par kilobase amplifié) à 72°C. Une élongation finale de 5 min à 72°C est réalisée avant le refroidissement des tubes. Les produits d'amplification de PCR ont été analysés sur gel d'agarose (Eurobio) à 1% en TBE, contenant 0,5 mg/L de bromure d'éthidium (Eurobio).

La détection d'ADN de *B. divergens* dans les tiques a été réalisée selon 2 méthodes, ciblant chacune un gène différent avec des amorces *ad hoc* qui sont présentées dans le Tableau 6.

- Pour la première méthode, dite PCR simple, le gène de l'ADNr 18S de *B. divergens* a été utilisé comme support avec les amorces GF2 et GR2 ;

- pour la deuxième méthode, dite PCR nichée, la mise en évidence du gène *bdccp2* (cf. VI.B.) a permis la mise au point d'une PCR nichée plus spécifique et plus sensible.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la détection de *B. divergens* dans les tiques par amplification PCR

Gène cible	T _m (°C)	Amorce Up		Amorce Down	
		Nom	Séquence 5'-3'	Nom	Séquence 5'-3'
18S	58	GF2	GYTTGTAATTGGAATGATGG	GR2	CCAAAGACTTTGATTTCTCTC
<i>bdccp2</i>	66	532_Bd Up	CCTACCACGGAAGCACGACCC	532_Bd Down	CCACTCAATCTGACGACGCCTG
	65	532NT Bd Up	CCCTCAGTTCAACGCAGAGCGTGC	532NT Bd Do	CGTTTGAAACTCGCTCGAAGGATCG

V. Essais d'induction de la différenciation sexuée *in vitro*

Afin d'étudier les gamétocytes de *B. divergens*, différentes expériences ont été réalisées, pour détecter directement ces formes parasitaires *in vitro* par observation microscopique.

Comme présenté dans la partie bibliographie (cf. C1.III.A.1.b et III.B), de nombreux facteurs influençant la production des stades sexués sont connus chez *P. falciparum*. Les expériences réalisées ici ont tenté de reproduire certaines de ces conditions, pour essayer d'induire une différenciation sexuée de *B. divergens*. Pour chacune des conditions décrites ci-dessous, des cultures à 15% de parasitémie, en boîte de 10 mL, ont été utilisées et maintenues une nuit (sauf 1.a.) dans les conditions potentiellement inductrices, une boîte étant restée dans les conditions normales de culture pour servir de témoin. Des étalements ont été réalisés le lendemain, colorés au MGG et observés au microscope. Pour une partie des échantillons de la souche Rouen F5 (1b, 1c, 2a), la totalité de la culture a été centrifugée, le surnageant éliminé, l'étalement réalisé et le culot de globules rouges parasités congelé pour être testé par la technique de Western Blot.

A. Facteurs favorisant la gamétocytogenèse

1. Saturation du milieu en formes parasitaires asexuées

Des cultures *in vitro* de la souche Bob2A de *B. divergens*, en hématies ovines et bovines, ont été maintenues à haute parasitémie (>20%), sans changement de milieu pendant 48 h.

2. Babésicide

L'action d'un babésicide, l'imidocarbe, a été testée *in vitro* sur la population parasitaire des souches Bob2A en hématies bovines et Rouen F5 en hématies ovines. La solution de Carbésia® (contenant de l'imidocarbe à 121,15 mg/mL) a été diluée stérilement au 1/100 dans de l'eau ppi. Pour une boîte de 10 mL, 100 µL de cette dilution ont été ajoutés à la culture. Cette dose correspond à la posologie recommandée pour traiter la babésiose bovine.

3. Stress des globules rouges parasités par choc thermique

Une boîte de globules rouges de moutons parasités par la souche Rouen F5 a été incubée à 4°C puis remise dans les conditions classiques de culture pour 4 heures le lendemain, avant réalisation de l'étalement.

B. Facteurs reproduisant le passage chez le vecteur

1. Acide xanthurénique

De l'acide xanthurénique, dilué dans de l'eau ppi, a été ajouté dans le milieu de culture, à la concentration finale de 100 $\mu\text{mol/L}$. Les souches Bob2A (en hématies bovines) et Rouen F5 (en hématies ovines) ont été testées avec cette molécule inductrice.

2. Modification du pH du milieu

Le pH du milieu de culture (initialement à 7,2) a été modifié par ajout de NaHCO_3 dans le RPMI jusqu'à atteindre un pH de 8,5. Cette solution a été filtrée (0,2 μm) avant utilisation en culture, pour la souche Bob2A en hématies bovines.

3. Incubation des globules rouges parasités à température ambiante

Une boîte de culture de la souche Bob2A en globules rouges de bovin a été incubée une nuit à température ambiante.

4. Extrait de tube digestif de tique gorgée

Les tubes digestifs de 20 nymphes gorgées à réplétion sur gerbille ont été isolés et broyés au pilon dans un tube, puis ajoutés dans le milieu de culture de la souche Bob2A en hématies bovines.

VI. Identification de gènes spécifiques de gamétocytes

Face aux difficultés de mise en évidence directe des stades sexués, la recherche de gènes exprimés spécifiquement chez les stades sexués, en particulier les gamétocytes, a été réalisée. Pour cela, des comparaisons ont été faites avec un autre Apicomplexe, dont les stades sexués sont bien connus, *P. falciparum*.

A. Sélection de gènes *in silico*

1. Recherche de protéines spécifiques des stades sexués dans le genre *Plasmodium*

Des protéines spécifiques des stades sexués de *P. falciparum* ont été identifiées dans la littérature et grâce aux analyses réalisées en collaboration avec Emmanuel Bischoff (Plateforme 2 Puces à ADN, Institut Pasteur) sur différentes études post-génomiques (Lasonder *et al.*, 2002; Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2005; Silvestrini *et al.*, 2005). Brièvement, à partir d'une table d'orthologie, les données de transcriptome et de protéome de 3 espèces plasmodiales ont été assemblées (*P. falciparum*, *P. berghei*, *P. yoelii*). Les gènes dont les transcrits ou les protéines étaient exprimés aux stades

gamétocyte, ookinète et oocyste ont été sélectionnés. De plus seuls les gènes dont la séquence présentait un peptide signal, avec ou sans domaine transmembranaire, ont été retenus de manière à sélectionner des marqueurs exposés à la surface parasitaire et accessibles aux anticorps. Les orthologues chez *P. chabaudi* et *P. knowlesi* ont ensuite été recherchés (PlasmoDB ; <http://plasmodb.org/plasmo/>). Dans une deuxième étape, les orthologues des ces gènes ont été recherchés dans les données de séquence pan-génomiques disponibles pour le genre *Babesia* : *B. bovis* et *B. bigemina*.

2. Recherche d'orthologues chez les *Babesia* spp.

Puisque aucune donnée sur le génome de *B. divergens* n'est disponible actuellement, les protéines sélectionnées dans le genre *Plasmodium* ont été recherchées chez *B. bovis* et *B. bigemina*. Au début de cette thèse, le génome de *B. bovis* était en cours de séquençage à l'Université de Washington State (http://www.vetmed.wsu.edu/research_vmp/babesia-bovis/index.asp). Les séquences complètes des gènes d'intérêt de *B. bovis*, ainsi que les séquences codantes, ont été aimablement fournies par Kelly Brayton (Washington State University), avant la publication officielle du génome (Brayton *et al.*, 2007). Le génome de *B. bigemina* est toujours en cours de séquençage à l'Institut Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>), où les données brutes sont accessibles. Les séquences protéiques de *P. falciparum* ont été comparées avec les séquences génomiques traduites de *B. bovis* et *B. bigemina*, en soumettant les séquences d'acides aminés du premier aux bases de données traduites des derniers (TBLASTN). Parmi tous les résultats, seules les protéines avec une E-value $<10^{-20}$ ont été retenues. Les séquences nucléotidiques, et si possibles les séquences protéiques, de chaque espèce étudiée, ont été récupérées dans les bases de données pour les 3 gènes de *P. falciparum* sélectionnés : *pfccp1* (=PF14_0723), *pfccp2* (=PF14_0532) et *pfccp3* (=PF14_0067).

3. Alignements de séquences et définition d'amorces dégénérées

Les alignements multiples de séquences protéiques pour les différentes espèces de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* et *P. knowlesi*) et les 2 *Babesia* (*B. bovis* et *B. bigemina*) ont été réalisés avec ClustalW (<http://clustalw.genome.jp/>) pour les 3 protéines PfCCp1, 2 & 3. Les régions présentant le meilleur alignement d'acides aminés ont été sélectionnées et les séquences d'ADN correspondant à ces régions ont été alignées avec le même outil. Ces alignements réalisés dans des régions très conservées ont servi de base pour définir des amorces dégénérées (amorces listées par gène, dans le Tableau en Annexe 5, dans le but d'amplifier des fragments des gènes existant potentiellement chez *B. divergens*.

Pour chaque gène, deux zones conservées ont été choisies, la zone la plus proche de l'extrémité 5' ayant servi de base pour définir les amorces dégénérées Up et la zone la plus proche de l'extrémité 3' pour les amorces dégénérées Down. Pour chaque zone, deux amorces ont été définies au même endroit : l'une des amorces étant dégénérée sur la base des similitudes de séquences de *B. bigemina* et *P. falciparum* (couple *Pf/Bbi*), l'autre sur celles de *B. bigemina* et *B. bovis* seulement (couple *Bbi/Bbo*).

B. Identification des gènes *ccp* chez *B. divergens*

1. Extraction d'ADN

De l'ADN de *B. divergens* a été obtenu à partir de mérozoïtes de la souche Rouen F5, produits *in vitro* en globules rouges de mouton. Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), suivant le protocole détaillé en Annexe 4, à partir de 50 µL de culot de mérozoïtes dilué au 1/2 en PBS. Les extraits ont été réhydratés dans de l'eau ppi.

2. Mise en évidence des gènes *ccp* chez *B. divergens* par PCR et amorces dégénérées

Pour mettre en évidence les premiers fragments des gènes d'intérêt chez *B. divergens*, l'ADN génomique de ce parasite (80 ng par réaction) a été amplifié par PCR, avec les amorces dégénérées définies précédemment (cf. VI.A.3.). La taille des fragments attendus a été estimée en fonction de celle calculée chez *P. falciparum*. Les contrôles positifs ont été réalisés avec de l'ADN de *P. falciparum* et de *B. bigemina* et les amorces spécifiques de ces espèces.

Ces PCR et toutes celles réalisées pendant ce travail ont été faites selon le même protocole général, détaillé précédemment (cf. IV.B.3). Les amorces utilisées au cours de cette étude, avec une température d'hybridation adaptée à chaque couple d'amorces utilisées, sont listées dans l'Annexe 5. Les températures d'hybridation ne sont pas indiquées, les amorces ayant été utilisées plusieurs fois, dans des couples différents, avec donc des T_m différents.

Cependant, pour des amplifications plus difficiles ou très longues (>2,5 kb), la Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) a été utilisée. Avec cette polymérase de haute-fidélité, la dénaturation a lieu à 98°C, pour 10 à 20 s. Pour la phase d'hybridation, le T_m est augmenté de 2°C par rapport au T_m utilisé pour une polymérase classique. La phase

d'élongation, à 72°C aussi, est deux fois plus rapide qu'avec une polymérase classique (30 s pour 1 kb).

A partir des premiers fragments amplifiés grâce aux amorces dégénérées, la séquence complète des gènes *bdccp1*, 2, & 3 a été déterminée, grâce à différentes méthodes détaillées ci-dessous. A chaque étape, la séquence de *B. divergens* obtenue a été validée comme appartenant bien au gène d'intérêt, par séquençage puis alignements avec les séquences de *B. bigemina* et *B. bovis* et/ou vérification du recouvrement avec les séquences obtenues précédemment pour *B. divergens*. Toutes les séquences obtenues ont été stockées, analysées et annotées à l'aide du logiciel Artemis (Genome Research Limited).

3. Nouvelle série d'amplifications par PCR avec des amorces dégénérées

Les alignements des séquences protéiques, réalisés précédemment, ont été repris et de nouvelles zones conservées ont été sélectionnées. D'autres amorces dégénérées ont ainsi été définies et ont servi à amplifier par PCR de nouveaux fragments des gènes d'intérêt chez *B. divergens*.

Cette stratégie a été aussi utilisée au-delà des séquences codantes. Pour cela, les séquences nucléotidiques intergéniques, de *B. bigemina* et *B. bovis* uniquement, ont été alignées. Lorsque cela était possible, 1 ou 2 amorces dégénérées ont été définies à l'extérieur des gènes. Ces amorces utilisées en couple avec des amorces spécifiques de *B. divergens* ont servi à amplifier les extrémités 5' et 3' des gènes de *B. divergens*, par PCR nichée ou semi-nichée. Dans ces cas-là, le produit d'amplification de la première PCR a été dilué au 1/100 pour servir d'échantillon à la deuxième réaction d'amplification.

4. RACE

Pour amplifier les extrémités 5' et 3' inconnues des gènes, la technique de RACE a été utilisée, à l'aide du kit GeneRacer® (Invitrogen) avec l'enzyme SuperScript™ III RT. De l'ARN total (cf. VI.C.1.) a été préparé pour les réactions de RACE suivant les recommandations du fabricant. Les réactions d'amplification des différentes parties des gènes ont été réalisées à partir de 200 ng d'ARN avec les amorces spécifiques indiquées dans l'Annexe 5. Les produits d'amplification obtenus ont été clonés, puis séquencés.

5. Séquençage

a. Produits de PCR et plasmides

Pour des besoins de clonage ou de séquençage, certains produits d'amplification par PCR, présentant plusieurs bandes, ont été purifiés sur gel d'agarose (1,5% en TBE). Après séparation par électrophorèse des bandes de différents poids moléculaire, la bande d'intérêt a été découpée dans le gel à l'aide d'un scalpel sur un banc à Ultra-Violets. L'ADN inclus dans le gel a été purifié à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel), selon les recommandations du fabricant.

Certains produits PCR ont été clonés pour pouvoir être séquencés plus facilement, notamment pour les produits amplifiés par PCR à l'aide d'amorces dégénérées. Le kit TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) a été utilisé, avec des bactéries One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*. Les différentes étapes de clonage (ligation, transformation, culture bactérienne) ont été réalisées suivant les instructions du fabricant.

Les divers fragments amplifiés pour reconstituer les séquences des trois gènes étudiés ont été séquencés chez Genome Express (Meylan, Isère) et à la Plateforme de Séquençage de Ouest Génopole (Nantes, Loire-Atlantique). Les produits de PCR ont été séquencés sur les deux brins avec les amorces ayant servi à l'amplification. Les inserts clonés dans les plasmides ont été séquencés dans les deux sens avec les amorces universelles T3 et T7.

b. Séquençage direct sur ADN génomique

Finalement, l'extrémité manquante de certains gènes a été séquencée par Millegen S.A. (Labège, Haute-Garonne) directement à partir d'ADN génomique de *B. divergens* (6 µg), avec une seule amorce (Annexe 5). De l'ADN génomique de très bonne qualité (rapports de $1.8 < DO_{260}/DO_{280} < 2$ et $2 < DO_{230}/DO_{280} < 2.2$) et hautement concentré (> 500 ng/µL) a été produit pour cela, à partir de globules rouges de mouton parasités par la souche Rouen F5.

C. Analyse de l'expression des gènes *bdccp* par détection des transcrits correspondants

1. Extraction d'ARN total

Des extractions d'ARN total ont été réalisées sur globules rouges de mouton parasités (issus de culture *in vitro* de la souche Rouen F5), à l'aide de TRIzol® Reagent (Invitrogen), selon le protocole détaillé en Annexe 6.

2. Détection des ARNm des *ccp* par RT-PCR

Des fragments d'ARNm des 3 gènes d'intérêt ont été amplifiés par RT-PCR, selon le protocole suivant. La réaction de reverse transcription a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN total. L'ARN a été incubé 10 min avec 0,5 mM d'amorces oligo dT à 70°C. Ont ensuite été ajoutés l'enzyme (1,5 u de M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant, Promega), le tampon correspondant et des inhibiteurs de RNase (1 u de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega). La réaction a été incubée 10 min à 42°C, puis 50 min à 46°C. L'ADNc produit à l'issue de cette réaction a été utilisé comme échantillon (80 ng) pour des réactions de PCR faites dans des conditions identiques à ce qui a été décrit précédemment.

3. Détermination de la séquence codante des gènes *ccp* chez *B. divergens*

Les alignements des séquences d'ADN de *B. bovis*, *B. bigemina* et celles obtenues pour *B. divergens*, ont permis de supposer la présence et la place des introns chez *B. divergens*, en se basant sur ceux existant chez *B. bovis*. Les données de séquence étant brutes pour *B. bigemina*, les zones d'introns ne sont pas connues et n'ont donc pas pu être utilisées. Ceci a permis d'estimer la taille attendue des produits amplifiés par RT-PCR et de générer les amorces utilisées en RT-PCR dans les régions codantes uniquement.

Par ailleurs, la structure réelle intron-exon des 3 gènes a été confirmée en totalité chez *B. divergens* par séquençage des différents fragments amplifiés par RT-PCR.

4. Analyse des domaines protéiques

Les séquences des protéines de *B. divergens*, déduites à partir des séquences nucléotidiques, ont été analysées : les domaines ont été prédits par l'algorithme de SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) et les motifs présents ont été prédits par comparaison avec la base de données Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

VII. Validation de la protéine BdCCp2 comme marqueur des gamétocytes de *B. divergens*

A. Obtention de sérums dirigés contre la protéine BdCCp2

Ayant identifié des gènes de *B. divergens*, orthologues de gènes spécifiques des stades sexués de *P. falciparum*, l'une des protéines correspondantes a été sélectionnée pour être utilisée comme marqueur de gamétocytes de *B. divergens*. A partir de peptides recombinants issus de cette protéine, des sérums immuns ont été produits pour rechercher les stades sexués de ce parasite, dans diverses conditions.

1. Production de protéine recombinante

Le fragment d'un gène amplifié et séquencé grâce aux amorces dégénérées (cf. VI.B.2) a servi de base pour la production d'un peptide recombinant en système procaryote, rpBdCCp2 (construction plasmidique et séquence indiquées en Annexe 7). Pour cela, un fragment d'ADNc du gène *bdccp2*, amplifié par RT-PCR avec les amorces 532BDUp et 532BDDo ($T_m = 65^\circ\text{C}$) (Annexe 5), a d'abord été inséré dans un vecteur pCR®4-TOPO®, afin de vérifier la séquence du produit. Puis à l'aide d'amorces spécifiques ($T_m = 66^\circ\text{C}$, Annexe 5), le nouveau produit de PCR a été inséré dans le vecteur d'expression Champion™ pET200 Directional TOPO®, selon les recommandations du fabricant. L'expression du peptide recombinant a ensuite été réalisée à l'aide du kit Champion™ pET200 Directional TOPO® Expression (Invitrogen), dans des bactéries BL21 Star™ (DE3) One Shot®. Les bactéries BL21 transformées ont été cultivées dans du milieu LB (Sigma) contenant 100 mg/L de kanamycine (Sigma) pour une nuit à 37°C. Le jour suivant, 1 L de milieu LB a été inoculé avec la culture primaire et les bactéries ont été cultivées, jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0,6. Alors l'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) a été ajouté à une concentration finale de 0,5 mmol/L pour induire l'expression de rpBdCCp2, et les bactéries cultivées sous agitation durant 5 heures à 37°C. La culture a été centrifugée, le surnageant éliminé et le culot bactérien congelé à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Obtention d'un sérum de lapin dirigé contre rpBdCCp2

Une petite quantité de culot de bactéries BL21 (environ 150 μL) contenant rpBdCCp2, additionnée d'un volume équivalent de Tampon de Traitement 1X pour SDS-PAGE (cf. Annexe 11) a été traitée 5 min à 100°C, puis centrifugé rapidement (30 s, 9000 g) pour récupérer le surnageant. Les protéines ont été séparées par migration dans des grands gels d'acrylamide à 12% (cf. Annexe 11). Les protéines ont été ensuite transférées sur membrane

de nitrocellulose et colorées au Rouge Ponceau. La bande d'intérêt (33 kDa) a été repérée grâce au marqueur de poids moléculaire et découpée. La nitrocellulose (environ 480 mm²) a été découpée au scalpel en tout petits morceaux, puis dissoute en ajoutant 2 mL de DMSO (Sigma). La nitrocellulose a ensuite été précipitée progressivement en ajoutant du PBS (2 mL), goutte-à-goutte et en mélangeant continuellement au vortex. Après deux lavages en PBS, la nitrocellulose a été suspendue dans 2 mL de PBS et conservée à -20°C jusqu'à utilisation. Cette suspension de nitrocellulose contenant le peptide d'intérêt a servi de solution d'immunisation, à raison de 500 µL par injection.

Le lapin n°300 a été immunisé avec rpBdCCp2, selon le protocole détaillé dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Protocole d'immunisation du lapin n°300 avec rpBdCCp2

Date		Injection de rpBdCCp2	Prélèvement de sang (mL)
14-01-2008	T0	x	20
24-01-2008	T1		5*
04-02-2008		x	
14-02-2008	T2		15*
18-02-2008	T2'		50
20-02-2008		x	
03-03-08	T3		10*
06-03-08	T3'		75

* prélèvement effectué pour tester la réaction du sérum contre rpBdCCp2 par Western Blot avant de continuer le protocole d'immunisation.

Le lapin a été anesthésié (Rompun®) puis euthanasié par saignée lors d'une ponction cardiaque le 06-03-08.

3. Obtention d'un sérum de cobaye dirigé contre spBdCCp2

Pour obtenir un deuxième sérum dirigé contre BdCCp2, un peptide recombinant, spBdCCp2, a été synthétisé par la société Eurogentec (Seraing, Belgique), avec la collaboration de Peter David (Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites, Institut Pasteur). Ce peptide de 15 acides aminés, spBdCCp2 (CDQAKTSKDARDKYF), a été choisi dans une zone correspondant à un peptide recombinant de *P. falciparum* ayant servi à générer des anticorps contre les gamétocytes de ce parasite (Pradel *et al.*, 2004). La séquence de spBdCCp2 est incluse dans la séquence de rpBdCCp2, produit précédemment (cf. Annexe 7).

Deux cobayes, n°116 et 117, ont été immunisés, par la société Eurogentec, avec le peptide spBdCCp2, couplé à la protéine porteuse KLH (Keyhole limpet hemocyanin). Les sérums immuns ont été obtenus 1 mois après la première immunisation.

B. Evaluation de la spécificité des sérums par IFI sur la population parasitaire intra-érythrocytaire

1. Sur globules rouges parasités par *B. divergens*

L'IFI est utilisée en routine au laboratoire pour détecter la présence d'anticorps réagissant avec les stades intra-érythrocytaires de *B. divergens*, selon le protocole détaillé en Annexe 8. La préparation antigénique utilisée est du sang de gerbille parasité ou des globules rouges de mouton parasités issus de culture *in vitro*, par la souche Rouen F5 de *B. divergens*.

Cette technique a été utilisée, avec le même protocole, pour tester les sérums anti-rpBdCCp2 et anti-spBdCCp2 et détecter une éventuelle réaction contre les stades intra-érythrocytaires de *B. divergens* (réaction contre les stades asexués ou mise en évidence de stades sexués).

2. Sur gamétocytes de *P. berghei*

a. Production de gamétocytes de *P. berghei* chez la souris

Cette manipulation a été réalisée au sein du laboratoire de l'USM 0504 Biologie fonctionnelle des protozoaires (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), avec la collaboration de Delphine Depoix.

Des souris ont été infectées par la souche NK65 de *P. berghei* et traitées de manière à produire majoritairement des gamétocytes, selon la méthode décrite par Beetsma *et al.* (Beetsma *et al.*, 1998). Le protocole est détaillé en Annexe 9.

b. IFI sur les gamétocytes de *P. berghei*

Le protocole, différent de celui utilisé précédemment, est détaillé en Annexe 10. En résumé, le sang contenant les gamétocytes a été fixé en formaldéhyde puis déposé sur lame. Sur la préparation antigénique perméabilisée et saturée, un double marquage a été utilisé : d'abord l'un des 2 sérums à tester (anti-rpBdCCp2 ou anti-spBdCCp2), puis un sérum anti-PDI (Florent *et al.*, 2000; Mouray *et al.*, 2007) qui marque le réticulum des gamétocytes de *P. berghei* (D. Depoix, communication personnelle). Puis le marquage spécifique a été mis en évidence avec les anticorps secondaires correspondants couplés à des fluorochromes. Les lames montées ont été observées sur un microscope inversé à immersion (x100).

C. Recherche des stades sexués de *B. divergens* par Western Blot

1. Analyse de la population parasitaire intra-érythrocytaire

Des parasites de différentes origines ont été analysés par Western Blot avec les 2 sérums produits (anti-rpBdCCp2 ou anti-spBdCCp2) pour rechercher la présence de BdCCp2. les échantillons sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Echantillons de *B. divergens* analysés par Western Blot pour rechercher la présence de la protéine BdCCp2

Parasites produits <i>in vitro</i>		Parasites isolés <i>in vivo</i>	
Isolats et souches	Echantillon	Isolat	Echantillon
Rouen F5	mérozoïtes		
1802A	mérozoïtes		
7211B	mérozoïtes		
Rouen F5	GRP MT		
1802A	GRP MT		
7211B	GRP MT		
135	GRP MT	135	GRP gerbille
135	GRP BV	135	GRP BV avant imid.
		135	GRP BV après imid.
Rouen F5	GRP MT		
Rouen F5	GRP MT avec imid.		
Rouen F5	GRP MT choc thermique		
Rouen F5	GRP MT avec ac. xanthu.		
Bob2A	GRP BV avant gorgeur		
Bob2A	GRP BV après gorgeur		

MT : mouton ; BV : bovin ; avant/après imid. : sang du veau n°3243 avant et après traitement à l'imidocarbe ; avec imid. : culture avec ajout d'imidocarbe dans le milieu (cf. V.A.2) ; choc thermique : culture maintenue à 4°C une nuit (cf. V.A.3) ; avec ac. xanthu. : culture avec ajout d'acide xanthurénique dans le milieu (cf. V.B.1) ; avant/après gorgeur : culture avant et après l'utilisation dans un gorgeur.

2. Analyse de tubes digestifs de tiques infectées

Des tiques infectées expérimentalement ou récoltées sur animaux ont été analysées par Western Blot avec le sérum anti-rpBdCCp2, pour rechercher la présence de BdCCp2 dans

leur tube digestif. Pour cela, les tiques ont été disséquées selon la méthode décrite précédemment (cf. IV.C.2.a).

Les tubes digestifs de 4 tiques partiellement gorgées, infectées expérimentalement *in vitro* par la souche Bob2A (cf. III.B.1.) et de 34 tiques récoltées en cours de gorgement sur les vaches de l'élevage de La Verrie (cf. I.C.3.) ont été analysés individuellement de cette façon.

3. Technique de Western Blot

Les échantillons analysés sont conservés congelés à -20°C , avec addition de Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) (3 μL pour 250 μL de culot d'hématies) pour éviter les dégradations protéiques.

Les échantillons sont lavés avec 1 mL de PBS, lysés avec 1 mL de saponine (Sigma) à 0,01% à température ambiante, puis lavés 3 fois avec 1 mL de PBS. Les culots sont traités avec un volume équivalent de Tampon de Traitement 1X pour SDS-PAGE (cf. Annexe 11) 5 min à 100°C , transférés sur glace et centrifugés brièvement.

Pour chaque échantillon, 20 μL de surnageant a été déposé par puits dans un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 8% d'acrylamide. Le protocole de SDS-PAGE est détaillé en Annexe 11. Les échantillons sont séparés en conditions dénaturantes, pendant 3 h de migration à 200 V, laissant ainsi les protéines de faible poids moléculaire (<30 kDa) sortir du gel et permettant une meilleure séparation des protéines dans la gamme de poids moléculaire attendue (environ 185 kDa, poids moléculaire de PfCCp2).

Les protéines séparées sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose, pendant 3 h minimum, à 50 mA, selon le protocole détaillé en Annexe 12.

Pour visualiser les protéines transférées, la membrane de nitrocellulose est colorée de façon réversible au Rouge Ponceau (Ponceau S Concentrate, Sigma). La membrane est plongée dans la solution de colorant 5 min, les protéines repérées selon les besoins, puis la membrane est décolorée à l'eau.

Les protéines sont révélées, à l'aide de différents anticorps, selon le protocole détaillé en Annexe 13. En résumé, la membrane de nitrocellulose est saturée, l'anticorps primaire (sérum anti-rpBdCCp2 et anti-spBdCCp2) est fixé, puis mis en évidence par un anticorps secondaire, révélé par un substrat chromogène. Le poids moléculaire des protéines mises en évidence est calculé grâce au marqueur de poids moléculaire, selon la formule $\log(\text{poids moléculaire}) = f(R_f)$, où f est une régression polynomiale d'ordre 3 et R_f le rapport hauteur de migration de la protéine / hauteur de migration totale (Winston, 1989).

D. Recherche des stades sexués de *B. divergens* par immunohistochimie dans des tiques

Des tiques partiellement gorgées, infectées expérimentalement *in vitro* par la souche Bob2A (n = 3) ou *in vivo* sur les veaux n°3243 (n = 1) et 6805 (n = 1) ont été analysées par immunohistochimie. Les sérums anti-rpBdCCp2 et anti-spBdCCp2 ont été utilisés pour cela, dans le but de détecter la protéine BdCCp2 dans le tube digestif des tiques. Des tiques partiellement gorgées sur veau sain (n = 2) ont été utilisées comme témoin négatif.

Les expériences de marquage immunohistochimique ont été réalisées en collaboration avec Thibaut Larcher (APEX, UMR 703, INRA/ENVN).

Les tiques entières ont été fixées 48 h dans le formol. Leur inclusion en paraffine a été réalisée en suivant le mode opératoire classique. Des coupes longitudinales de tiques, d'une épaisseur de 4 µm ont été réalisées et déposées sur lames.

Le protocole détaillé de la réaction immunohistochimique est indiqué en Annexe 14. En résumé, les coupes sont déparaffinées, puis les antigènes sont démasqués par un traitement à la trypsine et la préparation est saturée avec du sérum de chèvre. Les antigènes tissulaires sont détectés par un anticorps primaire (sérums de lapin ou de cobaye) non marqué, suivi d'un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin ou de cobaye, lui-même marqué par la Biotine. Ensuite, la coupe histologique est exposée à un complexe préformé de Streptavidine conjugué à une enzyme : la peroxydase. Un substrat chromogène de l'enzyme, le DAB (diaminobenzidine) est incubé sur la coupe et un produit de réaction colorée (marron ou rouge) permet de visualiser le complexe antigène-anticorps-enzyme.

Chapitre 3 : Etude des sporozoïtes de *B. divergens*

I. Production et collecte de tiques infectées

Afin d'optimiser les chances d'obtenir des sporozoïtes de *B. divergens* dans les glandes salivaires d'*I. ricinus*, les différents stades de tique ont été soit infectés avec de fortes doses de parasites par différentes procédures, soit récoltés sur des vaches laitières potentiellement infectées.

A. Infections expérimentales de tiques *in vitro*

Les gorgements sur membrane permettent de contrôler la parasitémie du repas sanguin de la tique et de le maintenir autour de 5 à 10%. Par cette méthode, 168 larves et 10 adultes ont été gorgées avec du sang infecté par la souche Bob2A.

B. Infections expérimentales de tiques sur gerbilles parasitées

La durée du repas sanguin des larves et des nymphes sur gerbilles (3 jours en moyenne) a permis des gorgements de tiques sur ces animaux, durant une période de parasitémie forte et croissante (1 à 15 % en moyenne). Les 5530 larves gorgées sur des gerbilles infectées avec 4 isolats différents, ont donc ingéré de grandes quantités de parasites tout au long de leur gorgement.

C. Infections expérimentales de tiques sur moutons

Les moutons utilisés (n°3464 et 3490), porteurs asymptomatiques de l'isolat Rouen 1987 de *B. divergens*, ont permis de gorger 23 femelles adultes.

D. Infections expérimentales de tiques sur veaux

Les résultats des infections expérimentales des veaux splénectomisés n°3243 et 6805, ainsi que les récoltes de tiques gorgées sur ces veaux sont représentés sur la Figure 15.

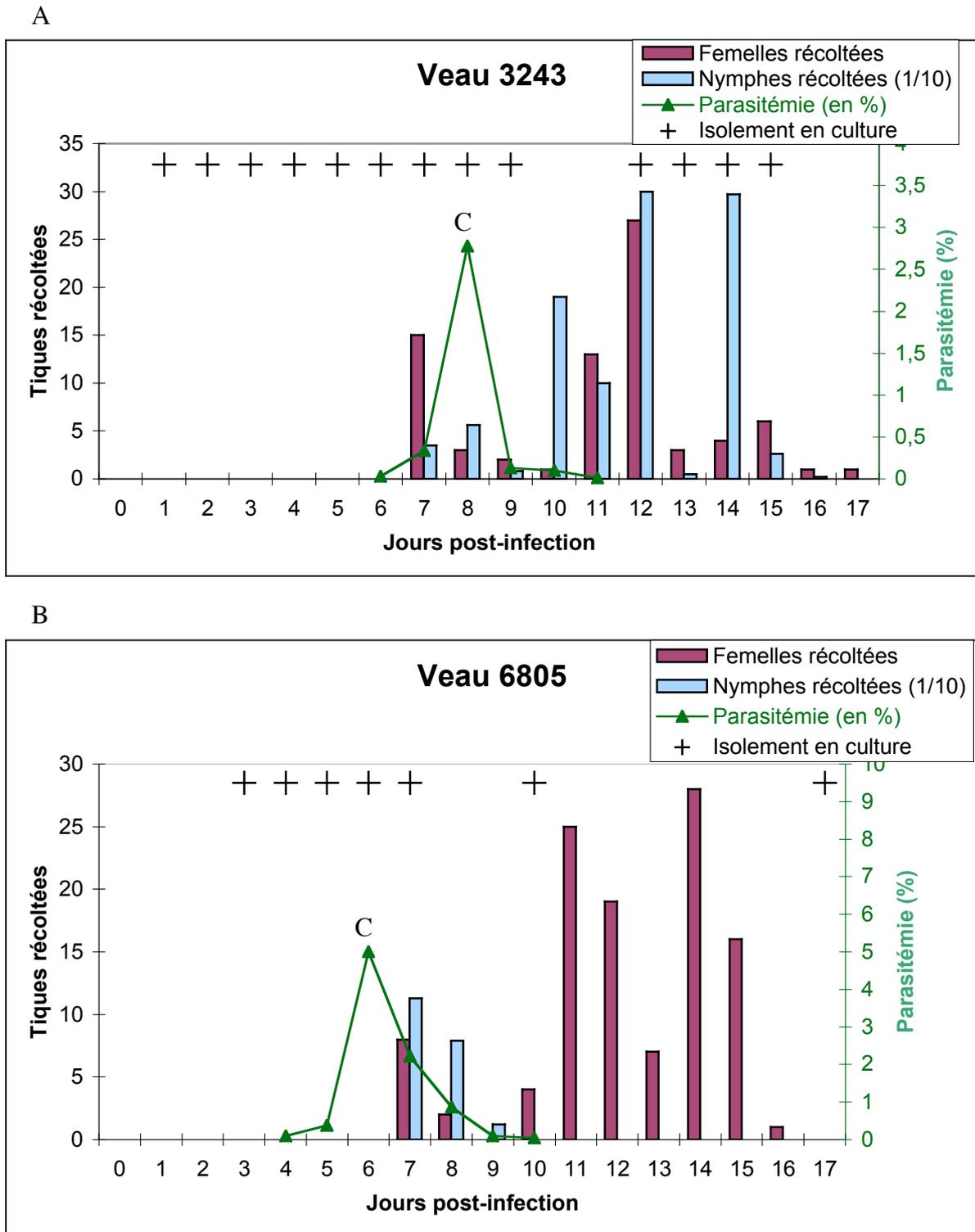


Figure 15 : Suivi des récoltes de tiques *I. ricinus* gorgées et de l'infection des veaux n°3243 et 6805 par *B. divergens* (isolats 135 et C139 respectivement)

Les barres indiquent le nombre d'adultes et de nymphes (à multiplier par 10) récoltées sur les veaux n°3243 (A) et 6805 (B). Les courbes vertes montrent la parasitémie des veaux, mesurée sur étalement sanguin, les C indiquent les dates de traitement à l'imidocarbe et les + les dates où le parasite a été isolé en culture.

L'infection suivie quotidiennement par étalement sanguin montre que le pic de parasitémie a eu lieu à J8 post-infection pour le veau n°3243 et à J6 pour le veau n°6805. A ces dates, un traitement à l'imidocarbe a été effectué, expliquant l'absence de détection du parasite par étalement mais aussi par culture durant les jours suivants. Pour les dates où le parasite n'était pas détectable sur étalement sanguin, la culture a cependant mis en évidence la présence de *B. divergens* dans le sang des veaux (n°3243 : J1 à 9 et 12 à 15 et n°6805 : J3 à 7, 10 et 17), ce qui équivaut à un portage à une faible parasitémie (<1 pour 10 000). Même si certains points étaient négatifs, l'isolement de *B. divergens* en culture, même après le traitement babésicide, et ce jusqu'à la fin de l'expérience (J17 post-infection) prouve en effet sa présence en continu. Les femelles gorgées (114 pour le veau n°6805 et 76 pour le n°3243) et les nymphes (204 pour le veau n°6805 et 759 pour le n°3243) ont été récoltées à réplétion, à différents temps. Les tiques ont donc ingéré des quantités variables de parasites.

E. Collecte de tiques sur des vaches laitières

En parallèle des infections expérimentales de tiques, des collectes sur le terrain ont été réalisées afin d'étudier des populations d'*I. ricinus* en conditions naturelles d'infection par *B. divergens*. Deux élevages de vaches laitières ont été choisis pour cela, à Machecoul et à La Verrie.

La proportion de tiques infectées par *B. divergens* dans l'exploitation de La Verrie a été évaluée, par PCR nichée sur tiques entières. Trente adultes entières (issues de nymphes gorgées récoltées sur les vaches) ont été analysées : 14 tiques ont révélé la présence d'ADN de *B. divergens*, soit 46%. Dans le cadre d'une autre étude, l'analyse de 122 nymphes prélevées sur les pâtures a montré que 80% d'entre elles étaient infectées par *B. divergens*. Dans cet élevage, sur les 25 vaches laitières présentes le jour de la collecte, 324 tiques adultes en cours de gorgement ont été récoltées, présentant une gamme de poids allant de 3 à 398 mg.

Dans l'élevage de Machecoul, 36 puis 22 adultes ont été récoltées, en cours de gorgement sur les vaches. Des femelles replètes ont aussi été récoltées sur les animaux et mises à la ponte. Parmi celles-ci, 8 femelles ont vu leurs descendances analysées, puisque les bovins (n°6510 et 6484) sur lesquels elles s'étaient gorgées étaient porteurs de *B. divergens* (isolats Mac59 et Mac63).

II. Capacité infectante d'*I. ricinus* après acquisition et transmission trans-stadiale de *B. divergens*

A partir de toutes les expériences d'infections de tiques *in vivo* et de celles réalisées *in vitro*, des essais de retransmission du parasite par les stades suivants de tiques ont été réalisés. Les premiers tests n'impliquant que la transmission trans-stadiale du parasite, ont été réalisés en infectant un stade de tique et en analysant la capacité du suivant à transmettre *B. divergens* (cf. Figure 12). L'infection expérimentale *in vitro* des tiques à tous les stades a été validée par amplification PCR de l'ADN du parasite lors d'une étude réalisée au laboratoire (Bonnet *et al.*, 2007b) ; ces résultats ne sont pas présentés ici et apparaissent dans l'article 1 présenté en Annexe 1. Seules les analyses de la retransmission par des tiques infectées expérimentalement sont détaillées ici.

A. Acquisition par la larve et retransmission par la nymphe

1. Analyse de la retransmission *in vitro*

La transmission par des nymphes, infectées *in vitro* et *in vivo* au stade larvaire par 3 souches différentes, a été étudiée par analyse du sang contenu dans le gorgéur, sur lequel un mélange de nymphes s'est nourri. L'observation de l'étalement sanguin et la mise en culture du sang (suivi pendant 3 semaines, délai qui permet la multiplication de parasites éventuellement présents) réalisées quotidiennement se sont avérées négatives pendant les 10 jours nécessaires au gorgement (Tableau 9).

Tableau 9 : Infection de larves d'*I. ricinus* sur gorgéur et sur gerbilles et retransmission par les nymphes *in vitro*

Infection des larves			Retransmission par les nymphes		
Modes de gorgement infectant	Souche de <i>B. divergens</i>	Nombre de larves infectées	Mode de retransmission	Nombre de nymphes exploitées	Mise en culture des GR du gorgéur
Gorgéur	Bob2	168	Gorgéur	27	-
Gerbille (n=6)	Rouen F5	61		17	
		144		17	
		118		17	
	0904B G9	40		17	
		110		17	
		131		17	

2. Analyse de la retransmission *in vivo*

Des nymphes, infectées *in vivo* au stade larvaire par 3 isolats de *B. divergens*, ont été gorgées sur des gerbilles splénectomisées. Le suivi de la parasitémie des gerbilles pendant toute la durée du gorgement et la mise en culture du sang des gerbilles (après le gorgement des tiques) n'ont révélé aucun développement parasitaire dans les érythrocytes. A titre de contrôle supplémentaire, des nymphes entières infectées au stade larve mais non gorgées (mêmes lots, nombre indiqué dans le Tableau 10) ont été analysées par PCR nichée : la présence d'ADN de *B. divergens* n'a pas été détectée. Les données de ces expériences sont indiquées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Infection de larves d'*I. ricinus* sur gerbilles et retransmission par les nymphes *in vivo*

Infection des larves			Retransmission par les nymphes			Analyse du statut infecté par PCR nichée
Modes de gorgement infectant	Isolat de <i>B. divergens</i>	Nombre de larves infectées	Mode de gorgement des nymphes	Nombre de nymphes récoltées	Développement parasitaire (gerbille et culture)	
6 Gerbilles	5311B	3604	2 gerbilles	91 & 70	- & -	- (14)
2 Gerbilles	1802A	753	gerbille	69	-	nr
2 Gerbilles	Rouen F5	569	gerbille	46	-	- (5)

B. Acquisition par la nymphe et retransmission par l'adulte

Pour cette analyse, des nymphes ont été gorgées sur le veau infecté n°6805. La validation de la retransmission par 31 adultes a été réalisée par recherche de la présence du parasite dans les glandes salivaires (observation microscopique et PCR nichée). Pour cela, les 31 femelles ont été partiellement gorgées sur le veau sain n°8818, pendant des durées différentes (3 à 6 jours), la durée de gorgement pouvant influencer la différenciation parasitaire et donc la présence de sporozoïtes. Le poids des tiques à la récolte est indiqué sur la Figure 16.



Figure 16 : Poids des tiques *I. ricinus* partiellement gorgées sur le veau n°8818, en fonction de la date de gorgement

Les 31 échantillons se sont révélés négatifs : aucun sporozoïte de *B. divergens* n'a été observé au microscope *in situ* et aucune amplification d'ADN parasitaire par PCR nichée n'a été obtenue. De plus, le suivi de l'infection du veau (par étalement sanguin et mise en culture du sang) a montré l'absence de développement parasitaire.

III. Capacité infectante d'*I. ricinus* après acquisition, transmission trans-ovarienne et trans-stadiale de *B. divergens*

Une démarche longue d'infections expérimentales (environ un an entre l'adulte d'une génération et l'adulte de la suivante) a été réalisée pour reprendre les conditions utilisées dans la littérature ayant permis l'étude de la transmission expérimentale *in vivo* de *B. divergens* par *I. ricinus* (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975). Dans ces expériences, le stade infecté était l'adulte et suite à la transmission trans-ovarienne et trans-stadiale, il a été démontré que les stades larves nymphe et adulte de la génération suivante pouvaient retransmettre le parasite. Dans les travaux réalisés ici, les adultes ont été infectées de différentes façons : par infection *in vitro*, ou sur moutons et veaux infectés expérimentalement (cf. Figure 13).

A. Retransmission par les larves

1. Analyse de la retransmission *in vitro*

Les premiers essais ont été réalisés sur 8 adultes infectées *in vitro* par la souche Bob2A de *B. divergens* (Bonnet *et al.*, 2007b). Issues de la ponte d'une seule de ces adultes (n°F3), 180

larves ont été nourries sur un gorgeur, contenant du sang sain. Le sang, récupéré dans le gorgeur tout au long du gorgement, a été mis en culture. Le suivi des cultures pendant 3 semaines n'a jamais montré de développement parasitaire. De l'ADN de *B. divergens* a toutefois été détecté par PCR simple dans les œufs et les larves du même lot (une seule femelle) (Bonnet *et al.*, 2007b) (cf. Tableau 11, ligne 1).

La même expérience a été réalisée avec 18 larves, provenant d'une femelle infectée *in vitro* par la souche Bob2A, lors d'une autre expérience. Les mises en culture du sang récupéré dans le gorgeur ont aussi été négatives. L'analyse par PCR des œufs du même lot a donné, cette fois, des résultats négatifs.

2. Analyse de la retransmission *in vivo*

Par la suite, tous les essais de transmission *in vivo* par les larves ont été réalisés sur gerbilles splénectomisées comme décrit par Lewis et Young (Lewis & Young, 1980). L'ensemble des essais réalisés et des résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Essais d'infection de gerbilles splénectomisées par des larves d'*I. ricinus*, issues d'adultes infectées expérimentalement

Infection des adultes			Analyse de la descendance et retransmission par les larves					
Mode de gorgement des adultes	Isolat de <i>B. divergens</i>	Nombre d'adultes gorgés	Ref.	PCR O	PCR L	Nombre de larves récoltées	Infection des gerbilles	Culture sang de gerbille
Gorgeur	Bob2A	8	F3	+	+	150 & 150	-* & -§	nr
Mouton n° 3464 Mouton n° 3490	RouenF5	23	C	-	-	380	-	-
			D	-	-	385	-	-
			H	-	nr	229	-	-
			R	-	-	406	-	-
			M ⁵	-	nr	259	-	-
			S	-	-	90	-	-
Gorgeur	Bob2A	2	179	+	+	52	-	nr
Veau n° 6805	C139	114	7	+++++	++	317	-	-
			8	+++++-	++	493	-	-
			20	+--	-	845	-	-
			21	+--	-	217 & 210	- & -	- & -
			24	+	-	195	-	-
			31	+	-+	312	-	-
			32	--	+++	278	-	-
			34	--	--	548	-	-
			35	+--	-	592	-	-
			37	++-	-	448 & 250	- & -	- & -
			38	+++	--	433	-	-
			39	+--	++	84	-	-
			40	+--	--	278	-	-
			42	++---	+	75	-	-
			43	++---	-	226 & 272	- & -	- & -
103	--	+	397	-	-			
Veau n° 3243	135	76	120	-+	++	235	-	-
			126	--	--	153	-	-
			130	--	--	353	-	-
			133	+--	+	337	-	-
			148	-+	-	265	-	-
			159	++-	-	199	-	-
			160	+--	--	83	-	-
			163	++-	-	73	-	-
			172	--	--	522	-	-
			181	--	+	185	-	-
184	++	-	263	-	-			

Ref. : référence du lot de larves, correspondant à une femelle infectée (sauf M⁵, mélange de larves issues de 5 femelles infectées) ; * et § : gerbilles non splénectomisées (§ : gerbille immunodéprimée par injection de corticoïdes) ; PCR O/L : résultats des tests de détection de *B. divergens* par PCR réalisée sur les œufs/ les larves (le nombre de signes + ou - pour chaque ligne indiquant le nombre de tests par PCR sur le lot). Dans la première partie du tableau les tests ont été réalisés par PCR simple sur le gène 18S, dans la deuxième partie, par PCR nichée sur le gène *bdccp2*.

Malgré les différentes méthodes d'infection utilisées pour les adultes (*in vitro* ou *in vivo*, portage asymptomatique ou infection clinique), aucune expérience n'a permis la transmission de *B. divergens* par les larves aux gerbilles. Pour de nombreux lots, l'infection des tiques a pourtant été confirmée par la présence d'ADN parasitaire dans la descendance de la femelle (détection par PCR nichée dans les œufs et les larves du lot), après transmission trans-ovarienne. Mais même dans ces cas-là, les larves infectées se sont révélées incapables de retransmettre *B. divergens*. De plus, le gorgement d'un grand nombre de larves infectées (493 par exemple dans le cas de la femelle 8) n'a pas permis non plus d'infecter la gerbille par *B. divergens*.

La génération complète issue des femelles infectées expérimentalement sur les veaux n°6805 et 3243 a été exploitée par la suite pour analyser la retransmission de *B. divergens*. Suite aux échecs de la retransmission parasitaire par les larves sur les gerbilles, les nymphes puis les adultes de certains lots ont été analysées, pour mettre en évidence une éventuelle amplification parasitaire au fil des stades. Les nymphes ont été analysées en pool de 10 par PCR nichée. Seules les lignées testées positives ont été exploitées par la suite (n° 7, 8, 20, 32, 34, 35, 40, 42, 43, 103, 120, 126, 130, 133, 148, 172, 181), pour augmenter les chances de mise en évidence de la retransmission.

B. Retransmission par les nymphes

Des nymphes (issues de la descendance des femelles infectées sur les veaux n°6805 et 3243) ont été gorgées sur le veau n°8818, en 2 lots déposés séparément. La retransmission parasitaire a été évaluée par le suivi de l'infection du veau tous les 2 jours (étalement sanguin et mise en culture). Les données de cet essai sont indiquées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Retransmission par des nymphes d'*I. ricinus* sur le veau n°8818

Lot n°	Veau infecté par <i>B. divergens</i>	N° des femelles correspondantes	Nombre de nymphes gorgées récoltées	Infection du veau
1	3243	120, 126, 130, 133, 148, 172, 181	445	-
2	6805	7, 8, 20, 32, 34, 35, 40, 42, 43, 103	480	-

L'observation directe des étalements sanguins n'a pas permis de détecter la présence de parasites dans le sang du veau. De plus, le suivi des cultures pendant 3 semaines n'a mis en

évidence aucun développement parasitaire. Aucune retransmission parasitaire n'a donc été observée lors de cette expérience.

Par ailleurs, les glandes salivaires d'autres nymphes du lot 2 ont été analysées pour rechercher directement le parasite *in situ*. Après un gorgement partiel sur le veau 8840, les nymphes ont été disséquées et les glandes salivaires isolées. Pour une partie des individus, les glandes salivaires ont été broyées en pool ; pour l'autre partie, les glandes salivaires ont été analysées par la méthode d'Ozaki. Les deux types d'extraits de glandes salivaires ont été observés au microscope, mis en culture et analysés par PCR nichée. Les résultats, toujours négatifs, sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Analyse des glandes salivaires de nymphes d'*I. ricinus* (lot 2) partiellement gorgées sur le veau n°8840

	Nombre de nymphes dont les glandes salivaires ont été poolées pour analyse	Observation microscopique	Mise en culture	PCR nichée
GS broyées	2	-	-	-
	2	-	-	-
	5	-	-	-
	5	-	-	-
Tube d'Ozaki	14	-	-	-
	20	-	-	-
	20	-	-	-
	13	-	-	-

L'infection du veau a aussi été suivie par mise en culture du sang, cette méthode n'a pas permis de mettre en évidence la transmission de parasites par les tiques.

C. Retransmission par les adultes : recherche de sporozoïtes dans les glandes salivaires

Finalement, les femelles adultes issues du lot 2 ont été analysées. Après un gorgement partiel (3 à 7 jours) sur le veau n°8840, les glandes salivaires de 59 femelles ont été disséquées, broyées, observées et l'extrait obtenu a été mis en culture. Aucun sporozoïte n'a été visualisé directement dans les glandes salivaires. Les cultures ont été suivies pendant 2 semaines et aucun développement parasitaire n'a pu être observé.

Le suivi de l'infection du veau, réalisé par mise en culture du sang, n'a pas montré de parasites.

Les données concernant les résultats de PCR nichée sur ce lot de tiques infectées (nymphe analysées entières et individuellement, adultes du même lot analysées soit entières soit leurs glandes salivaires isolées après dissection) sont résumées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Analyse par PCR nichée d'*I. ricinus* infectées (lot 2) : nombre de positives/nombre analysées

Ref.	Nymphes	Adultes	Glandes salivaires
7	8/10		
8	10/10		
20	6/6		
32	1/10		
34	10/10	30/30	0/28
35	4/10		
40	9/10		
42	nr		
43	4/10		
103	0/10		

Alors que l'ADN parasitaire a été amplifié par PCR dans 60% des nymphes et dans 100% des adultes entières, le parasite n'a été détecté dans aucune glande salivaire des adultes du même lot.

IV. Analyse de tiques issues de populations infectées naturellement

En parallèle des infections expérimentales réalisées au laboratoire, des tiques ont été collectées sur le terrain, dans des endroits où *B. divergens* circule (Machecoul et La Verrie). Ces tiques potentiellement infectées naturellement ont été analysées pour mettre en évidence la retransmission parasitaire.

A. Essais de retransmission par des larves issues d'adultes gorgées sur bovins infectés

De la même façon que précédemment (cf. III.A.2.), des larves issues de 8 femelles adultes gorgées sur bovin porteur asymptomatique (n°6510 et 6484) ont été gorgées sur 2 gerbilles splénectomisées.

Sur une gerbille, 583 larves, issues de 7 femelles différentes gorgées sur le bovin porteur n°6510, ont été gorgées. Sur une autre gerbille, 183 larves issues d'une seule femelle gorgée sur le bovin porteur n°6484 ont été gorgées. Les gerbilles n'ont pas été infectées et les cultures de leur sang n'ont mis en évidence aucun développement parasitaire.

Des œufs, dont ces larves étaient issues, analysés en PCR simple avaient donné des résultats négatifs.

B. Mise en évidence des sporozoïtes dans les glandes salivaires d'adultes

1. Tiques collectées à Machecoul

Pour les premiers essais, 36 femelles partiellement gorgées ont été disséquées. Une des 2 glandes salivaires de chaque individu a été mise en culture telle quelle, sans aucun traitement. Après 3 semaines de suivi des cultures, aucun développement parasitaire n'a été observé *in vitro* dans les globules rouges. Toutes les glandes salivaires restantes ont été analysées par PCR : la présence d'ADN parasitaire n'a été montrée dans aucun échantillon.

Dans les glandes salivaires de la deuxième série de tiques provenant de cet élevage, les sporozoïtes ont été recherchés par la méthode d'Ozaki. Réunis en 2 lots, 22 individus ont été analysés. Comme précédemment, une seule glande salivaire a été analysée et l'autre testée en PCR. Pour les 2 lots, aucun sporozoïte n'a été visualisé et aucun développement parasitaire n'a été observé en culture de globules rouges. Les PCR se sont révélées aussi négatives.

2. Tiques collectées à La Verrie

Les résultats présentés ici font référence à ceux publiés dans l'article 2 présenté en Annexe 15 (Becker *et al.*, 2009).

Les adultes partiellement gorgées récoltées sur les vaches laitières de l'exploitation de La Verrie ont été analysées pour rechercher la présence de *B. divergens* dans leurs glandes salivaires. Les 2 glandes salivaires de 223 tiques (4,7 à 339 mg) ont été isolées, broyées et observées au microscope. Les glandes salivaires de 3 tiques (de poids respectif : 11,7 ; 25,3 et 277 mg) contenaient des milliers de sporozoïtes, facilement reconnaissables après coloration par leur taille et leur forme en poire (Figure 17).

Pour les 3 tiques, l'analyse par PCR simple et le séquençage des produits amplifiés ont permis l'identification de l'espèce *B. sp.* EU1 dans les extraits de glandes salivaires.

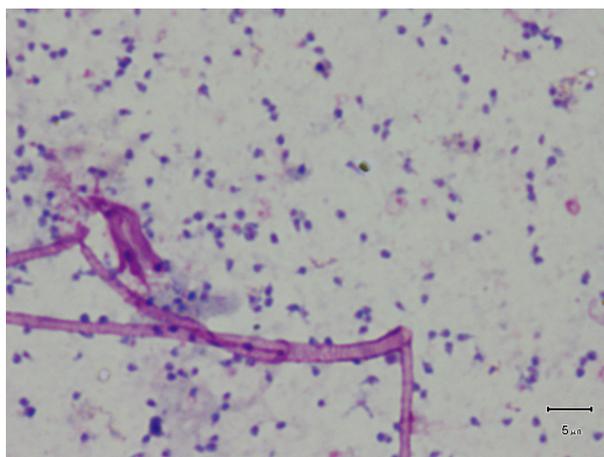


Figure 17 : Sporozoïtes de *Babesia* sp. EU1 mis en évidence dans les glandes salivaires d'*I. ricinus* adultes

Les suspensions de glandes salivaires de ces 3 individus ont été mises en culture (érythrocytes bovins et ovins). Au bout de 3 jours, des parasites intra-érythrocytaires ont été observé (1‰) dans les 3 cas, mais uniquement dans les globules rouges ovins. Une culture de forte parasitémie (Figure 18) a pu être établie au bout de 3 semaines. Pour les 3 cultures, l'analyse par PCR des parasites intra-érythrocytaires et le séquençage des produits amplifiés (gène 18S complet, amorces CryptoF et CryptoR, (Duh *et al.*, 2005)) a confirmé l'identité du parasite : *B. sp.* EU1 déjà identifié dans les extraits de glandes salivaires.

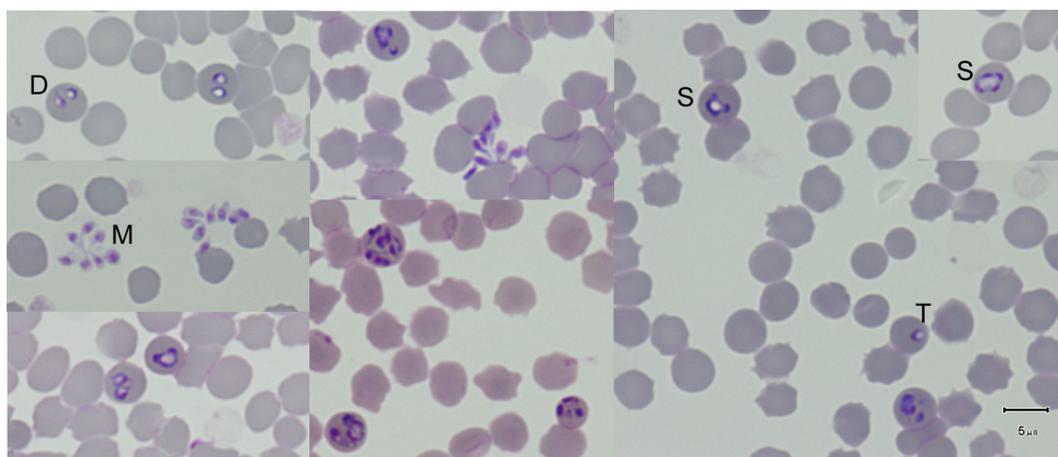


Figure 18 : *Babesia* sp. EU1 intra-érythrocytaires obtenus par mise en culture des sporozoïtes contenus dans l'extrait de glandes salivaires d'*I. ricinus*

D : formes de divisions ; M : mérozoïtes ; S : schizonte-like ; T : trophozoïte.

Les glandes salivaires de 41 tiques pour lesquelles aucun sporozoïte n'avait été visualisé ont été mises en culture dans les mêmes conditions. Aucun développement parasitaire *in vitro* n'a été mis en évidence pour ces échantillons.

Des PCR nichées ont été réalisés sur les glandes salivaires de 43 autres tiques dans lesquelles aucun sporozoïte n'avait été observé. Tous les résultats ont été négatifs.

V. Discussion

Les sporozoïtes de *Babesia* spp. constituent le stade essentiel à la transmission parasitaire, de la tique vectrice vers l'hôte vertébré. Ces formes parasitaires sont formées par sporogonie dans les glandes salivaires de la tique, et ce en très grande quantité à partir de sporoblastes (Mehlhorn & Schein, 1984). Les sporozoïtes sont injectés au vertébré, via la salive lors du repas sanguin. Dans l'hôte vertébré, ils infectent directement les globules rouges et sont à l'origine des phases de multiplications asexuées intra-érythrocytaires du parasite.

Pour toutes les études sur la transmission parasitaire, que ce soit d'un point de vue qualitatif ou quantitatif, il est nécessaire de connaître la biologie des sporozoïtes. Alors que la compétence vectorielle d'*I. ricinus* est établie depuis près de 50 ans (Joyner *et al.*, 1963), ces stades parasitaires n'ont jamais été observés, ni isolés, pour *B. divergens*. Le but de la première partie de cette thèse était donc de visualiser et d'isoler les sporozoïtes à partir des organes de transmission (les glandes salivaires) de la tique, avec pour objectif, entre autres, de les quantifier et d'étudier leur cinétique de production, chez les différents stades du vecteur.

Pour qu'une tique puisse transmettre le parasite, il est premièrement nécessaire que celle-ci soit infectée et donc qu'elle ait ingéré, à un stade précédent, des stades de transmission du parasite (gamétocytes) et que le parasite ait effectué son développement dans le vecteur. Il faut deuxièmement que la tique soit infectante et donc que des sporozoïtes soient produits dans les glandes salivaires et transmis au cours du repas sanguin. Si la réalisation de la première étape peut être prouvée par des techniques de PCR sur tiques entières (après la mue suivant un gorgement infectant), celle de la seconde étape ne peut être validée que par l'infection réussie d'un hôte vertébré piqué ou par la preuve de la présence des sporozoïtes dans les glandes salivaires (visualisation, culture, PCR). Pour étudier ce statut infectant des tiques, environ 6000 tiques *I. ricinus* infectées, à tous les stades (larve, nymphe, adulte) et selon des modalités différentes (infections expérimentales *in vitro* et *in vivo* et infections naturelles) ont été produites. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'analyse des stades issus de ces tiques infectées (environ 14000 tiques analysées) : retransmission, analyse des glandes salivaires à la fois par observation microscopique, mise en culture et PCR. Malgré l'étendue de ces essais, aucun sporozoïte ni aucune transmission de l'espèce *B. divergens* n'a pu être mis en évidence pour *I. ricinus*, quelle que soit l'approche utilisée. Les résultats obtenus pour le couple *I. ricinus/B. sp. EU1* contrastent fortement avec ceux obtenus pour *B. divergens*, puisque l'analyse de seulement 223 tiques adultes en conditions d'infection

naturelle a permis de valider les protocoles utilisés, apportant en outre la preuve de la compétence vectorielle d'*I. ricinus* pour cette espèce (Becker *et al.*, 2009).

Les problèmes de transmission de *B. divergens* rencontrés peuvent avoir des origines différentes, sans que la cause réelle ne soit encore identifiée actuellement. Plusieurs aspects liés aux protocoles expérimentaux utilisés sont discutés ici : le matériel biologique utilisé, les modalités d'infection, les méthodes et les délais d'analyse. Les résultats des protocoles expérimentaux seront ensuite comparés à ceux obtenus pour des tiques naturellement infectées, en particulier avec ceux obtenus pour l'espèce *B. sp.* EU1.

Durant cette étude, tous les isolats de *B. divergens* utilisés étaient d'origine bovine, sauf la souche Rouen 1987 clone F5 d'origine humaine, qui est la plus couramment utilisée au laboratoire. Les parasites utilisés provenant de l'hôte vertébré naturel, les conditions d'infection des tiques étaient ainsi plus proches des conditions naturelles. De plus, 7 isolats différents de *B. divergens* ont été utilisés pour infecter les tiques, afin de s'affranchir d'une éventuelle disparité d'infectivité des isolats parasitaires pour les tiques. Par ailleurs, aucune donnée n'est disponible pour *B. divergens* sur le sujet, mais la perte de la capacité à produire des stades sexués *in vitro* et donc d'infecter le vecteur est décrite chez *P. falciparum* (Talman *et al.*, 2004). L'utilisation, au début de l'étude, de souches maintenues *in vitro* depuis longtemps (Bob2A, Rouen F5) pourrait donc expliquer les résultats négatifs obtenus. Même si l'infectivité des parasites entretenus *in vitro* peut poser problème, il a été démontré qu'*in vivo* *B. divergens* peut rester infectant pour la tique très longtemps, même si aucun passage par le vecteur n'est effectué : après 11 ans de passages sur veaux par injection, la souche utilisée par Donnelly *et al.* a été capable d'infecter et d'être transmise par des tiques (Donnelly & Peirce, 1975). Par la suite, pour l'infection expérimentale des veaux n°6805 et 3243, des isolats n'ayant subi que 1 ou 2 passages en culture ont été utilisés pour infecter les tiques *in vivo*. Au vu de toutes les précautions prises, il apparaît donc peu probable que nos résultats soient liés à un manque d'infectivité des parasites utilisés même si cette hypothèse ne peut être exclue.

Des populations de tiques différentes ont aussi été utilisées pour ces travaux. Au début de la thèse, la majorité des tiques utilisées ont été récoltées sur le terrain, dans des lieux différents (forêts de Rennes, Princé, Clefs et du Gâvre). S'il existe des différences de réceptivité et de capacité vectorielle entre les tiques, les origines différentes des tiques ont pu pallier ce biais. Même si aucune lignée saine n'a été produite en parallèle des lignées infectées expérimentalement pour servir de témoin négatif, l'utilisation de tiques saines du laboratoire a été possible, en milieu de thèse, lorsque l'élevage a été productif. Cela a permis d'intégrer des

témoins négatifs dans les analyses sur glandes salivaires et pour les PCR sur les différents stades.

Les diverses données bibliographiques sur la transmission de *B. divergens* sont en désaccord quant aux stades de tiques capables d'acquérir le parasite, désaccord probablement lié aux méthodes d'analyse. Les premières études sur la transmission biologique de *B. divergens* indiquent que seule la femelle adulte est capable d'acquérir le parasite et que tous les stades suivants sont capables de le retransmettre (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975). Mais les travaux de notre laboratoire ont récemment démontré le passage de l'ADN de *B. divergens* de stade à stade après un gorgement infectant, prouvant ainsi que tous les stades sont capables d'acquérir le parasite en conditions expérimentales (Bonnet *et al.*, 2007b). Pour tenter de clarifier ces données contradictoires, tous les stades d'*I. ricinus* ont été infectés de différentes façons et la retransmission analysée au(x) stade(s) suivant(s).

L'infection des tiques est dépendante de la production des gamétocytes dans les hématies parasitées ingérées. Il est donc envisageable que, dans le cadre des protocoles utilisés ici, la production de gamétocytes ait été un facteur limitant. Dans les cas d'infection expérimentale sur membrane, l'efficacité de l'infection est totalement dépendante de la capacité de *B. divergens* à produire *in vitro* ces formes de transmission. De même, la gerbille et le mouton, utilisés pour infecter des larves et des adultes respectivement, ne sont pas des hôtes naturels de *B. divergens* et pourraient ne pas constituer un environnement favorable à la production des gamétocytes. Toutefois, les études de Mackenstedt *et al.* sur les différentes formes de *B. divergens* ont montré la présence de stades de transmission dans le sang de la gerbille, qui ont ensuite évolué dans la nymphe. Ces observations tendent à prouver que les gamétocytes sont bien produits chez la gerbille (Mackenstedt *et al.*, 1990).

Enfin, afin de se rapprocher au maximum des conditions naturelles d'infection et des travaux déjà réalisés avec succès (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975), des veaux splénectomisés parasités ont été utilisés pour infecter des adultes (et des nymphes) d'*I. ricinus*. Le suivi de l'infection des veaux a permis de distinguer 3 phases différentes, durant lesquelles des tiques se sont gorgées : une phase clinique avec une forte parasitémie, suivie par un traitement babésicide éliminant la majeure partie de la population parasitaire, et finalement un portage asymptomatique du parasite. Premièrement, les infections expérimentales de tiques par *Babesia* spp. sont classiquement réalisées sur un animal présentant une forte parasitémie (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975; Mosqueda *et al.*, 2004b). Deuxièmement, le traitement à l'imidocarbe a été réalisé ici pour diminuer les signes cliniques des animaux et permettre la poursuite du gorgement des tiques. L'effet de ce traitement sur les tiques, sur le parasite et ses stades de transmission est inconnu et reste à

déterminer. Mais chez *P. falciparum*, les anti-paludiques peuvent avoir un effet favorable sur la production de stades sexués (Dyer & Day, 2000). Cela pourrait aussi être le cas pour *B. divergens* lors d'un traitement à l'imidocarbe. Troisièmement, des tiques se sont nourries à la fin de l'expérience sur des veaux en phase de portage parasitaire asymptomatique. Des travaux ont déjà prouvé que ce mode de gorgement est aussi efficace pour l'infection des tiques (Donnelly & Peirce, 1975).

Globalement, ces 3 phases de l'infection des veaux n°6805 et 3243 ont permis une infection efficace des tiques adultes : ceci a été prouvé par les résultats positifs des PCR sur les œufs, larves, nymphes et adultes de la génération suivante. Les conditions d'infection expérimentales des tiques sur ces veaux correspondent aux différentes situations de gorgement existant naturellement chez le bovin et à celles décrites dans la littérature (au moins pour la première et la dernière phase). C'est pourquoi la majorité des essais de retransmission ont été réalisés sur la descendance des femelles gorgées infectées sur ces 2 veaux.

Pour détecter la présence d'ADN parasite dans les tiques, deux PCR différentes ont été utilisées dans ce travail. Au début, les tiques ont été analysées par PCR simple ayant pour cible le gène de l'ADNr 18S des *Babesia* spp.. Cette réaction de PCR manque très fortement de spécificité. Avec les amorces GF2 et GR2 utilisées, l'ADN de *B. divergens* peut être amplifié, mais aussi celui de *B. sp. EU1*, *B. capreoli*, *Theileria* spp.. Cette PCR n'est donc pas utilisable pour détecter spécifiquement *B. divergens* dans des populations de tiques prélevées sur le terrain. La mise en évidence de nouveaux gènes chez *B. divergens* (cf. Chapitre 4), notamment le gène *bdccp2*, a permis la mise au point d'une PCR nichée spécifique de *B. divergens* et de *B. capreoli* (ces 2 espèces ne différant que d'une base sur la séquence amplifiée) et surtout plus sensible. Ce changement de méthode peut sans doute expliquer que de nombreuses PCR simples réalisées sur des œufs ou des larves provenant d'adultes infectées au début des travaux aient donné des résultats négatifs, alors que beaucoup plus d'échantillons analysés avec la deuxième méthode sont positifs.

La retransmission de *B. divergens* par des tiques infectées peut être déterminée de 2 façons, soit indirectement par la mise en évidence du développement parasite dans le sang de l'animal sur lequel les tiques effectuent leur repas, soit directement par l'analyse du contenu des glandes salivaires et la visualisation des sporozoïtes *in situ*. Il est clair que seules les méthodes indirectes peuvent être utilisées sur les larves (à cause de leur taille), alors que les 2 approches peuvent être réalisées pour étudier la retransmission par les nymphes et les adultes. Les échecs rencontrés ici peuvent être dus à des problèmes de détection des parasites.

Tout d'abord des essais ont été réalisés, *in vivo* et *in vitro*, avec des systèmes reproduisant l'infection du vertébré par la tique, permettant aux parasites d'être transmis et de se multiplier dans des globules rouges. Pour les tests réalisés *in vitro*, la technique de gorgement sur membrane et la mise en culture du sang du gorgeur ont été utilisés. La quantité de sang contenue dans les gorgeurs peut paraître trop importante pour étudier la transmission par quelques tiques, d'autant plus que le sang est changé 1 à 2 fois par jour pendant toute la durée du gorgement. L'observation d'un simple étalement du sang à la sortie du gorgeur ne permet en aucun cas d'attester la présence de parasites transmis par les tiques en raison du faible volume observé. Pour améliorer la sensibilité de cette méthode, à chaque lavage tout le sang récupéré dans le gorgeur a été mis en culture, de façon à permettre la multiplication d'éventuels parasites présents. Le suivi des cultures réalisé pendant 3 semaines permet de confirmer l'absence ou la présence de parasites au départ dans le gorgeur, cette méthode pouvant détecter une parasitémie initiale de $10^{-7}\%$ (Malandrin *et al.*, 2004).

Pour évaluer la retransmission par des larves infectées, la gerbille splénectomisée a été utilisée, comme décrit précédemment (Lewis & Young, 1980). Le seuil de sensibilité de cet animal, non splénectomisé, est d'environ 10^2 à 10^3 parasites injectés (Hentrich & Bose, 1993). La rate jouant le rôle de filtre en éliminant les globules rouges parasités, ce seuil se trouve sans doute fortement abaissé pour un animal splénectomisé. De plus, après le gorgement des tiques, le sang des gerbilles a été mis en culture pour mettre en évidence une éventuelle présence du parasite. Le même seuil de sensibilité est alors applicable : une parasitémie chez la gerbille de $10^{-7}\%$ aurait été détectée.

Les essais de retransmission *in vivo* par les nymphes ont été réalisés sur veau intact, non splénectomisé, alors que les études précédentes ont été faites avec des veaux splénectomisés (Joyner *et al.*, 1963; Donnelly & Peirce, 1975; Lewis & Young, 1980). Même si *B. divergens* ne parvient pas à infecter massivement un veau intact, il est probable que, en cas de transmission par une tique dans les conditions naturelles, quelques parasites se multiplient dans les globules rouges mais que ces cellules parasitées soient filtrées et éliminées rapidement par la rate, évitant ainsi une augmentation de la parasitémie de l'animal. Lors des expériences de retransmission sur les veaux n°8818 et 8840, des prélèvements sanguins ont été réalisés régulièrement tout au long du gorgement des tiques, et le sang mis en culture. Même si très peu de globules rouges circulants étaient parasités, il est probable que cette façon de procéder aurait permis d'isoler des parasites circulants, transmis par les tiques, avec toujours le même seuil de sensibilité ($10^{-7}\%$).

Lors des expériences de Lewis et Young, environ 200 larves étaient utilisées pour infecter une gerbille ; Donnelly *et al.* ont montré que 51 larves, une seule nymphe ou une seule adulte

infectées étaient capables d'infecter un veau splénectomisé. Lors des expériences de retransmission réalisées ici, des quantités bien plus importantes de tiques infectées (statut vérifié par PCR) ont été utilisées : en moyenne 200 à 300 larves infectées par gerbille (nombre pouvant aller jusqu'à 500 environ) et 450 à 500 nymphes sur le veau n°8818. Ces doses potentiellement infectantes importantes n'ont pourtant permis ni l'infection des gerbilles, ni celle du veau.

La deuxième méthode utilisée pour étudier la retransmission consiste à mettre en évidence les sporozoïtes dans les organes de transmission de la tique : les glandes salivaires. Cette technique n'est utilisable que pour tester la retransmission par les nymphes et les adultes. En théorie, la présence des sporozoïtes visibles *in situ* ou l'établissement d'un développement parasitaire intra-érythrocytaire à partir de glandes salivaires en culture attestent le bon déroulement du développement parasitaire au sein de la tique. L'utilisation de ces techniques pour l'analyse des tiques infectées expérimentalement, couplée à l'analyse par PCR des tiques entières et de glandes salivaires isolées, a montré que les tiques sont infectées (PCR positives) mais non infectantes (pas de sporozoïtes).

Il est décrit que les sporozoïtes de *Babesia* spp. ne sont produits dans les glandes salivaires que sous l'influence du repas sanguin de la tique (Mehlhorn & Schein, 1984). Les méthodes utilisées lors de cette thèse ont pris en compte cette cinétique de production des stades de transmission. D'une part, la plupart des expériences de retransmission consistaient en un gorgement des tiques jusqu'à réplétion, pouvant permettre le développement complet du sporoblaste et la transmission des sporozoïtes. D'autre part, pour toutes les expériences où un isolement des glandes salivaires a eu lieu en cours de repas sanguin, les tiques adultes ont été décrochées et analysées après des durées variables et croissantes de gorgement (3 jours minimum, cf. Tableau 2). Comme pour *B. microti* chez *I. dammini*, la production de sporozoïtes aurait dû avoir lieu (Piesman *et al.*, 1986).

Pour certaines espèces de *Babesia* (*B. bigemina* et *B. ovis*), il a été observé que le vieillissement des tiques a une influence sur leur capacité à retransmettre le parasite, celle-ci diminuant avec l'âge de tique (Friedhoff & Smith, 1981). L'exploitation des populations infectées expérimentalement, notamment sur les veaux n°3243 et 6805, a été réalisée dans les délais les plus courts possibles, en lien avec le développement et les transformations des tiques. Entre l'infection des adultes et l'analyse des glandes salivaires des adultes de la génération suivante, 14 mois seulement se sont écoulés, durée bien plus courte que ce qui a lieu en conditions naturelles.

Les résultats des infections expérimentales ont donc montré la présence d'ADN parasite dans des tiques infectées à un stade précédent. Mais la présence de parasites vivants et infectants dans les glandes salivaires n'a jamais été confirmée, quelle que soit la méthode d'analyse de la retransmission (gorgement ou analyse des glandes salivaires). Outre les possibles contaminations des tiques par de l'ADN contenu dans les restes du repas sanguin du stade précédent (Pichon *et al.*, 2003), il existe sans doute un décalage entre détection d'ADN parasite et présence de parasites infectants dans les glandes salivaires. Lors des expériences de transmission réalisées ici, le développement du parasite a probablement été bloqué dans le vecteur. Lors de l'infection expérimentale sur les veaux parasités n°6805 et 3243, l'acquisition du parasite par les femelles a eu lieu, puisque de l'ADN parasite est détecté dans leurs œufs par PCR nichée. Au fur et à mesure des mues, le taux d'infection mesuré dans la population (% d'individus infectés) a augmenté. En effet, les résultats variables obtenus d'une réaction de PCR à l'autre sur un même échantillon (Tableau 11, colonne PCR O) suggèrent que, dans les œufs, la quantité d'ADN parasite était proche du seuil de détection. Les résultats ont été beaucoup plus reproductibles avec les larves et toujours identiques pour les nymphes en pool. Ainsi, malgré une diminution du nombre d'individus analysés par pool à chaque stade, il semble y avoir une augmentation de la quantité d'ADN parasite, détectable de plus en plus facilement par PCR nichée. De même, 60% des nymphes du lot 2 (testées individuellement) étaient infectées, alors que 100% des adultes qui sont issues du même lot étaient positives en PCR. Ces résultats suggèrent une multiplication parasite, dans la tique, au fil des transformations. Mais finalement, dans les glandes salivaires des adultes, aucun sporozoïte n'a été détecté et les PCR ont montré des résultats négatifs à 100%. Il est donc possible que, bien que *B. divergens* ait été présent et vivant dans les tiques, les isolats ou les méthodes utilisés ici aient rendu impossible le développement parasite complet dans la tique et que la phase finale d'invasion des glandes salivaires par les sporokinètes se soit trouvée bloquée.

En parallèle des infections expérimentales réalisées au laboratoire et suite à l'ensemble des résultats négatifs de retransmission par ces populations, des tiques prélevées sur le terrain ont été analysées. Les 2 élevages de vaches laitières qui ont été visités pour cela présentaient des conditions très favorables à la circulation de *B. divergens*. La majorité des animaux étaient porteurs asymptomatiques du parasite, avec une forte prévalence sérologique mise en évidence par IFI. A Machecoul, des cas cliniques ont même été observés en 2005. Les tiques de l'espèce *I. ricinus* étaient de plus très fortement présentes sur les 2 sites. Si tous les stades

d'*I. ricinus* sont capables de transmettre *B. divergens* (Joyner *et al.*, 1963), une étude a néanmoins montré l'importance prépondérante des adultes dans l'apparition des cas cliniques de babésiose bovine (Gray, 1980). Les analyses ont donc été dirigées ici principalement sur les tiques adultes, celles-ci, vu la taille de leurs glandes salivaires, étant le stade le plus facile à étudier.

Les analyses des glandes salivaires de 58 femelles de Machecoul et de 223 femelles de La Verrie (microscopie, culture, PCR) n'ont donné aucun résultat positif pour *B. divergens*. Par contre, des sporozoïtes d'une autre espèce de *Babesia*, *B. sp.* EU1, ont été visualisés, isolés et mis en culture à partir des glandes salivaires des femelles *I. ricinus* prélevées sur le dernier site (Becker *et al.*, 2009). Ce résultat a apporté la preuve que les techniques mises en place pour les sporozoïtes de *B. divergens* sont adéquates.

L'observation des parasites présents dans les glandes salivaires (voir aussi les photos détaillées en Annexe 16) a confirmé la biologie des sporozoïtes de *Babesia* pour l'espèce *B. sp.* EU1. Ces parasites sont formés simultanément en très grand nombre dans les glandes salivaires, sans doute au minimum 10^7 à 10^8 . Les sporoblastes n'ont pas pu être observés. Il n'est donc pas possible de confirmer leur existence ou non chez cette espèce. Toutefois, des formes parasitaires, contenant 2 noyaux, apparemment en division, ont été observées. Il est possible que le mode de formation des sporozoïtes de *B. sp.* EU1 soit identique à celui de *B. canis* (cf. C1.II.A.1.) (Schein *et al.*, 1979).

Les tiques contenant des sporozoïtes de *B. sp.* EU1 dans leurs glandes salivaires étaient à des stades de réplétion variables. Ceci a été estimé par leur poids : de 11,7 à 277 mg. D'après les mesures établies au cours des différents gorgements (cf. Figure 16), cela correspond à un gorgement de 4 jours minimum post-fixation. Cette valeur est cohérente avec le délai nécessaire pour la formation des sporozoïtes rapportées dans les autres espèces de *Babesia* (cf. Tableau 2, C1.II.A.).

La présence de *B. sp.* EU1 dans les glandes salivaires de tiques collectées sur les bovins de La Verrie a été démontrée pour ce parasite zoonotique, dont l'hôte réservoir est pourtant le chevreuil (Duh *et al.*, 2005; Bonnet *et al.*, 2007a). Mais les pâtures de cette exploitation sont entourées de zones boisées et de nombreux cervidés sauvages sont amenés à y passer, participant sans doute à l'entretien de la population de tiques et à son infection. La découverte de ce parasite dans cette exploitation agricole est cohérente avec la présence de ces différents vertébrés.

La mise en évidence réalisée ici des sporozoïtes de *B. sp.* EU1 chez *I. ricinus* en conditions naturelles a apporté la preuve que cette tique est bien le vecteur de cette espèce zoonotique de *Babesia*, comme prouvé expérimentalement dans notre laboratoire (Bonnet *et*

al., 2009). De plus, le développement direct des parasites dans des globules rouges *in vitro* prouve l'appartenance de ce parasite au genre *Babesia* puisque aucun stade pré-érythrocytaire n'est nécessaire au développement dans le vertébré. Il s'agit de la première mise en évidence de sporozoïtes de *Babesia* sp. *s.s.* chez *I. ricinus*, alors que cette tique est le vecteur démontré de plusieurs espèces de *Babesia* connues (*B. divergens*, *B. capreoli*) et certainement inconnues (caractère ubiquiste de cette tique). La mise en évidence des sporozoïtes du genre *Babesia* chez d'autres tiques semble moins délicate (par exemple pour *B. bigemina* et *B. bovis* chez *B. microplus* (Potgieter & Els, 1976; Mosqueda *et al.*, 2004b), ce qui laisse supposer des modalités de transmission particulières aux tiques du genre *Ixodes*.

Les essais d'infections expérimentales de tiques par *B. divergens* réalisés ont permis d'infecter de nombreuses tiques. Mais aucune retransmission parasitaire n'a été possible par les stades issus de ces tiques infectées et les sporozoïtes de *B. divergens* n'ont pas pu être caractérisés. Il est actuellement impossible de préciser quelle étape du développement parasitaire a été bloquée dans la tique. Toutefois, il est clair que le statut infecté d'une tique ne reflète pas son pouvoir infectant pour un hôte vertébré. Les modalités de la transmission parasitaire par *I. ricinus* sont probablement différentes de ce qui est rapporté pour les autres tiques. Pour mettre en évidence, suivre précisément et visualiser les étapes critiques du développement de *B. divergens* dans la tique, la production de parasites mutants, marqués à la GFP fluorescente, pourrait être un outil précieux.

Chapitre 4 : Identification des stades sexués de *B. divergens*

I. Essais d'induction de la différenciation sexuée *in vitro*

Les premiers travaux réalisés au cours de cette thèse ont eu pour objectif d'induire la différenciation sexuée *in vitro*. Différentes conditions, décrites comme potentiellement inductrices pour d'autres espèces de parasites, ont été appliquées *in vitro* à des globules rouges parasités par *B. divergens*. Les étalements réalisés à partir de ces différentes cultures ont été observés au microscope.

Lors de l'ajout d'imidocarbe dans le milieu, toute la population parasitaire observée présentait une allure pycnotique, correspondant à des parasites morts.

L'augmentation du pH du milieu a entraîné une modification des hématies, conduisant à leur lyse et rendant les observations impossibles sur étalement.

La présence de contenu digestif de tiques dans le milieu de culture a beaucoup modifié l'aspect des étalements. Il a été très difficile de distinguer les formes parasitaires, au milieu des éléments cellulaires provenant des tiques.

Dans tous les autres cas (saturation du milieu en formes parasitaires asexuées, choc thermique, ajout d'acide xanthurénique, incubation de la culture à température ambiante), de nombreux parasites présentaient des formes inhabituelles, certains étant vacuolisés ou présentant des protrusions. Les formes observées étaient plutôt évocatrices des parasites en souffrance, voire morts, plutôt que de formes différenciées homogènes.

Toutes ces observations morphologiques directes n'ont pas permis de déterminer avec certitude si des stades sexués avaient été produits *in vitro*, avec ces différentes conditions inductrices.

Pour l'étude des stades de transmission de *B. divergens* du vertébré au vecteur, des marqueurs moléculaires de ces formes parasitaires ont donc été recherchés, puisque ces dernières ne sont pas différenciables morphologiquement.

II. Identification de trois nouveaux gènes de *B. divergens*

Pour obtenir des marqueurs de gamétocytes de *B. divergens*, des comparaisons ont été faites avec un autre Apicomplexe, dont les stades sexués sont bien mieux connus, *P. falciparum*.

A. Identification de gènes des Apicomplexes spécifiques de stades sexués par analyses bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques réalisées ont permis d'identifier 31 protéines candidates, spécifiques des stades sexués et conservées au sein du genre *Plasmodium*. Aucun homologue n'a été trouvé chez *B. bovis* et *B. bigemina* pour 17 de ces protéines. Parmi les 14 candidats restants, seuls 5 ont été retenus, car ils présentaient des pourcentages d'identité élevés entre la séquence de *P. falciparum* et celles des *Babesia* spp., et des données étaient publiées sur ces protéines chez *P. falciparum* (PFF1035w = *Pfs77* ; PF13_0201 = *ssp2* ; PF14_0067 = *pfccp3* ; PF14_0723 = *pfccp1* et PF14_0532 = *pfccp2*) (Baker *et al.*, 1995; Sultan *et al.*, 1997; Pradel *et al.*, 2004).

Ces études croisées ont permis d'identifier la famille CCp, comme famille de protéines conservées chez les Apicomplexes et spécifiques des gamétocytes de *Plasmodium* spp.. Tous les membres de cette famille sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Protéines de la famille CCp : pourcentages d'identité et de similitude entre les protéines de *P. falciparum* et les orthologues d'autres Apicomplexes

CCp1				BLAST			
Genre	Espèce	N° Acc.	aa	Identité	%	Similitude	%
<i>Plasmodium</i>	<i>falciparum</i>	PF14_0723	1620				
	<i>vivax</i>	XP_001616023	1626	1147/1646	69	1379/1646	83
	<i>knowlesi</i>	CAQ41773	1641	1133/1659	68	1361/1659	82
	<i>berghei</i>	XP_677923	1614	1087/1628	66	1335/1628	82
	<i>yoelii</i>	XP_726026	1547	1015/1538	65	1251/1538	81
	<i>chabaudi</i>	XP_744611	1395	969/1417	68	1182/1417	83
<i>Babesia</i>	<i>bovis</i>	XP_001611765	1604	517/1678	30	858/1678	51
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	XP_628351	1556	508/1657	30	831/1657	50
	<i>hominis</i>	XP_666866	1556	508/1657	30	830/1657	50
	<i>muris</i>	XP_002141340	1604	504/1646	30	854/1646	51
<i>Theileria</i>	<i>annulata</i>	XP_952393	1601	510/1633	31	818/1633	50
	<i>parva</i>	XP_764892	1613	514/1643	31	807/1643	49
<i>Toxoplasma</i>	<i>gondii</i>	ACJ45039	1569	560/1643	34	892/1643	54

CCp2				BLAST			
Genre	Espèce	N° Acc.	aa	Identité	%	Similitude	%
<i>Plasmodium</i>	<i>falciparum</i>	PF14_0532	1617				
	<i>vivax</i>	XP_001615829	1607	1087/1632	66	1338/1632	81
	<i>knowlesi</i>	CAQ41580	1608	1083/1633	66	1335/1633	81
	<i>berghei</i>	XP_680338	1634	1089/1661	65	1315/1661	79
	<i>yoelii</i>	XP_729362	1530	1010/1554	64	1227/1554	78
	<i>chabaudi</i>	XP_739767	494	382/494	77	442/494	89
<i>Babesia</i>	<i>bovis</i>	XP_001609893	1597	432/1406	30	725/1406	51
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	XP_628222	1674	426/1649	28	766/1649	46
	<i>hominis</i>	XP_668360	1451	428/1526	28	708/1526	46
	<i>muris</i>	XP_002142086	1644	473/1646	28	775/1646	47
<i>Theileria</i>	<i>annulata</i>	XP_952882	1628	286/815	35	448/815	54
	<i>parva</i>	XP_763844	1435	231/645	35	364/645	56

CCp3				BLAST			
Genre	Espèce	N° Acc.	aa	Identité	%	Similitude	%
<i>Plasmodium</i>	<i>falciparum</i>	PF14_0067	1272				
	<i>vivax</i>	XP_001616879	1306	840/1285	65	1050/1285	81
	<i>knowlesi</i>	CAQ42894	1313	836/1308	63	1054/1308	80
	<i>berghei</i>	XP_679041	1304	814/1298	62	1025/1298	78
	<i>yoelii</i>	XP_728507	1615	816/1295	63	1021/1295	78
	<i>chabaudi</i>	AAL58521.1	845	514/839	61	657/839	78
<i>Babesia</i>	<i>bovis</i>	XP_001612018	1169	435/1188	36	653/1188	54
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	XP_626313	1247	456/1275	35	714/1275	56
	<i>hominis</i>	XP_667778	1247	454/1275	35	714/1275	56
	<i>muris</i>	XP_002140817	1243	467/1263	36	698/1263	55
<i>Theileria</i>	<i>annulata</i>	XP_953429	1197	442/1261	35	660/1261	52
	<i>parva</i>	XP_764433	1070	421/1183	35	628/1183	53
<i>Toxoplasma</i>	<i>gondii</i>	AAZ94423	1250	489/1252	39	755/1252	60
		AAZ94422	1246	468/1270	36	745/1270	58

CCp4				BLAST			
Genre	Espèce	N° Acc.	aa	Identité	%	Similitude	%
<i>Plasmodium</i>	<i>falciparum</i>	PFI0185w	1523				
	<i>vivax</i>	XP_001614577	1409	701/1515	46	975/1515	64
	<i>knowlesi</i>	CAQ39081	1416	716/1536	46	974/1536	63
	<i>berghei</i>	XP_677977	1472	749/1580	47	998/1580	63
	<i>yoelii</i>	XP_728878	858	436/932	49	593/932	63
	<i>chabaudi</i>	XP_743590	1234	648/1358	47	835/1358	61

CCp5				BLAST			
Genre	Espèce	N° Acc.	aa	Identité	%	Similitude	%
<i>Plasmodium</i>	<i>falciparum</i>	PFA0445w	1029				
	<i>vivax</i>	XP_001613541	1087	553/1112	49	760/1112	68
	<i>knowlesi</i>	CAQ38054	1052	564/1071	52	775/1071	72
	<i>berghei</i>	XP_676047	688	363/699	51	504/699	72
	<i>yoelii</i>	XP_727476	447	236/450	52	322/450	71
	<i>chabaudi</i>	XP_743663	800	402/826	48	580/826	70
<i>Babesia</i>	<i>bovis</i>	XP_001611849	1052	264/1035	25	460/1035	44
<i>Theileria</i>	<i>annulata</i>	XP_953269	1070	289/1043	27	506/1043	48
	<i>parva</i>	XP_765544	865	204/714	28	342/714	47
<i>Toxoplasma</i>	<i>gondii</i>	ABP88816	998	363/1014	35	568/1014	56
		ABP88815	996	334/1034	32	572/1034	55

FNPA				BLAST			
Genre	Espèce	N° Acc.	aa	Identité	%	Similitude	%
<i>Plasmodium</i>	<i>falciparum</i>	PF14_0491	852				
	<i>vivax</i>	XP_001615873	862	558/848	65	720/848	84
	<i>knowlesi</i>	CAQ41624	861	564/867	65	723/867	83
	<i>berghei</i>	XP_680172	849	580/853	67	703/853	82
	<i>yoelii</i>	XP_729408	879	595/880	67	714/880	81
	<i>chabaudi</i>	XP_743477	849	576/851	67	705/851	82
<i>Babesia</i>	<i>bovis</i>	XP_001608922	886	237/831	28	408/831	49
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	XP_628628	712	218/683	31	368/683	53
	<i>hominis</i>	XP_667741	771	219/683	32	366/683	53
	<i>muris</i>	XP_002141172	715	236/684	34	372/684	54
<i>Theileria</i>	<i>annulata</i>	XP_954684	999	263/785	33	406/785	51
	<i>parva</i>	XP_765544	865	268/806	33	417/806	51

N° Acc. : numéro d'accèsion des protéines dans Genbank ; aa : nombre d'acides aminés des protéines ; Identité : nombre d'acides aminés identiques dans l'alignement (séquence de *P. falciparum* par rapport à celle de l'espèce considérée) sur le nombre total d'acides aminés et pourcentage d'identité correspondant ; Similitude : nombre d'acides aminés similaires dans l'alignement (séquence de *P. falciparum* par rapport à celle de l'espèce considérée) sur le nombre total d'acides aminés et pourcentage de similitude correspondant. Seules les espèces d'Apicomplexes dont le génome est séquencé sont présentées ici.

Seuls trois membres de la famille ont été retenus pour les recherches d'orthologues chez *B. divergens* : CCp1 (PF14_0723), CCp2 (PF14_0532) et CCp3 (PF14_0067).

B. Mise en évidence des gènes *ccp* chez *B. divergens*

Pour mettre en évidence les orthologues des gènes sélectionnés chez *B. divergens*, des zones très conservées chez les Apicomplexes ont été identifiées grâce aux alignements des séquences protéiques. Ces zones ont servi de base pour déterminer, d'après les alignements des séquences nucléotidiques des différentes espèces, des amorces dégénérées. Ces amorces ont permis d'amplifier une portion des gènes *ccp* à partir d'ADN génomique de *B. divergens*.

1. Définition d'amorces dégénérées par comparaisons de séquences

Pour les trois membres de la famille choisis, les alignements protéiques ont été réalisés, avec les séquences des espèces de *Plasmodium* disponibles et celles de *B. bovis* et *B. bigemina*. Les données complètes sont présentées en Annexe 17.

Sur ces alignements, les zones présentant le plus d'identités et de similitudes sur la séquence d'acides aminés ont été choisies (sélection de 2 zones minimum par protéine). A titre d'exemple, la zone choisie côté 5' du gène *ccp3*, est représentée sur la Figure 19.

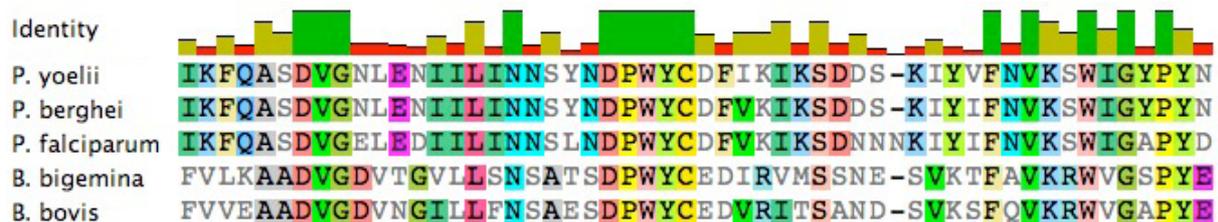


Figure 19 : Alignement d'une zone conservée de CCp3 entre différentes espèces de *Plasmodium* et *Babesia*

Les séquences des différentes espèces étudiées sont alignées dans la partie basse de la figure. La ligne « identity » représente par des rectangles de couleur les pourcentages d'identité pour toutes les espèces (100 % en vert). Représentation graphique réalisée avec Geneious Pro (Biomatters Ltd.)

Pour chacune de ces zones, les séquences d'ADN correspondantes des espèces étudiées (*P. falciparum*, *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. knowlesi*, *B. bovis* et *B. bigemina*) ont été alignées (données complètes en Annexe 18). Dans la partie la plus conservée de ces zones, une paire d'amorces dégénérées a été définie, en ne prenant en compte que les séquences de *P. falciparum*, *B. bovis* et *B. bigemina*. Un exemple est présenté sur la Figure 20.

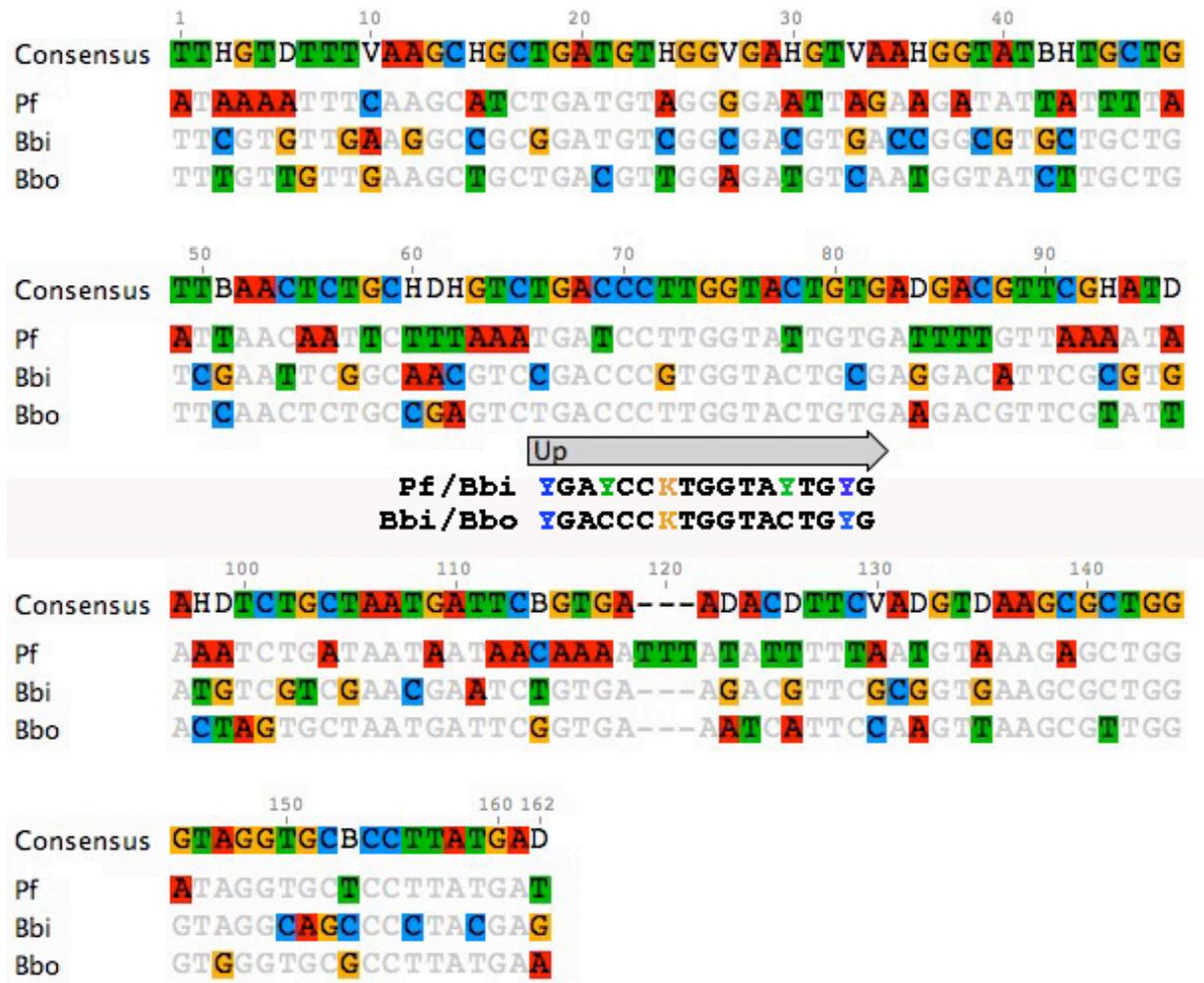


Figure 20 : Alignement des séquences nucléotidiques du gène *ccp3* chez *P. falciparum* (*Pf*), *B. bigemina* (*Bbi*) et *B. bovis* (*Bbo*) dans une zone très conservée et séquences des amorces dégénérées définies dans cette zone

Cette zone correspond exactement à la zone présentée en alignement protéique de la Figure 19. La ligne « consensus » présente les nucléotides le plus fréquemment rencontré pour chaque position. Au sein des séquences de chaque espèce, les bases identiques sont en grisé. Seuls les nucléotides qui diffèrent sont indiqués en couleur. La flèche grise indique la position des 2 amorces Up définies dans cette zone, les séquences étant indiquées en dessous. Représentation graphique réalisée avec Geneious Pro (Biomatters Ltd.).

2. Amplification par PCR de portions des gènes *ccp* chez *B. divergens*

La séquence de toutes les amorces dégénérées définies est présentée dans l'Annexe 5 et leur position est indiquée dans la Figure de synthèse 22.

Les amorces dégénérées définies précédemment ont été utilisées pour amplifier par PCR l'ADN de *B. divergens*. Pour les 3 gènes, plusieurs bandes ont été obtenues avec ces amorces,

les amorces définies selon les séquences des *Babesia* spp. (*Bbi/Bbo*) ayant donné les meilleurs résultats (Figure 21).

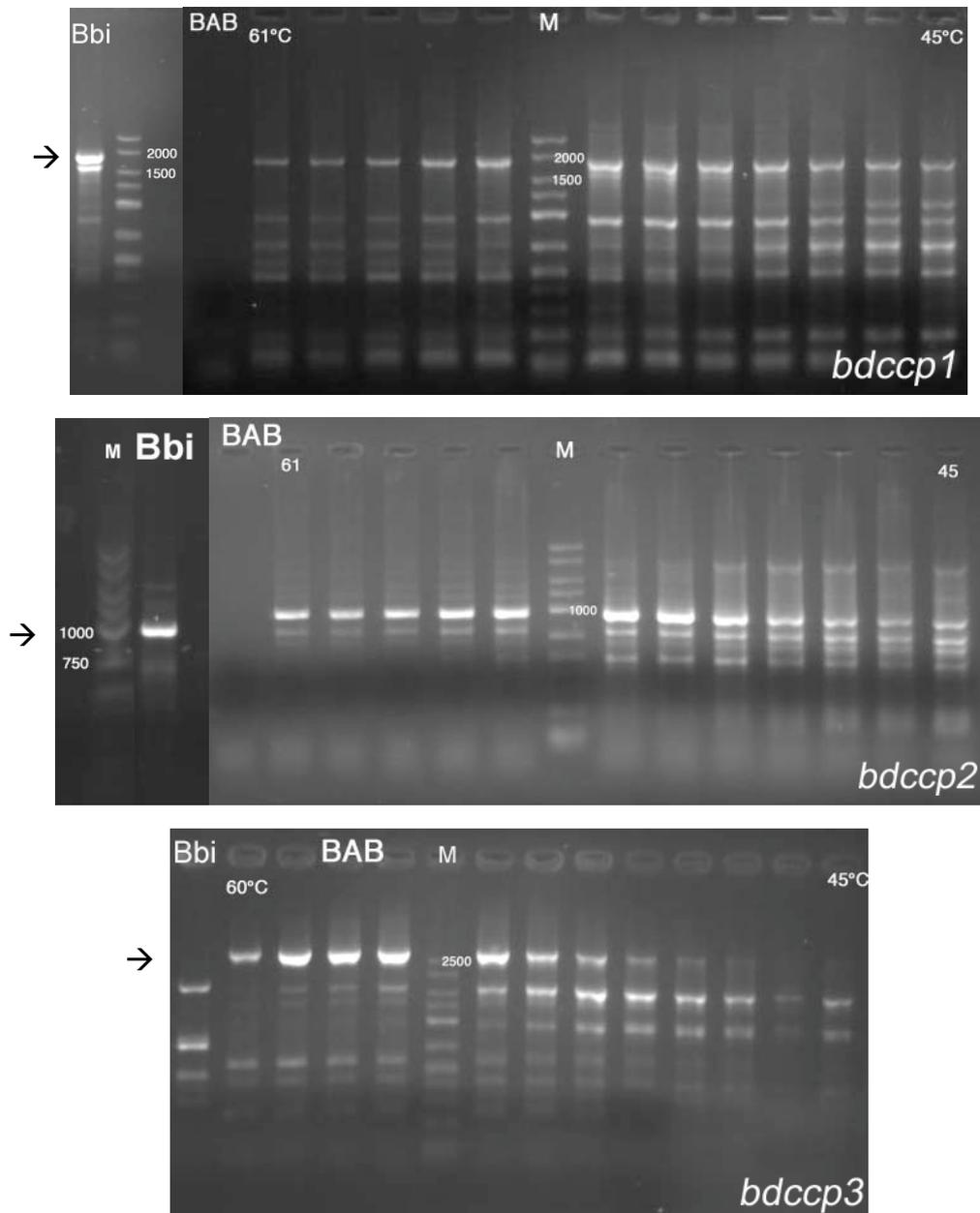


Figure 21 : Amplification par PCR et amorces dégénérées (*Bbi/Bbo*) de fragments des gènes *ccp1, 2 & 3* de *B. divergens*

BAB : gradient de température (valeurs indiquées pour les 2 extrémités) réalisé sur ADN de *B. divergens* ; Bbi : témoin réalisé avec de l'ADN de *B. bigemina* au Tm le plus haut et les amorces spécifiques de cette espèce ; M : marqueur de poids moléculaire.

Les bandes correspondant à la taille attendue (indiquées par des flèches sur la Figure 21) ont été purifiées sur gel et envoyées à séquencer. Les séquences obtenues ont permis d'identifier les fragments de 3 gènes de *B. divergens* *bdccp1*, *bdccp2* et *bdccp3* d'une taille d'environ 1800, 750 et 2900 bases respectivement.

3. Obtention de la séquence des gènes *bdccp1*, 2 & 3

Différentes approches ont été utilisées pour obtenir les séquences entières des gènes de *B. divergens* : nouvelles amorces dégénérées internes, amorces dégénérées dans les régions intergéniques, RACE, séquençage direct sur ADN génomique.

Les démarches appliquées à chaque gène et pour chaque portion de gène sont représentées sur la Figure 22.

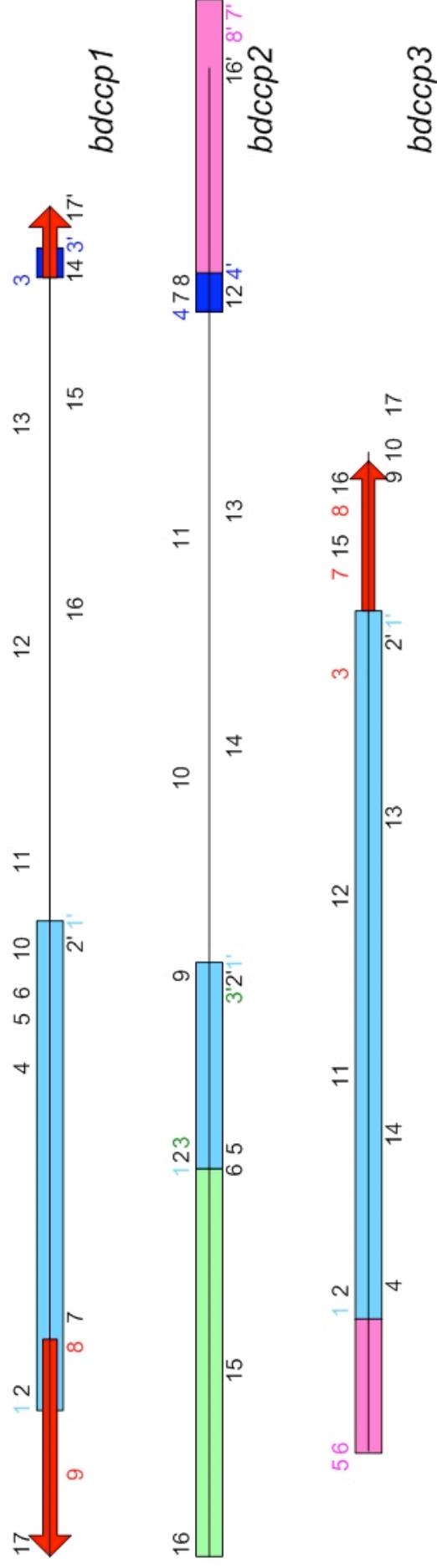


Figure 22 : Schéma représentant les différentes méthodes et la position des amorces utilisées pour obtenir la séquence des gènes *bdccp1*, 2 & 3

La ligne noire représente la séquence génomique de chaque gène. Les zones bleues sont celles obtenues à partir de PCR réalisées avec des amorces dégénérées, en bleu clair les premiers fragments amplifiés (Figure 21), en bleu foncé, la deuxième série. En rose sont représentées les zones amplifiées par PCR grâce à des amorces dégénérées définies dans les régions intergéniques. La zone verte correspond à la séquence obtenue par la technique de RACE. Les flèches rouges représentent les parties obtenues par séquençage direct sur ADN génomique (Millegen).

Les différentes amorces utilisées (cf. Annexe 5) pour amplifier et obtenir les séquences de chacune des parties sont numérotées et leur position indiquée sur le schéma. Les amorces Up sont indiquées au-dessus de chaque séquence, les amorces Down en dessous. Les amorces utilisées en couple sont indiquées par le même chiffre, avec un ' pour l'amorce Down.

Le gène *bdccp3* n'a pas pu être séquencé en entier. Par analyse des alignements réalisés avec les séquences de *B. bovis* et *B. bigemina*, la longueur du fragment manquant à l'extrémité 3' été estimée à environ 350 bases (comprenant la séquence d'un motif LCCL). La longueur du fragment manquant côté 5' est plus difficile à estimer, les séquences étant très peu conservées entre les espèces de *Babesia* dans cette zone.

Les séquences complètes des gènes *bdccp1*, *bdccp2* et la séquence partielle de *bdccp3* sont présentées en Annexe 19.

C. Expression des gènes *bdccp* : analyse des transcrits

1. Mise en évidence des ARNm dans la population parasitaire intra-érythrocytaire présente *in vitro*

A partir d'ARN total extrait de parasites cultivés *in vitro* en globules rouges de mouton, l'amplification par RT-PCR de fragments des 3 transcrits des gènes *bdccp* a été réalisée (Figure 23).

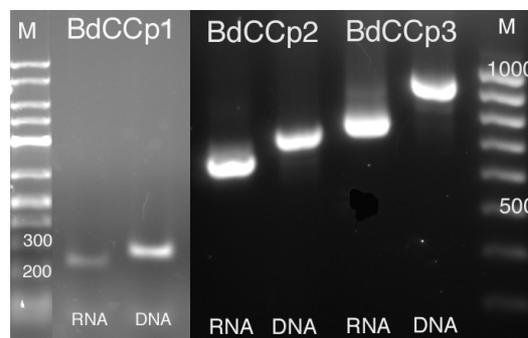


Figure 23 : Amplification partielle des transcrits des gènes *bdccp1*, 2 & 3 par RT-PCR

Pour chaque gène, sont présentés le produit d'amplification par RT-PCR (RNA) et le témoin PCR correspondant (DNA), réalisé avec les amorces n°3 et 17' ($T_m = 58^\circ\text{C}$) pour *bdccp1*, n°11 et 12 ($T_m = 70^\circ\text{C}$) pour *bdccp2* et n°2 et 14 ($T_m = 63^\circ\text{C}$) pour *bdccp3*. M : marqueurs de poids moléculaire.

Ces résultats prouvent que la transcription en ARNm des 3 gènes *bdccp1*, 2 & 3 a lieu dans la population parasitaire intra-érythrocytaire de *B. divergens* présente *in vitro*.

2. Séquence codante et domaines protéiques des CCp chez *B. divergens*

La séquence codante des gènes de *B. divergens* a été déterminée, à la fois grâce aux comparaisons avec les séquences de *B. bovis* et grâce à l'analyse des fragments amplifiés par RT-PCR. Les gènes étant de grande taille (>4 kb), les transcrits n'ont pas pu être amplifiés dans leur totalité par RT-PCR en une seule réaction. Mais la séquence complète des ARNm a été obtenue, par amplification de plusieurs fragments chevauchants.

Les séquences codantes déterminées sont indiquées dans l'Annexe 19. L'organisation intron-exon des gènes est représentée sur la Figure 24.

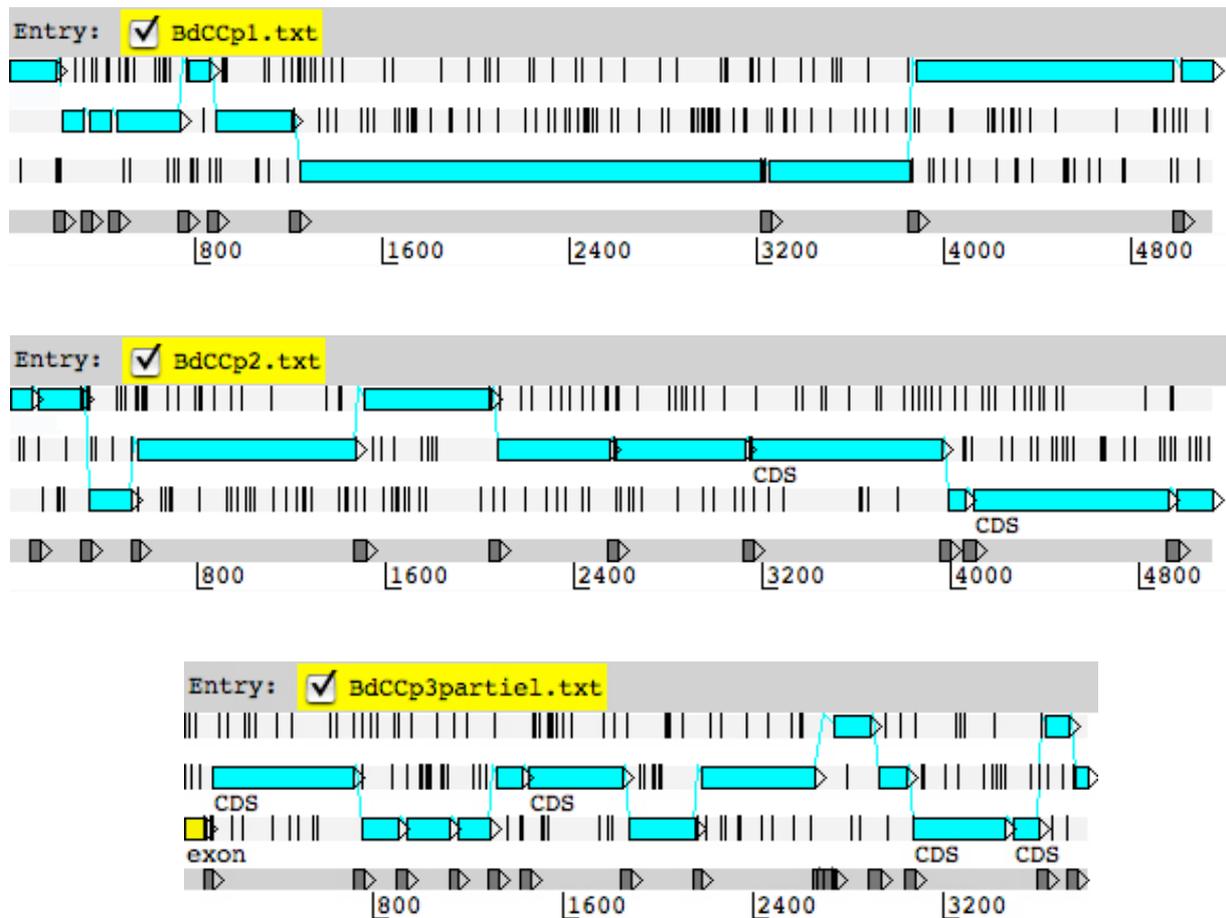


Figure 24 : Structure introns-exons des gènes *bdccp1*, 2 & 3

La ligne grise en bas de chaque partie représente la séquence nucléotidique (numéros des bases indiqués), tous les rectangles gris foncé étant des introns. Au dessus sont représentés les 3 cadres de lecture, les rectangles bleus étant les séquences codantes identifiées. Chaque rectangle est orienté dans le sens de lecture du gène. Représentation graphique réalisée avec Artemis.

La taille des gènes *ccp* et des protéines correspondantes, mis en évidence chez *B. divergens*, est indiquée dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Caractéristiques des protéines CCp1, 2 & 3 chez *B. divergens*

	BdCCp1	BdCCp2	BdCCp3 partielle
Taille du gène (nombre de bases)	5145	5105	3805
Nombre d'introns	9	10	13
Taille de la protéine (nombre d'acides aminés)	1601	1572	1044
Poids moléculaire (kDa)	178	174	114

Les domaines protéiques présents dans les protéines CCp de *B. divergens* ont été déterminés à l'aide des bases de données (SMART et Pfam). Les domaines des 3 protéines sont représentés sur la Figure 25.

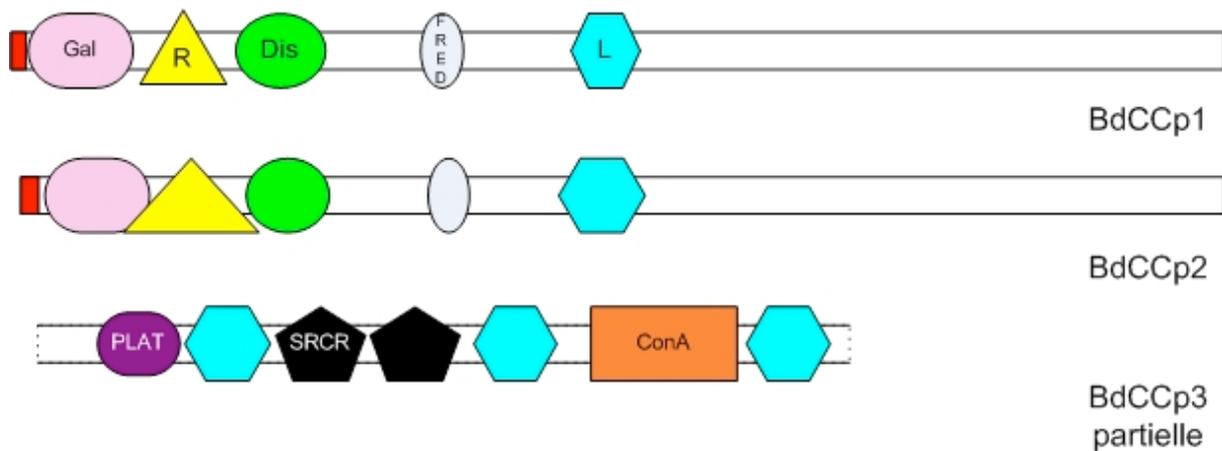


Figure 25 : Représentation graphique à l'échelle des différents domaines protéiques présents dans BdCCp1, BdCCp2 et BdCCp3

La présence d'un peptide signal est représentée par un rectangle rouge. Gal : galactose-binding domain ; R : Ricin domain ; Dis : domaine Discoidine ; FRED : fibrinogen related-domain ; L : LCCL ; PLAT : Polycystin-1, Lipoxigenase, Alpha-Toxin ; SRCR : Scavenger receptor cysteine-rich domain ; ConA : pentaxin.

III. Marqueurs des stades sexués de *B. divergens*

La protéine BdCCp2 identifiée précédemment a été exploitée, en tant que marqueur potentiel des gamétocytes de *B. divergens*. Un peptide recombinant de 32 kDa, rpBdCCp2, a été produit en système procaryote, à partir d'une portion d'ADNc de *bdccp2*. Un autre peptide court (15 acides aminés), spBdCCp2, a été synthétisé. Ces deux peptides ont servi à la production de sérums immuns, de lapin et de cobaye respectivement.

Pour valider ces sérums et confirmer l'existence et l'expression de la protéine BdCCp2 chez *B. divergens*, différents échantillons ont été testés par différentes méthodes immunochimiques.

A. Expression de BdCCp2 par les parasites intra-érythrocytaires

Les différents prélèvements sanguins du lapin n°300 durant l'immunisation ont été testés par Western Blot. Le sérum prélevé à T2' a été retenu et nommé anti-rpBdCCp2, car il présentait une forte réaction contre rpBdCCp2 et montrait peu de réactions non spécifiques (données non présentées). Pour les sérums dirigés contre spBdCCp2, c'est le sérum du cobaye n°117, présentant la plus forte réaction spécifique (données non présentées), qui a été utilisé et nommé anti-spBdCCp2.

1. Recherche de BdCCp2 dans des globules rouges parasités par *B. divergens*

a. Détection par IFI

Des préparations antigéniques de parasites cultivés *in vitro* ou de sang de gerbilles parasitées par *B. divergens* ont été testées avec les 2 sérums, anti-rpBdCCp2 et anti-spBdCCp2.

Aucun signal n'a été détecté lors de ces expériences. La protéine BdCCp2 n'a pas été mise en évidence dans la population parasitaire intra-érythrocytaire. Notamment, les sérums ne reconnaissent pas les parasites asexués intra-érythrocytaires, comme par exemple les formes géminées facilement reconnaissables ou les trophozoïtes de forme arrondie.

b. Détection par Western Blot

Cette technique a aussi été utilisée pour vérifier la présence de la protéine BdCCp2 dans les parasites présents en culture *in vitro*.

Dans un premier temps, des globules rouges parasités et des mérozoïtes (isolés par gradient de Percoll) d'isolats différents, ont été testés avec le sérum anti-rpBdCCp2 (Figure 26).

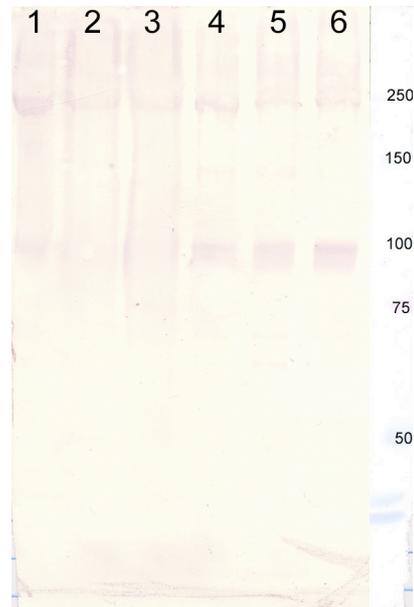


Figure 26 : Détection par Western Blot (sérum anti-rpBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des globules rouges parasités (1, 2 et 3) et des mérozoïtes isolés (4, 5 et 6) de *B. divergens*

Les isolats utilisés sont 1802A (puits 1 et 4), 7211B (2 et 5) et Rouen F5 (3 et 6).

Aucun signal n'a été détecté aux alentours du poids moléculaire attendu (174 kDa). BdCCp2 n'est présente ni dans les parasites intra-érythrocytaires *in vitro*, ni dans les mérozoïtes isolés, et ceci quel que soit l'isolat utilisé.

D'autres globules rouges parasités par *B. divergens* ont ensuite été testés en Western Blot. Cette fois, pour le même isolat, différentes conditions de culture ont été comparées, avec le sérum anti-rpBdCCp2 (Figure 27).

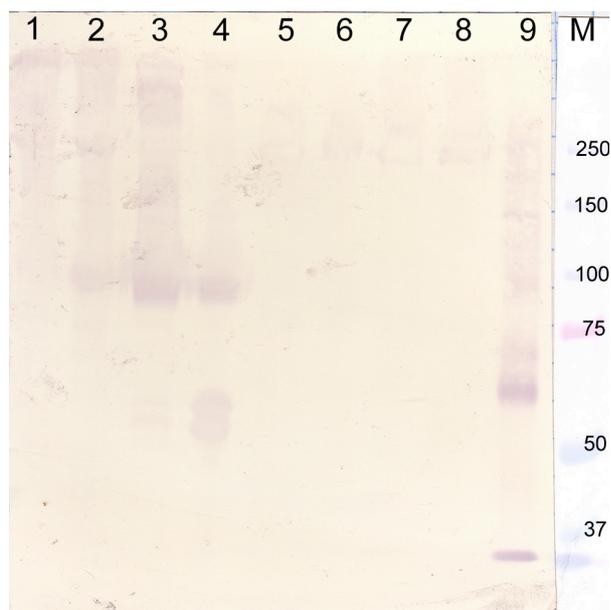


Figure 27 : Détection par Western Blot (sérum anti-rpBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des globules rouges de différentes origines, parasités par l'isolat 135 de *B. divergens*

Les puits contiennent des globules rouges de différentes espèces :

- érythrocytes de mouton, sains (1) et parasités cultivés *in vitro* (2),
- érythrocytes de gerbille, sains (3) et parasités (infection expérimentale *in vivo*, (4))
- érythrocytes de bovin, sains (5) et parasités, cultivés *in vitro* (6) ou provenant d'une infection expérimentale (veau n°3243, au pic de parasitémie, avant (7) et après injection d'imidocarbe (8)). Le puits n° 9 contient le peptide rpBdCCp2, en tant que témoin positif (bande à 33 kDa présente). M : marqueur de poids moléculaire.

Lors de cette expérience, la protéine BdCCp2 n'a été mise en évidence dans aucune des conditions testées. L'espèce d'origine des globules rouges et le mode de production du parasite (infection expérimentale *in vivo* ou culture *in vitro*) ne semblent pas avoir d'influence sur la présence de BdCCp2.

Finalement des conditions potentiellement inductrices de la différenciation sexuée ont été analysées. La recherche de la protéine BdCCp2 a été réalisée par Western Blot, avec le sérum spBdCCp2 (Figure 28).

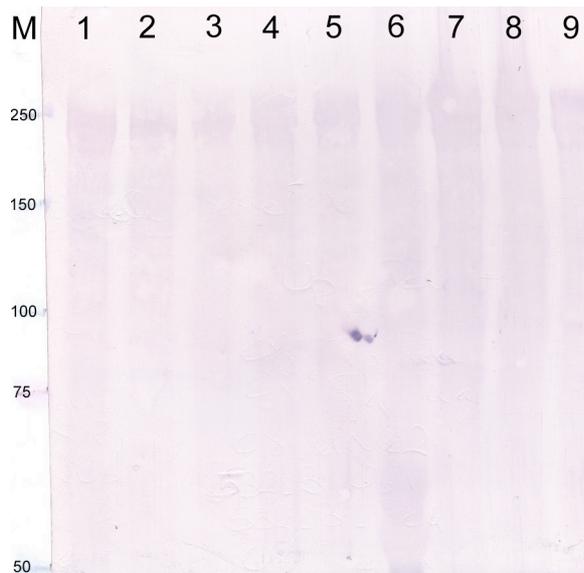


Figure 28 : Détection par Western Blot (sérum anti-spBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des cultures de *B. divergens* ayant subi des conditions potentiellement inductrices de la différenciation sexuée

Globules rouges de moutons sains (1) ; culture de *B. divergens* souche Rouen F5 en globules rouges de mouton, en conditions normales (2), après maintien de la culture à 4°C (3), avec ajout d'imidocarbe dans le milieu (4), ou avec ajout d'acide xanthurénique (5).

Globules rouges bovins, parasités à la sortie d'un gorgeur ayant servi à infecter des tiques (souche Bob2A) (6), ou provenant d'une infection expérimentale (veau n°3243, au pic de parasitémie, avant (7) et après injection d'imidocarbe (8)) ou sains (9).

Les conditions potentiellement inductrices testées ici n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de BdCCp2 dans la population parasitaire intra-érythrocytaire. Des parasites, provenant d'un système expérimental d'infection de tiques *in vitro*, c'est-à-dire juste avant leur ingestion par les tiques, ne contiennent pas non plus la protéine.

Ces différentes expériences, recherchant la présence de BdCCp2, dans la population intra-érythrocytaire, n'ont jamais montré la présence de ce marqueur chez *B. divergens* dans les conditions testées. Il n'est donc pas possible, suite à cela, de déterminer si :

- les sérums produits reconnaissent bien la protéine native chez *B. divergens*
- les sérums reconnaissent spécifiquement les gamétocytes de *B. divergens*,
- les gamétocytes de *B. divergens* sont présents dans la population intra-érythrocytaire.

En revanche, ces résultats indiquent que les sérums générés ne marquent pas la population parasitaire asexuée de *B. divergens*.

2. Validation de la spécificité des sérums sur gamétocytes de *P. berghei*

Afin de confirmer que la protéine BdCCp2 est bien un marqueur des gamétocytes de *B. divergens* et vu l'absence de certitude quant à l'identification formelle des gamétocytes de ce parasite, les sérums produits (anti-rpBdCCp2, Figure 29 et anti-spBdCCp2, Figure 30) ont été testés sur les gamétocytes de *P. berghei*. Ce test, par IFI, permet de valider la capacité des sérums à reconnaître des gamétocytes d'Apicomplexes.

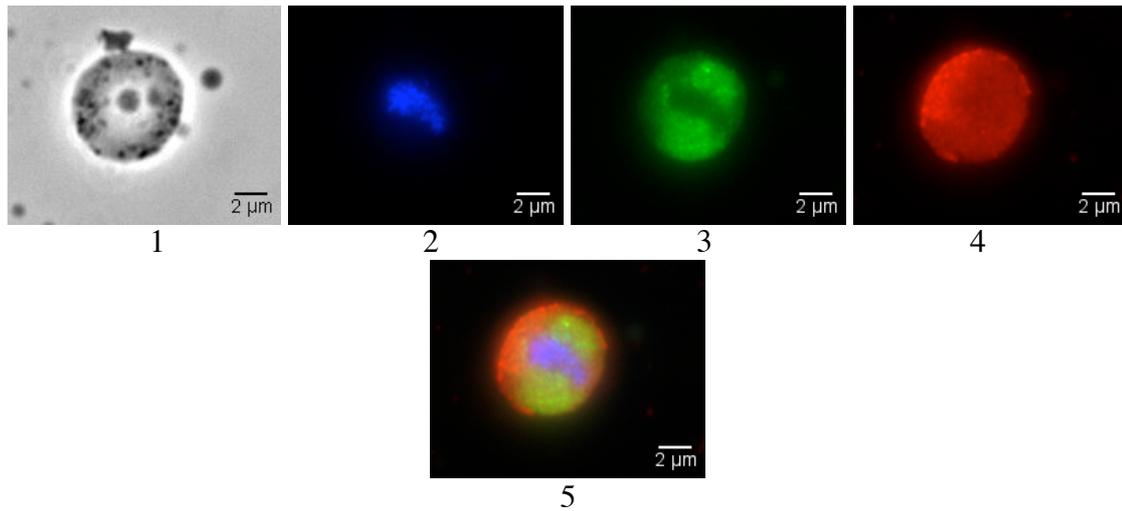


Figure 29 : Détection de CCp2 dans les gamétocytes de *P. berghei*, avec le sérum anti-rpBdCCp2

Gamétocytes de *P. berghei* observés avec la lumière blanche seule (1), marqués au DAPI (2), avec l'anticorps anti-PDI de souris (3) et le sérum anti-rpBdCCp2 (4). Superposition des différents marquages (5).

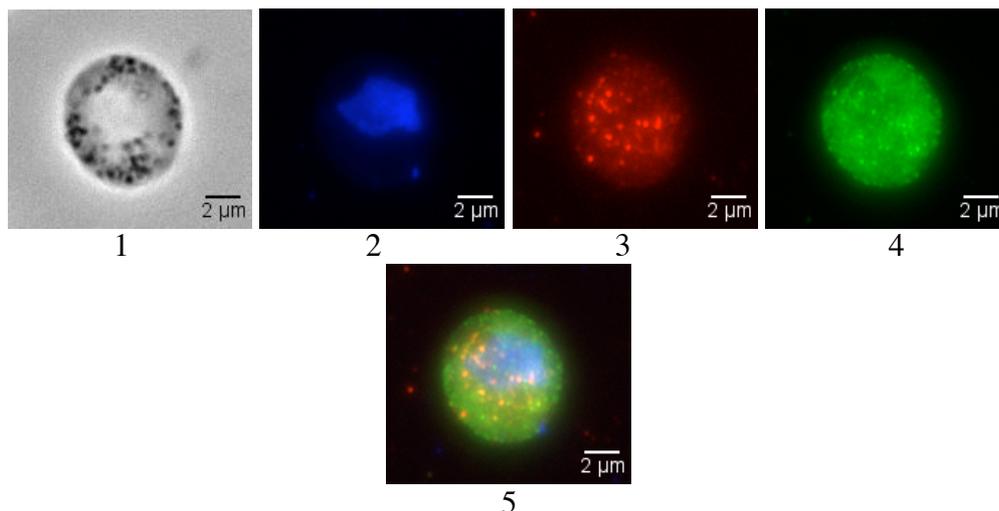


Figure 30 : Détection de CCp2 dans les gamétocytes de *P. berghei*, avec le sérum anti-spBdCCp2

Gamétocytes de *P. berghei* observés avec la lumière blanche seule (1), marqués au DAPI (2), avec l'anticorps anti-PDI de lapin (3) et le sérum anti-spBdCCp2 (4). Superposition des différents marquages (5).

Ni les hématies, ni les réticulocytes, ni les rares parasites asexués présents n'ont été marqués par les sérums anti-BdCCp2 (anti-rpBdCCp2 et anti-spBdCCp2). Les 2 sérums ont marqué spécifiquement les gamétocytes de *P. berghei*. Le marquage des gamétocytes par les 2 sérums montre une répartition homogène de la protéine dans le parasite. Cette expérience a mis en évidence les réactions croisées existant entre les protéines CCp2 de *B. divergens* et *P. berghei*. Les deux sérums produits contre BdCCp2 reconnaissent bien la protéine dans sa forme native chez les gamétocytes d'une autre espèce de parasite.

B. Expression de BdCCp2 par les parasites présents dans le tube digestif de tiques infectées

Des tiques partiellement gorgées, potentiellement infectées, ont été analysées par Western Blot et par immunohistochimie, pour détecter la présence de BdCCp2 et mettre en évidence les stades sexués de *B. divergens*.

1. Analyse par Western Blot du contenu digestif de tiques partiellement gorgées

a. Tiques infectées sur animaux

Des tubes digestifs de tiques collectées sur les vaches laitières du GAEC Guérin à La Verrie ont été analysées par Western Blot, avec le sérum anti-spBdCCp2 (Figure 31).

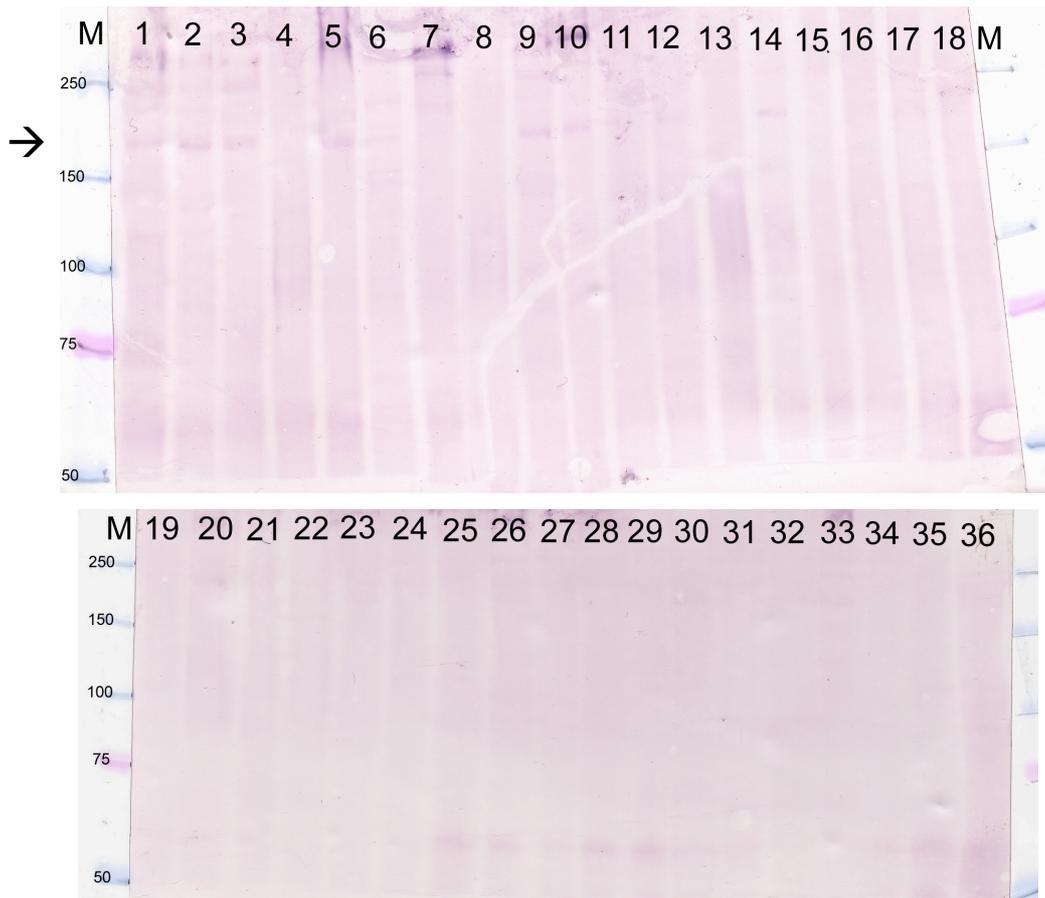


Figure 31 : Détection par Western Blot (sérum anti-spBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des tubes digestifs d'*I. ricinus* partiellement gorgées sur bovins (élevage de La Verrie)

Les puits 1 à 17 et 19 à 35 contiennent des extraits de tubes digestifs de tiques gorgées sur bovins potentiellement porteurs de *B. divergens*. Les puits 18 et 36 sont les témoins négatifs, contenant de l'extrait de tube digestif de tique saine gorgée sur veau sain. La flèche indique la bande correspondant à la protéine BdCCp2.

La protéine BdCCp2 a été détectée avec succès dans 8 des échantillons testés (puits 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10 et 14). Le sérum anti-spBdCCp2 a marqué une protéine d'environ 171 kDa (poids moléculaire calculé). Aucun signal n'est détecté dans les témoins négatifs.

Le statut immunologique des bovins vis-à-vis de *B. divergens* (Tableau 17) a été analysé et a montré que les tiques dans le tube digestif desquelles est exprimée la protéine BdCCp2 se sont gorgées sur des bovins positifs en IFI (voire très positifs) et qui sont donc potentiellement porteurs de *B. divergens*. En revanche, aucune tique gorgée sur un bovin négatif en IFI n'a révélé la présence de BdCCp2 dans son tube digestif.

Tableau 17 : Données concernant les tiques prélevées sur les bovins de l'élevage de La Verrie, dont le contenu digestif a été analysé par Western Blot et les sérums des bovins correspondants

n° de la tique (Figure 31)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Poids (en mg)	34	32	32	32	32	31	31	31	30	30	30	28
BV	7567	7550	7550	7609	7550	7575	7589	7609	7567	7589	7562	7585
Titre en IFI	80	80	80	320	80	80	80	320	80	80	160	40
n° de la tique (Figure 31)	13	14	15	16	17	19	20	21	22	23	24	25
Poids (en mg)	26	25	24	24	23	277	313	271	322	339	288	261
BV	7585	7567	7555	7604	7555	7624	7625	7625	7626	7627	7631	7626
Titre en IFI	40	80	80	160	80	nr						
n° de la tique (Figure 31)	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
Poids (en mg)	250	233	218	214	209	208	183	167	160	159		
BV	7624	7612	7626	7612	7605	7610	7627	7631	7605	7611		
Titre en IFI	nr											

n° : numéro de l'échantillon dans le Western Blot, les échantillons positifs sont indiqués en gris ; Poids : poids de la tique récoltée (en mg) ; BV : n° du bovin sur lequel la tique a été récoltée ; Titre en IFI : titre du sérum du bovin déterminé par tests des dilutions successives du sérum lors du test sérologique à *B. divergens* par IFI, le chiffre indiqué correspond à la dernière dilution positive (par exemple : 1/160), nr : non réalisé car sérologie négative.

b. Tiques infectées *in vitro*

Des tiques infectées expérimentalement *in vitro* (souche Bob2A) ont été analysées de la même manière (Figure 32).



Figure 32 : Détection par Western Blot (sérum anti-spBdCCp2) de la protéine BdCCp2 dans des tubes digestifs d'*I. ricinus* partiellement gorgées *in vitro*

Les puits contiennent des globules rouges de bovins sains (1), ou parasités par *B. divergens* (souche Bob2A) avant (2) et après leur utilisation dans le gorgeur (3), et les extraits de tube digestif des tiques infectées sur ce gorgeur (4, 5, 6 et 7) et un témoin négatif tique partiellement gorgée sur veau sain (8). M : marqueur de poids moléculaire.

Les poids des tiques infectées expérimentalement *in vitro* et partiellement gorgées lors de cette expérience étaient très faibles : 10, 8, 7 et 4 mg. Ici, la protéine BdCCp2 n'a pas été détectée dans le contenu digestif des tiques infectées (ni dans les globules rouges parasités qui ont servi à l'infection).

2. Analyses immunohistochimiques de tiques infectées

Des tiques infectées expérimentalement *in vitro* (gorgeur, souche Bob2A) et *in vivo* (veaux n° 6805 et 3243) ont été analysées par immunohistochimie, avec les sérums anti-rpBdccc2 et anti-spBdCCp2. Les coupes d'une tique infectée *in vitro*, marquées par le sérum anti-rpBdCCp2, sont présentées sur la Figure 33.

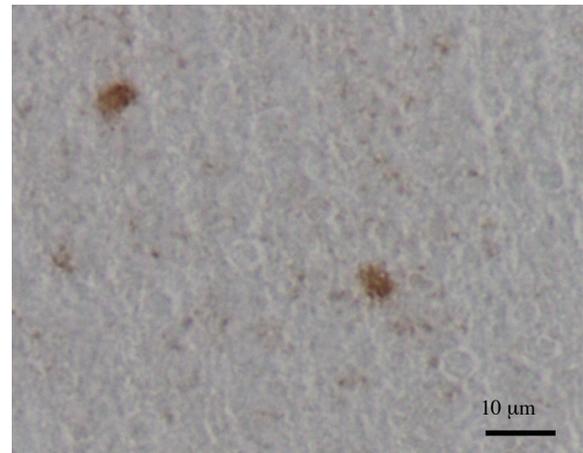
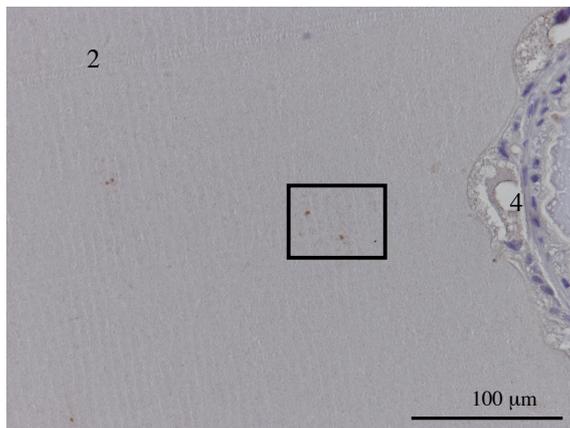
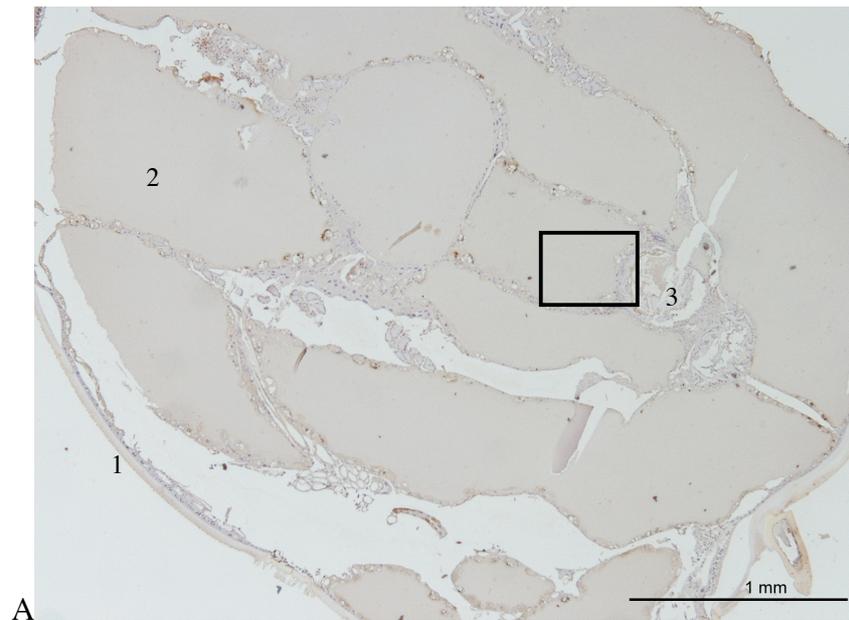


Figure 33 : Coupes longitudinales d'une tique *I. ricinus* infectée *in vitro* par la souche Bob2A de *B. divergens*, marquée en immunohistochimie par le sérum anti-rpBdCCp2

A : Vue entière de la coupe longitudinale de tique. B : Zoom du cadre de A. C : Zoom du cadre de B. Les éléments anatomiques reconnaissables de la tiques sont indiqués par des numéros sur les photos : cuticule (1), contenu du tube digestif (2), ganglion nerveux (3) et épithélium digestif (4).

Le sérum anti-rpBdCCp2 reconnaît des éléments ovoïdes présents dans le tube digestif de tique infectée *in vitro*. Ces éléments marqués sont souvent isolés, ou plus rarement forment des groupes de deux éléments adjacents. Ils ont une taille homogène de 2,5 x 4,5 µm environ (les plus gros atteignant 3,7 x 5,5 µm).

Les mêmes éléments ont été mis en évidence dans des tiques infectées expérimentalement *in vivo* (veaux n° 6805 et 3243), mais en quantité moindre. Ces éléments n'ont pas été

retrouvés dans les tiques témoins non infectées. Les sérums non immuns (lapin n°300 et cobaye n°117 avant immunisation) n'ont pas montré de réaction contre les tiques.

Les deux sérums produits ont marqué les mêmes formes, quelles que soient les tiques analysées.

Les colorations classiques (MMG, HES) de ces coupes de tiques n'ont pas permis de distinguer les éléments détectés par immunohistochimie.

La forme, la taille et le nombre des éléments détectés par les sérums produits contre BdCCp2 suggèrent que ces éléments peuvent correspondre aux stades sexués de *B. divergens*.

IV. Discussion

Les gamétocytes, précurseurs des gamètes, présents chez l'hôte vertébré, sont des stades parasites doublement spécialisés. Ce sont ces formes qui engagent la population parasite vers la reproduction sexuée et elles sont aussi responsables de la transmission parasite du vertébré au vecteur. La connaissance de ces stades de transmission est essentielle pour étudier la biologie parasite, en particulier la transmission et les interactions avec le vecteur. Les stades sexués des *Babesia* spp. *s.l.* sont assez peu connus (Mehlhorn & Schein, 1984; Smith *et al.*, 2002). Le stade gamétocyte n'a jamais été vraiment caractérisé. Toutes les études rapportent que les stades sexués des *Babesia* spp. *s.l.* ne se différencient que dans le vecteur (Mehlhorn & Schein, 1984), ou sous l'influence de stimuli reproduisant les conditions physico-chimiques présentes chez ce dernier (Mosqueda *et al.*, 2004a).

Les travaux de cette thèse ont débuté par des essais de distinction de stades sexués de *B. divergens* par observation morphologique directe après induction, en reproduisant les expériences induisant la différenciation sexuée parasite utilisées chez d'autres espèces. Certaines formes observées présentaient un aspect inhabituel, avec des projections cytoplasmiques. Mais l'aspect de ces parasites, même s'il est évocateur des stades sexués de *Babesia* spp. *s.l.* (les corps rayonnants), ne permet pas de prouver avec certitude que ces parasites sont les formes de transmission du vertébré au vecteur. Dans des travaux sur *B. bigemina*, l'influence du mode de production du parasite sur l'infectivité pour les tiques a été démontrée (Dalglish *et al.*, 1981; Stewart *et al.*, 1986; de Vos *et al.*, 1989). Dans le cadre de ces études et pour toutes les conditions testées, des parasites présentant des protrusions ont été observés dans le tube digestif de la tique, mais avec des différences de quantité et de formes, et l'infection de la tique n'a pas toujours été de même intensité, ni de même efficacité.

Les résultats obtenus ici ont donc confirmé ce fait : on ne peut distinguer avec certitude des gamétocytes de *B. divergens*, infectants pour le vecteur, dans la population intra-érythrocytaire. Avoir des marqueurs spécifiques de ces stades est donc essentiel pour pouvoir confirmer l'existence des gamétocytes chez *B. divergens* et étudier leur production et leur devenir chez le vecteur.

Pour identifier des marqueurs de stades sexués, des analyses bioinformatiques et bibliographiques ont été faites sur *P. falciparum*, un Apicomplexe phylogénétiquement proche et présentant aussi une phase intra-érythrocytaire avant son passage dans le vecteur. Ces études ont permis de sélectionner des gènes candidats, marqueurs de gamétocytes, codant

des protéines conservées chez les Apicomplexes. Les données sur *P. falciparum* ont donc servi de base pour amorcer l'étude et sélectionner les protéines candidates. Par la suite, seules les séquences génomiques de *B. bovis* et *B. bigemina* ont été utilisées pour l'analyse des séquences de *B. divergens*. Même si *P. falciparum* et *B. divergens* sont proches, par leur biologie et leur position phylogénétique, les comparaisons de séquences génomiques sont plus fiables au sein d'un même genre. En effet, les amorces dégénérées sur la base des séquences de *B. bigemina* et *B. bovis* ont donné de meilleurs résultats que l'autre série prenant en compte la séquence de *P. falciparum*.

Tout au long des travaux, l'analyse des alignements des séquences des 3 espèces de *Babesia* a confirmé que *B. divergens* est plus proche de *B. bigemina* que de *B. bovis*, fait déjà établi par les analyses phylogénétiques (Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Criado-Fornelio *et al.*, 2004). Mais pour *B. divergens*, la plupart des analyses (notamment l'étude des introns) ont été réalisées avec les séquences de *B. bovis*, puisque les gènes étudiés étaient complètement annotés pour cette espèce et pas pour *B. bigemina*. Ceci a notamment permis de mettre en évidence que, chez *B. divergens*, ces gènes contiennent plus d'introns que chez *B. bovis*.

Les protéines de la famille CCp ont été les principales étudiées ici. D'autres candidats avaient été retenus, en tant que protéines conservées chez les Apicomplexes et spécifiques des stades sexués et des stades présents chez le vecteur : Pfs77 et TRAP (= *ssp2*). Cependant, les degrés de similitude entre ces gènes de *P. falciparum* et les orthologues potentiels présents chez *B. bigemina* et *B. bovis* étaient bien plus faibles que pour les *ccp* (E-value de 10^{-10} et 10^{-20} pour *pfs77* et *ssp2*, vis-à-vis de 10^{-158} , 10^{-111} , 10^{-201} pour *ccp1*, 2 & 3 respectivement). Les résultats concernant ces protéines n'ont pas été présentés. Les amplifications par PCR avec amorces dégénérées (définies selon la même stratégie que pour les *ccp*) ont été réalisées à partir d'ADN génomique de *B. divergens*. Des produits d'amplification contenant potentiellement la bande d'intérêt, et aussi beaucoup d'autres bandes, ont été obtenus. Mais les séquençages sur les bandes d'intérêt purifiées chez *B. divergens* n'ont pas montré d'homologie avec les séquences correspondantes chez *B. bovis* et *B. bigemina*.

Au sein de la famille CCp, seules 3 protéines ont été recherchées chez *B. divergens*. Les 3 autres protéines présentaient un intérêt moindre pour cette étude : CCp4 n'a pas d'orthologues identifiés en dehors du genre *Plasmodium* (cf. Tableau 15), CCp5 a aussi été mise en évidence dans les stades asexués intra-érythrocytaires de *P. falciparum* (Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008) et FNPA ne présente pas de domaine LCCL (Pradel *et al.*, 2004).

Les 3 gènes recherchés ont été mis en évidence chez *B. divergens* et leur séquence entière a été obtenue, à l'exception d'une petite partie aux extrémités de *bdccp3*. De plus, la présence

de l'ARNm des 3 gènes, mise en évidence par RT-PCR sur ARN total extrait de culture *in vitro*, indique que la transcription de ces gènes a lieu dans la population parasitaire intra-érythrocytaire. Un résultat similaire est observé pour *P. falciparum*, chez qui la transcription de ces gènes a lieu chez les gamétocytes présents chez l'hôte vertébré (Pradel *et al.*, 2004).

La protéine BdCCp2 a été étudiée chez *B. divergens* en tant que marqueur des stades sexuels. Chez *P. falciparum* et *P. berghei*, l'expression de la protéine CCp2 est majoritaire dans les gamétocytes, qui sont des stades intra-érythrocytaires (Pradel *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008). Des sérums immuns dirigés contre BdCCp2 ont été produits pour étudier l'expression de cette protéine chez *B. divergens*. Les tests ont été d'abord réalisés sur la population intra-érythrocytaire, sans succès. Que ce soit dans le sang d'animaux infectés (hôte naturel ou expérimental), en culture classique en hématies *in vitro* ou dans des conditions de culture pouvant être inductrices de la différenciation sexuée, la protéine BdCCp2 n'a jamais été mise en évidence et n'est donc pas exprimée par les parasites intra-érythrocytaires.

Par la mise évidence par IFI des réactions existant sur les gamétocytes de *P. berghei*, la spécificité des sérums produits contre BdCCp2 a été validée. Ces sérums sont bien capables de reconnaître spécifiquement des gamétocytes d'Apicomplexes. Leur utilisation pour détecter les gamétocytes de *B. divergens* est donc appropriée. Au vu des résultats obtenus ici, il reste toutefois impossible de déterminer si les stades sexuels de *B. divergens* sont réellement absents parmi les stades intra-érythrocytaires ou si la protéine n'est simplement pas encore exprimée à ce stade.

L'analyse du contenu digestif de tiques infectées (naturellement ou expérimentalement) a en revanche permis de révéler la présence de la protéine BdCCp2. On peut donc en déduire que les stades de transmission du parasite étaient présents, même chez les tiques infectées expérimentalement *in vitro*. Par ailleurs, ces résultats prouvent bien, d'une part, que les sérums produits sont capables de reconnaître la protéine entière en immunohistochimie et en Western Blot, et d'autre part, que l'ARNm détecté précédemment est bien traduit par le parasite pour la synthèse d'une protéine, après le passage chez le vecteur.

Des tiques infectées expérimentalement *in vitro* n'ont cependant pas révélé, par analyse en Western Blot (Figure 32), la présence de BdCCp2. Pourtant la protéine a bien été mise en évidence par immunohistochimie dans d'autres tiques infectées de la même façon. Ces résultats paraissent contradictoires, mais les tiques négatives en Western Blot étaient très petites, leur poids ne correspondant qu'aux tout premiers jours de gorgement. Cela laisse

penser que, soit le parasite n'a pas eu le temps de se différencier et la protéine d'être exprimée, soit les stades sexués ingérés étaient en quantité trop faible pour être détectés.

Les analyses immunohistochimiques ont détecté la protéine BdCCp2 et mis en évidence des formes parasitaires dans le repas sanguin de tiques infectées. La taille et la forme de ces parasites sont compatibles avec celles rapportées pour les autres espèces de *Babesia* (Friedhoff & Buscher, 1976; Rudzinska *et al.*, 1979; Mehlhorn *et al.*, 1980). Ces parasites marqués représentent sans doute les stades sexués de *B. divergens*. Mais il est impossible de déterminer quel stade parasitaire a été mis en évidence, gamétoyte après son passage dans le vecteur ou gamète après son émergence de l'hématie. La protéine BdCCp2 peut donc être considérée, à ce stade, comme un marqueur de stade sexué au sens large, et pas de gamétoyte uniquement, au contraire de PfCCp2. La spécificité fine de ce marqueur en lien avec les étapes de la différenciation sexuée de *B. divergens* sont encore à élucider.

Les résultats obtenus ont montré que les parasites présents chez le vertébré dans les hématies, contiennent déjà des transcrits codant des protéines nécessaires à la reproduction sexuée. Les ARNm étant ainsi stockés par le parasite, la traduction de ces protéines pourrait être retardée, et n'avoir lieu que sous l'influence des stimuli présents chez le vecteur. La traduction des protéines parasitaires pourrait ainsi être effectuée plus rapidement dès l'ingestion du parasite par son vecteur. Ceci pourrait être à l'origine de la différenciation moléculaire et morphologique tardive des *Babesia* spp.. Il serait donc difficile d'identifier une protéine déjà présente chez le parasite avant ce changement morphologique. Mais la présence de BdCCp2 confirme néanmoins l'existence des stades sexués de *B. divergens*, chez le vecteur.

Par analogie avec les profils de transcription de ces gènes chez *P. falciparum* (Pradel *et al.*, 2004) et *P. berghei* (Lavazec *et al.*, 2009), la présence des transcrits des 3 gènes *bdccp1*, *2* & *3* mise en évidence dans la population parasitaire intra-érythrocytaire indique qu'il existe bien une différenciation sexuée de parasites présents dans les globules rouges. Ceci pourrait être vérifié chez *B. divergens*, notamment en comparant les résultats de RT-PCR sur de l'ARN extrait de mérozoïtes seuls (stades asexués) ou de globules rouges parasités (population générale). Finalement, les deux autres protéines BdCCp1 & 3 pourraient aussi être étudiées en tant que marqueur et utilisées pour produire des sérums. Ceci permettrait, soit de vérifier que leur expression est similaire à celle de BdCCp2 comme pour *P. falciparum*, soit de mettre en évidence une éventuelle différence d'expression qui pourrait permettre d'identifier les gamétoytes chez le vertébré. Les outils mis en place ici serviront à aller plus loin dans l'étude des stades sexués de *B. divergens*.

Trois nouveaux gènes de *B. divergens* ont donc été identifiés comme appartenant à cette famille CCp et caractérisés au cours de cette thèse. Ces résultats apportent des données fondamentales supplémentaires pour l'étude de la biologie de ce parasite. Non seulement de nouveaux gènes ont été identifiés chez ce parasite dont le génome n'est pas séquencé, mais de plus, ces gènes présentent un intérêt particulier dans la transmission parasitaire du vertébré au vecteur. Les domaines protéiques, originaux chez les Apicomplexes, qui composent les CCp en font des protéines d'un intérêt particulier sur le plan des interactions avec le vecteur. Les fonctions des orthologues présents chez les autres Apicomplexes ne sont pas exactement connues. L'étude précise de ces protéines chez *B. divergens* pourrait aider à clarifier leur rôle dans la transmission et/ou la reproduction sexuée des Apicomplexes. Des domaines protéiques adhésifs étant présents au sein de ces protéines, il est possible que celles-ci aient un rôle en tant que ligand, lors des interactions moléculaires avec le vecteur. Ces molécules sont aussi des cibles potentielles pour les essais de blocage de la transmission du parasite au vecteur.

Conclusion et perspectives

Au cours de cette thèse, trois nouveaux gènes de *B. divergens* ont été identifiés et caractérisés ; ils codent des protéines appartenant à la famille CCp, spécifique des stades sexués et conservée chez les Apicomplexes. Les transcrits de ces 3 gènes sont présents dans la population parasitaire intra-érythrocytaire. L'une de ces protéines, BdCCp2, a été utilisée pour produire des sérums dirigés contre les stades sexués de *B. divergens*. La spécificité de ces sérums a été validée par différentes expériences, montrant que cette protéine n'est exprimée que par les parasites présents dans le tube digestif de la tique et non par ceux présents dans les globules rouges de l'hôte vertébré, ce qui contraste avec les données disponibles pour son orthologue chez *P. falciparum*. Comme décrit dans ce manuscrit, les différentes phases et stades parasites de la reproduction sexuée de *B. divergens* restent encore à préciser. Les marqueurs identifiés ici permettront de mieux étudier le déroulement du développement parasitaire dans le vecteur.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse soulèvent des questions quant aux modalités de la transmission de *B. divergens* par *I. ricinus*, puisque les sporozoïtes de ce parasite n'ont pas pu être visualisés dans les glandes salivaires du vecteur, même suite à l'acquisition du parasite *in vivo* par les tiques adultes. La découverte des sporozoïtes de *B. sp.* EU1 dans les glandes salivaires d'*I. ricinus* a néanmoins validé l'efficacité des méthodes utilisées.

Au vu des résultats négatifs concernant les sporozoïtes et des résultats positifs concernant la présence des stades sexués dans le vecteur, il semblerait que les échecs de retransmission de *B. divergens* par *I. ricinus* lors des infections expérimentales réalisées ici soient dus à un blocage du parasite dans le vecteur avant l'infection des glandes salivaires. Le parasite est bien présent dans la tique (détection de l'ADN parasitaire malgré les transformations) mais l'absence de parasites dans les glandes salivaires pourrait être due à un problème quantitatif, les tiques auraient été infectées par un nombre de parasites inférieur au seuil nécessaire au passage de ceux-ci dans leurs différents organes, notamment les glandes salivaires. La protéine marqueur de stades sexués BdCCp2 et les ARNm des 3 gènes *bdccp1, 2 & 3* permettront de définir précisément sous quelles conditions les gamétocytes sont produits (*in vitro* et *in vivo*) et en quelle quantité (par des méthodes immunochimiques et par RT-PCR quantitative, respectivement). Cela permettra d'optimiser et de standardiser les expériences de transmission expérimentales et notamment de valider quantitativement la première étape de reproduction sexuée dans la tique, quelles que soient les conditions d'infection utilisées.

Les outils et les méthodes mis en place au cours de cette thèse pourront servir à préciser les connaissances sur la transmission de *B. divergens*. Mais l'importance de l'identification des stades de transmission de ce parasite ne tient pas seulement à l'acquisition de connaissances fondamentales sur le cycle parasitaire : la caractérisation de ces formes parasitaires apportera des bases importantes pour lutter contre *B. divergens*, notamment pour l'identification de potentiels candidats vaccinaux et pour acquérir des données quantitatives visant à modéliser la transmission et à prévenir les risques de babésiose bovine en élevage.

Tout d'abord, les facteurs induisant et influençant la différenciation parasitaire ne sont pas connus, que ce soit pour le gamétoocyte ou le sporozoïte. Il est important de déterminer quelles sont les conditions qui, chez le vertébré, vont favoriser la production des stades sexués chez la tique. Concernant la transmission du vecteur au vertébré, aucune information n'a pu être précisée sur la production des sporozoïtes, au niveau cellulaire : la chronologie du développement de *B. divergens* dans les glandes salivaires de tiques n'est toujours pas connue non plus. Ces informations sont de la plus haute importance pour faire des études expérimentales d'infections contrôlées, afin d'isoler les stades de transmission au bon moment. Il est aussi important de pouvoir isoler les stades de transmission pour les études quantitatives. Des méthodes moléculaires, telles que la PCR quantitative en temps réel, pourraient être utilisées pour quantifier les parasites dans les tiques. Mais il a bien été montré ici que la détection d'ADN parasitaire ne reflète ni la viabilité ni surtout le pouvoir infectant des parasites présents. L'isolement et la quantification des parasites vivants pourra permettre de préciser les données quantitatives de la transmission de *B. divergens* par *I. ricinus*. Aucune donnée précise n'est en effet disponible concernant le taux d'acquisition, le taux de transmission au stade suivant, le pourcentage de persistance au fil des transformations de la tique, le taux de retransmission pour une tique infectée, etc. Il est important de connaître tous ces paramètres pour pouvoir modéliser la transmission et évaluer les situations à risque en élevage.

Toutes ces données quantitatives sur la transmission de *B. divergens* par *I. ricinus* pourront servir non seulement à mettre en évidence d'éventuelles différences de compétence vectorielle entre populations d'*I. ricinus*, mais aussi à étudier des différences entre souches de *B. divergens*. De nombreux isolats de *B. divergens* ont en effet été isolés au laboratoire, à partir de bovins porteurs ou malades, et ces parasites présentent un polymorphisme génétique important. Malgré l'existence de cette hétérogénéité, les liens avec des différences potentielles de virulence et d'infectivité n'ont pas encore été évalués. Pour évaluer des différences d'infectivité entre isolats de *B. divergens*, il est nécessaire de réaliser des expériences standardisées d'infection de tiques et pour ce faire, de pouvoir quantifier le nombre de

parasites utilisés (gamétocytes) et produits (sporozoïtes). De plus, une tique peut être infectée par plusieurs souches de *B. divergens*. La présence de deux types parasitaires, dans un même vecteur, pourrait être à l'origine de recombinaison génétique lors de la reproduction sexuée du parasite. Ainsi de nouveaux variants parasitaires pourraient apparaître, pouvant être à l'origine de souches de virulence différente et de l'apparition de cas clinique de babésiose dans des troupeaux jusqu'alors asymptomatiques. Pour pouvoir étudier ce phénomène, il faut connaître précisément les stades sexués, pouvoir les quantifier et suivre leur développement. Il est également nécessaire de pouvoir isoler et identifier les parasites présents dans les glandes salivaires et transmis par la tique, pour les comparer génétiquement et phénotypiquement avec les gamétocytes qui ont été ingérés au stade précédent. La confirmation de l'existence de la reproduction sexuée par la mise en évidence de la recombinaison génétique passe donc par l'identification et la quantification des gamétocytes et des sporozoïtes.

L'enjeu que représente l'identification des stades de transmission de *B. divergens* est donc très important. De nombreuses études et moyens de contrôle découlent de la connaissance de ces stades parasitaires. L'apparition sporadique des cas cliniques de babésiose bovine pourrait notamment être appréhendée et expliquée par les caractéristiques particulières de la transmission de *B. divergens*.

Annexes

1) Article 1 : Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique

S. BONNET*

M. JOUGLIN

L. MALANDRIN

C. BECKER

A. AGOULON

M. L'HOSTIS

A. CHAUVIN

UMR ENVN/INRA 1034, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Interactions Hôte-Parasite-Milieu, Atlanpole-La Chantrerie, B.P. 40706, 44307 Nantes cedex 03, France.

Running title: *B. divergens* transmission by *I. ricinus*

*Corresponding author: Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service de parasitologie, UMR ENVN/INRA 1034 Interactions Hôte-Parasite-Milieu, Atlanpole-La Chantrerie, B.P. 40706, 44307 Nantes cedex 03, France. Phone: 33 2 40 68 78 58. Fax: 33 2 40 68 77 51. E-mail: bonnet@vet-nantes.fr.

Parasitology, 2007, **134**, 197-207

Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique

S. BONNET*, M. JOUGLIN, L. MALANDRIN, C. BECKER, A. AGOULON, M. L'HOSTIS and A. CHAUVIN

UMR ENVN/INRA 1034, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Interactions Hôte-Parasite-Milieu, Atlanpole-La Chantrerie, B.P. 40706, 44307 Nantes cedex 03, France

(Received 3 May 2006; revised 21 July 2006; accepted 25 July 2006; first published online 1 November 2006)

SUMMARY

Although *Babesia divergens* is the principal confirmed zoonotic *Babesia* sp. in Europe, there are gaps in our knowledge of its biology and transmission by the tick *Ixodes ricinus*. In order to reproduce the part of the parasite cycle that occurs in the vector, an *in vitro* animal skin feeding technique on blood containing *in vitro* cultivated *B. divergens* was developed. Parasite DNA was detected in all samples of salivary glands of nymphs and adults that had fed on parasitized blood as larvae and nymphs, respectively, indicating acquisition as well as a transstadial persistence of *B. divergens*. PCR performed on eggs and larvae produced by females that had fed on parasitized blood demonstrated the existence of a transovarial transmission of the parasite. Gorging *B. divergens* infected larvae on non-infected gerbils showed persistence of the parasite over moulting into the resulting nymphs. These results indicate that the parasitic stages infective for the vector (i.e. the sexual stages) can be produced *in vitro*. To our knowledge, this is the first report of artificial feeding of *I. ricinus* via membrane as well as *in vitro* transmission of *B. divergens* to its vector. The opportunities offered by the use of such a transmission model of a pathogen by *I. ricinus* are discussed.

Key words: *Babesia divergens*, *Ixodes ricinus*, transmission, ticks, experimental infection.

INTRODUCTION

Ticks are among the most important vectors of human and animal diseases and surpass all other arthropods in the variety of the pathogenic organisms transmitted, including fungi, viruses, bacteria, and protozoa. *Ixodes ricinus* is the most widespread and abundant ixodid tick in Western Europe and frequently bites humans. It is an important vector of zoonotic diseases, including Lyme disease, tick borne encephalitis, ehrlichiosis and babesiosis. Despite its importance, our knowledge of pathogen transmission by ticks is incomplete, especially concerning protozoa-like piroplasms. Difficulties in rearing ticks as well as reproducing the parasitic life-cycles in the laboratory could partly explain this lack of data. It is essential to study the mechanism of tick infection and parasite infectiousness in order to understand the parasite–host–vector relationships and in order to develop new control strategies of the transmitted pathogens.

Babesia divergens is a bovine blood piroplasm transmitted by the tick *I. ricinus*, which can cause

human babesiosis in immunocompromised patients. It appears to be the main confirmed zoonotic *Babesia* sp. in Europe (Gorenflot *et al.* 1998). *B. microti*, responsible for several hundred human cases reported each year in the United States (Kjemtrup and Conrad, 2000), is also present throughout Europe, but no verified cases of human disease have been reported on this continent, probably because its vector, *I. trianguliceps*, does not bite humans. However, recent field studies have demonstrated that *I. ricinus* could also be a vector of *B. microti* (Duh, Petrovec and Avsic-Zupanc, 2001; Gray *et al.* 2002) and some seroprevalence studies suggest that parasitic infections of humans may also occur in Europe (Foppa *et al.* 2002). In 2003, Herwaldt *et al.* reported the molecular characterization of a new *Babesia* species isolated from 2 human cases in Italy and Austria, which appeared to be closely related to *B. divergens* (Herwaldt *et al.* 2003). For cattle, *B. divergens* is the most pathogenic and widespread *Babesia* in northern temperate areas (L'Hostis *et al.* 1995).

Life-cycles of *Babesia* species are poorly known, even though *in vitro* cultivation of the blood stages was first described in 1982 (Väyrynen and Tuomi, 1982). Only asexual reproduction within the salivary glands of vector ticks and within the blood cells of vertebrates could be identified with certainty. The

* Corresponding author: Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service de Parasitologie, UMR ENVN/INRA 1034 Interactions Hôte-Parasite-Milieu, Atlanpole-La Chantrerie, B.P. 40706, 44307 Nantes cedex 03, France. Tel: +33 2 40 68 78 58. Fax: +33 2 40 68 77 51. E-mail: bonnet@vet-nantes.fr.

occurrence of sexual stages during the life-cycle of piroplasms has long been a matter of controversy. Koch in 1906 described the so called 'Strahlenkörper' (ray bodies) in the gut of female ticks as developing stages of the genera *Theileria* and *Babesia* (Koch, 1906). For *B. divergens*, strong evidence of a sexual cycle was given in 1990 by measurements and comparison of DNA levels of developmental stages of the parasite in the blood of the vertebrate host as well as in the gut, haemolymph and salivary glands of the tick vector (Mackenstedt *et al.* 1990). Each tick life-cycle stage (larva, nymph and adult) feeds only once, implying a persistence of the pathogen from one instar to the next to ensure transmission. Questions remain as to whether each instar can acquire and transmit *B. divergens* to vertebrate hosts. If there is transovarial transmission of the parasite it would appear that the engorging female tick is the only stage that can acquire babesial infection from its mammalian host but this would require experimental proof (Donnelly and Peirce, 1975; Friedhoff and Smith, 1981).

In order to investigate some of the mechanisms that control pathogen transmission as well as the relationship between them and tick vectors, an artificial feeding technique that allowed infection of ticks with known numbers of pathogens was needed. In the present study, a membrane technique for infecting *I. ricinus* with *B. divergens* from culture was devised and with it some of the parameters that govern tick transmission of the parasite were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Parasite and tick maintenance

Ticks. A *Babesia*-free colony of *I. ricinus* ticks collected from Belle Ile en mer, a babesiosis-free island of Morbihan (France), was used in all the experiments. Ticks were reared and maintained in humidity chambers with a relative humidity (R.H.) of 80–90% at 22 °C. Every 4 months, all instars were fed on pathogen-free animals in order to maintain the colony: gerbils (*Meriones unguiculatus*) were used for larvae, rabbits for nymphs, and adults were fed either on rabbits or sheep. After moulting, larvae, nymphs and adult males and females were all reared in separate boxes.

***B. divergens* isolate.** A *B. divergens* isolate named BOB was originally isolated in June 2004 in Objat (Corrèze, France) from a naturally infected bovine in the acute phase of the disease as previously described (Malandrin *et al.* 2004), except that isolation and cloning were performed in bovine red blood cells in the presence of 20% foetal calf serum (FCS, Cambrex; de-complemented for 30 min at 56 °C) instead of sheep red blood cells with 10% FCS. BOB 2 is a clone from the original isolate, which was then maintained *in vitro* only with bovine erythrocytes.

Sequencing part of the 18S gene (see below) of the parasite strain confirmed the identity as *B. divergens*.

Blood samples used in parasite culture and skin feeding experiments. Ovine or bovine blood used in all experiments came from 3 sheep and a *Babesia*-free bovine (the status of these animals is regularly tested for parasite detection by indirect immunofluorescence detection tests with immune sera as well as blood culture tests on bovine erythrocytes) reared at the National Veterinary School of Nantes (France). Lithium heparinized vacutainer tubes were used to draw blood by venepuncture. Blood samples were immediately centrifuged for 10 min at 800 g in order to separate red blood cells, buffy coat and plasma. The pellet of red blood cells was then washed and diluted 1:3 with RPMI 1640 (Cambrex) containing 50 µg/ml gentamicin (Cambrex) and 0.25 µg/ml amphotericin B (Cambrex). Erythrocytes were then maintained at 4 °C until use for parasite culture or as negative control for experimental infections. The same concentrations of gentamicin and amphotericin B were added to the remaining plasma, which was frozen at –20 °C until use. For control experiments, non-infected erythrocytes, cleared of RPMI by a centrifugation step of 10 min at 800 g, were mixed with 1:3 (v/v) of homologous plasma. For infection with parasitized blood, infected erythrocytes from *in vitro* culture (see below) were also obtained by centrifugation and diluted 1:3 with the same homologous plasma. In each case, blood was pre-warmed at 37 °C, and used immediately for artificial feeding.

***In vitro* culture of *B. divergens*.** The parasite was maintained *in vitro* as previously described for culture in sheep erythrocytes (Chauvin *et al.* 2002), except that 20% foetal calf serum (Cambrex; de-complemented) (instead of 10%) was used in the case of bovine erythrocytes. Briefly, parasites were maintained in 75 cm² tissue culture flasks at 37 °C in 5% CO₂-air, in a final volume of 40 ml containing 30 ml of RPMI 1640 (Cambrex) with 50 µg/ml gentamicin (Cambrex) and 0.25 µg/ml amphotericin B (Cambrex), either 8 ml of FCS or 4 ml of ovine serum, and 1 ml of bovine or ovine red blood cells pelleted by a centrifugation step of 10 min at 800 g. Parasitaemia was evaluated daily by May-Grünwald Giemsa-based staining (Diff-Quick, Dade Behring) of thin smears and maintained routinely at 2–3% by dilution with fresh red blood cells during medium change.

Artificial feeding of I. ricinus on gerbil and rabbit skins

Animal skins. Gerbil or rabbit skins were obtained from animals previously used for rearing tick colonies in the laboratory. Pieces of animal skin were

obtained by skinning slaughtered animals. The skin was cut into 10 cm diameter pieces and treated as described by Musyoki *et al.* (2004) with slight modification: skin was first sterilized in 70% alcohol, rinsed in 2 changes of sterile distilled water, 2 changes of sterile PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) and finally sterilized again in a solution of 50 µg/ml gentamicin (Cambrex), 0.25 µg/ml amphotericin B (Cambrex), 0.25 µg/ml streptomycin (Sigma) and 0.25 U/ml penicillin (Sigma). The skins were then stored at -20 °C prior to use.

Artificial feeding. As described in Fig. 1, ticks were placed in plastic cell culture boxes pierced at the top in order to accommodate the glass feeder. Three or 8 ml of restored ovine or bovine blood were put into a 4 or 7 cm diameter glass feeder, respectively, designed for mosquitoes feeding (Bonnet *et al.* 2000). The feeder apparatus was closed with a slightly stretched Parafilm® membrane at the top and with a gerbil or a rabbit skin membrane at the bottom. Gerbil skins were used to feed larvae, and either gerbil or rabbit skins to feed nymphs and adults. In order to attract the ticks and to preserve parasites, constant temperature (37 °C) was maintained by a water-jacket circulation system through the glass feeder. The culture box containing ticks was arranged under the feeding apparatus and the blood was presented to the ticks until repletion with 2 changes per day. At each blood change, the upper dermal side of the skin, in contact with the blood, was washed with sterile water followed by RPMI containing gentamycin and amphotericin B as used for parasite culture. To feed adult ticks, an equal number of males and females was used. Glass feeders were autoclaved prior to use and all manipulations were done under sterile conditions. The rearing was performed in a climatized incubator at 22 °C, 80–90% R.H. and an ambient CO₂ level.

I. ricinus infection and *B. divergens* transmission

Experimental infection. Daily thin blood smears were taken from the culture, which was diluted with fresh red blood cells to obtain a parasitaemia of around 5–8% of infected erythrocytes for experimental infections. Blood was changed twice a day in feeders and replaced with parasitized erythrocytes and plasma as described above. Following tick feedings, only fully engorged ticks that spontaneously detached were retained for the study and were placed in a humidity chamber.

In order to check the ingestion of parasites by the ticks, some engorged nymphs and adult females were dissected the day post-repletionem (p.r.). The whole intestine was removed and dissected in sterile PBS 1X in order to detect the parasite in the bloodmeal by microscopical examination of smears stained with

Giemsa-based coloration. Remaining engorged larvae and nymphs were then allowed to moult to nymphs and adults (around 2–3 months p.r.) and at least 1 month after moulting, salivary glands were dissected in order to detect the parasite by PCR amplification. Engorged females were allowed to lay eggs during about 10–30 days, some eggs were then analysed for the presence of parasitic DNA by PCR amplification and the remaining ones were allowed to transform into larvae, which were also subjected to DNA extraction for parasite detection by PCR amplification. Larvae, the issue from female adults exposed to infection with *B. divergens* by skin feeding were examined in order to evaluate parasite persistence over moulting. Approximately 150 larvae were applied by brush to each of 2 non-infected gerbils. The animals were maintained over trays of water from which detached engorged ticks were harvested. Salivary glands of nymphs that developed from these larvae were then analysed for infection as described below.

PCR detection of *B. divergens* in *I. ricinus*. Salivary glands from *I. ricinus* adults and nymphs were dissected under a magnifying glass in sterile PBS 1X. All dissection material was cleaned with DNA off (Eurobio) and rinsed with sterile water between each sample. Individual pairs of adult female salivary glands or pools of 2 pairs for nymphs were frozen at -80 °C in 150 µl of PBS 1X until DNA extraction. DNA extraction was performed with Promega extraction kit (Promega) according to the manufacturer's instruction except for a 10-min longer isopropanol precipitation step followed by a centrifugation step of 15 min at 16 000 g. Finally the DNA was rehydrated in 50 µl of rehydration solution for adults and 35 µl for pools of nymph's salivary glands. For the eggs and larvae, about 50 of them were crushed in 150 µl of PBS 1X, frozen at -80 °C, and DNA extracted as described for salivary glands. DNA was then rehydrated in 300 µl of rehydration solution before use for PCR amplification. Control DNA samples were extracted using the same protocol from salivary glands of nymphs and adults as well as from eggs resulting from respectively, larvae, nymphs and adults feeding on non-infected cattle blood. PCR-positive controls were obtained with genomic DNA of BOB 2 prepared from culture samples with a minimum parasitaemia of 10%: *B. divergens* merozoite preparations were obtained by Percoll gradient centrifugation with a density of d=1.08 in PBS (Amersham) and recovered for DNA extraction according to the protocol of the Promega extraction kit.

In each case, PCR amplifications were performed on 10 µl of extracted DNA samples. PCR was performed in a final volume of 30 µl containing 0.33 mM dNTPs (Eurobio), 4 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 1.5 U Taq polymerase (Eurobio) and 0.5 µM of each

Table 1. Repletion rates of *Ixodes ricinus* larvae, nymphs and adult females by skin feeding (Larvae were engorged on gerbil skin (G)

(Nymphs and adults were engorged either on gerbil (G) or rabbit (R) skins. All feedings were performed either on bovine blood (BV) or ovine (OV) blood. Experiments performed in the presence of *in vitro* *Babesia divergens* parasitized bovine or ovine blood are indicated in bold.)

	skin	Origin of blood	Ticks number	Number of engorged ticks collected	Repletion rate (%)
Larvae	G	OV	101	87	86
	G	BV	202	151	75
	G	OV	1144	936	82
Total		1447	1174	81	
Nymphs	G	BV	49	38	78
	G	OV	29	22	76
	G	OV	31	23	74
	R	BV	79	77	98
	R	OV	105	97	92
	R	OV	200	187	94
Total		523	474	91	
Females	G	OV	10	8	80
	G	BV	3	2	67
	R	BV	10	8	80
Total		23	18	78	

of primers BAB GF2 (GYTTGTAAATTGGAA-TGATGG) and BAB GR2 (CCAAAGACTTT-GATTTCTCTC) designed for the 18S rRNA gene of *B. divergens* (AC number: AY046576). Amplification was performed in a programmable thermal cycler PT100 (MJ Research) with a cycling programme as follow: 5 min denaturation step at 94 °C, 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C, and a final elongation step of 10 min at 72 °C. The 559 bp amplification product was visualized on an ethidium bromide-stained 1.8% agarose gel (Eurobio). In the case of a negative result and in order to validate the DNA extraction, samples were subject to a second PCR amplification with primers designed to amplify *Ixodes* sp. DNA (unpublished data).

Some PCR amplification products obtained on each sample (i.e. salivary glands, eggs and larvae) were subjected to direct sequencing by using primers BAB GF2 and BAB GR2 in order to verify the identity of the DNA product with BOB2.

RESULTS

Artificial feeding of *I. ricinus*

A total of 1447 larvae, 523 nymphs and 23 females (and 23 males for reproduction) *I. ricinus* were used in skin feeding experiments. Feeding experiments ran for 6 days for larvae, 12 for nymphs and 20 for adults. For each instar, the time-course of feeding experiments is presented in Fig. 2. In all cases, attachment rate to the membrane was around

90–100%. The repletion rate (percentage of engorged *I. ricinus* to repletion) for the different life stages is presented in Table 1, regardless of whether the blood was infected or not. Larvae repletion rate was not affected by the use of either bovine or ovine blood. Concerning nymphs, a significantly better result was obtained with rabbit skins than with gerbil skins with repletion rates of 94% versus 76%, respectively (χ^2 test, $P < 10^{-7}$). The time-course of the experiment was similar whatever the feeding condition used (rabbit or gerbil skins, bovine or ovine blood, parasitized blood or non-infected blood (see Fig. 2), with a peak of engorged ticks between days 5 and 10. With respect to adult ticks, the experimental conditions between the 3 experiments were too different to reach any conclusion, but it seems that gorging was achieved quicker in the case of rabbit skin (day 17 versus day 20, Fig. 2). Mean body mass of the engorged females was 161 mg (62–288), 72% of the 18 engorged ticks laid eggs between days 8 and 32 p.r. and 77% of them hatched to give living larvae between days 90 and 136 p.r. (Data not shown.)

Transmission of *B. divergens* to *I. ricinus* ticks

The parasitaemias to which the feeding ticks were exposed ranged from 5 to 8%. *B. divergens* parasites were specifically labelled, using a sheep anti-*Babesia* serum, in the bloodmeal of engorged nymphs and adults examined the day of the repletion, proving that the parasite had passed through both gerbil or rabbit skins during the bloodmeal of the ticks (data

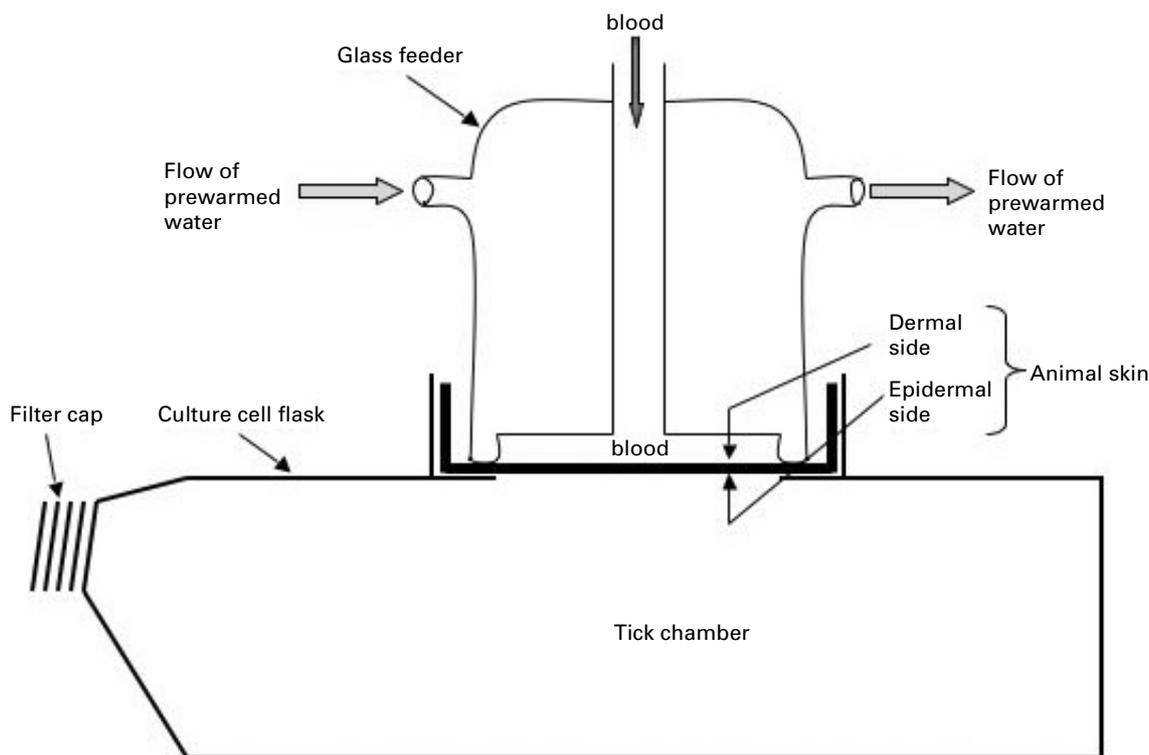


Fig. 1. Diagram of the feeding apparatus used in experimental feeding of *Ixodes ricinus* ticks.

not shown). Tick gut content, May Grünwald Giemsa-stained, showed a mixture of intact erythrocytes containing intact *Babesia*, haemolysed erythrocytes, partially digested parasites, as well as exoerythrocytic parasites different from those observed in culture, which may have been sexual stages (Fig. 3).

Transtadial persistence of *B. divergens*

The presence of *B. divergens* after moulting of the artificially infected instar (nymphs and larvae) was checked for PCR of DNA from the salivary glands. Parasite DNA could be amplified from all tested females ($n=9$) and from all tested pools of nymphal ($n=10$) salivary glands with a band at the expected size of 559 bp (Fig. 4). Amplifications performed on the remaining carcass (whole body except salivary glands) of each tested adult and nymph were also positive (data not shown), indicating that some parasite DNA persisted in the body of the ticks after moulting.

Larval *I. ricinus* infected with *B. divergens* via skin feeding as adults, were used to check for the persistence of the parasite in this vector beyond 1 instar without any additional supply of parasite. PCR analysis performed on the nymphs that moulted from these infected larvae fed on non-parasitized gerbils showed that parasite DNA was still present in salivary glands, indicating that the parasite persists from the adult to the nymph (data not shown).

The resulting 559-bp sequence of PCR products obtained in each condition showed 100% homology with that of the 18S rRNA gene sequence obtained from *in vitro* culture of BOB2 as well as with those published for *B. divergens* (Herwaldt *et al.* 2003; Accession number: AY046576).

Transovarial transmission of *B. divergens*

Positive PCR detection of parasite DNA performed on pools of eggs ($n=7$) resulting from the laying of adults infected by skin feeding demonstrated the transovarial transmission of *B. divergens*. PCR amplifications performed 3 months later on the resulting larvae were also positive, indicating that the parasite DNA remained in the larvae (Fig. 2). In both cases, sequencing of the PCR products showed that we recovered DNA from that of *B. divergens* Accession number AY046576.

DISCUSSION

Despite the great medical and veterinary importance of ticks, relatively few studies have been reported on *in vitro* membrane feeding systems for gorging these vectors, due to their long, complex, and poorly understood feeding pattern (Joyner and Purnell, 1968; Kemp *et al.* 1975; Wetzel, 1979; Kuhnert *et al.* 1995; de Moura *et al.* 1997). To our knowledge, this is the first report concerning membrane feeding of *I. ricinus*. Among the previous reports on other tick

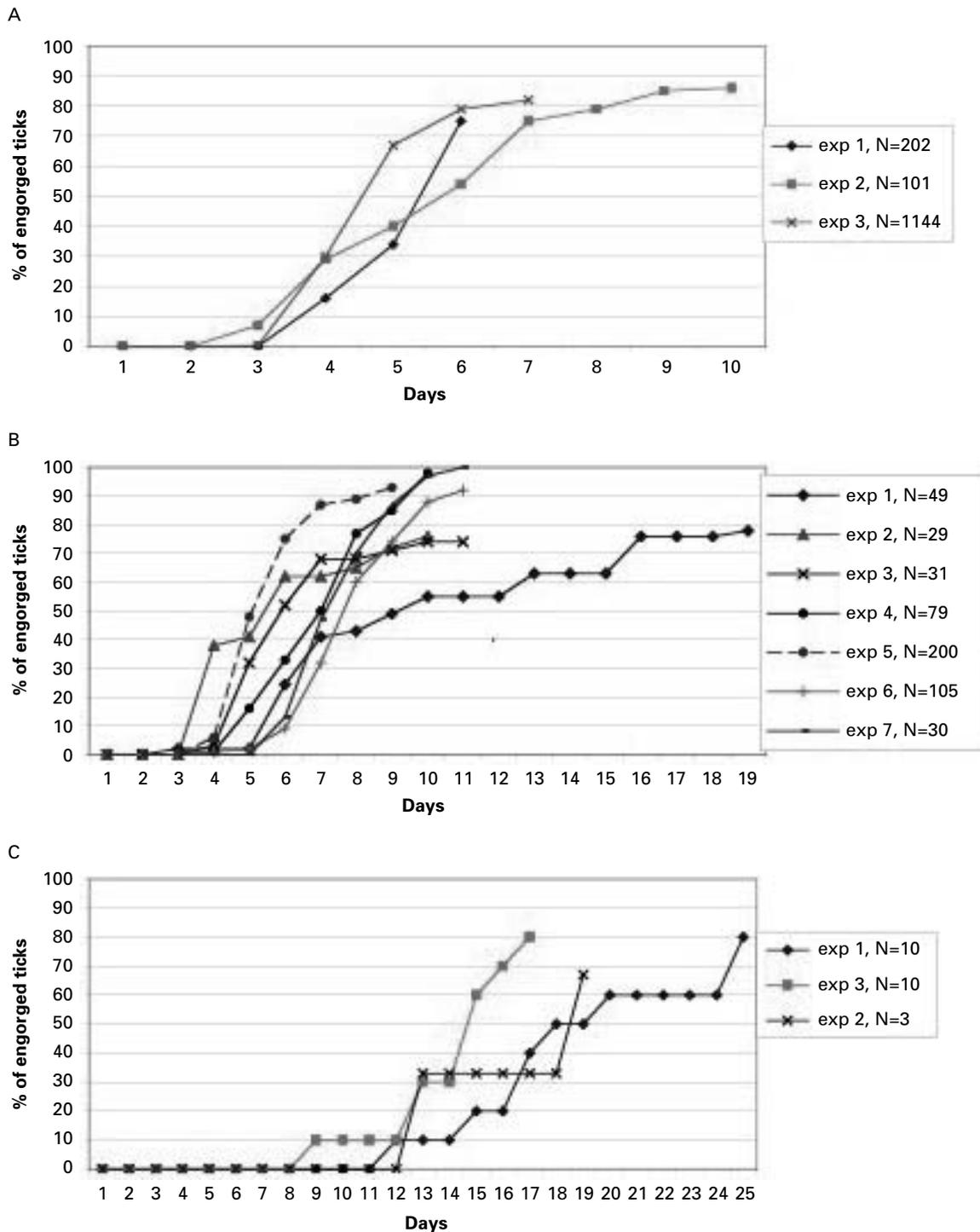


Fig. 2. Daily percentages of engorged (A) larvae, (B) nymphs and (C) adult females of *Ixodes ricinus* via experimental feeding on animal skin membrane.

species, most of the systems used required the use of olfactory stimuli for tick attachment to the membrane, especially when artificial membranes were used. Here, no specific attractants were needed and the skin alone with a blood temperature maintained at 37 °C was enough for attachment of all tick instars. As well, the cleaning of the membrane twice a day by rinsing, the use of a fungistat and bacteriostat were enough to avoid skin decay. In the present system, it

was essential for the blood to be above the ticks for the infection trials because of the rapid sedimentation of the red blood cells. For nymphs and adults, a rabbit skin gave better results than that of gerbil skin. However, no difference was detected with respect to the use of bovine or ovine blood for the gorgement, and the presence of parasites in the bloodmeal seemed to have no influence on the repletion rates of the ticks. Concerning adult females,

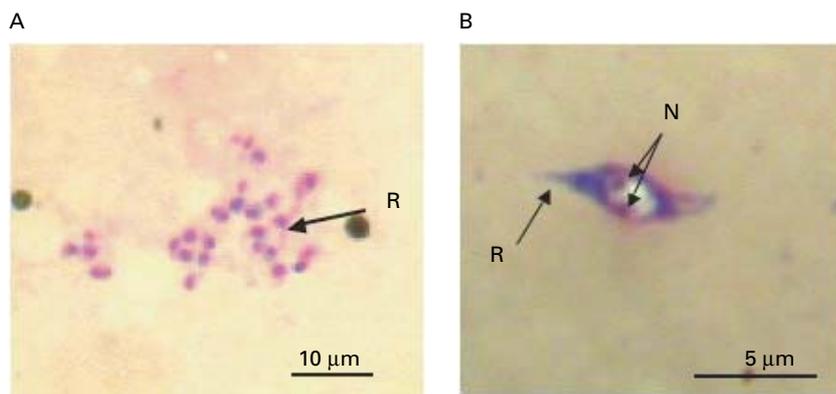


Fig. 3. May Grunwald Giemsa stain of *Babesia divergens* in the gut of *Ixodes ricinus* (A) nymph and (B) adult female at repletion, after artificial feeding on parasitized blood. A: clumping of extracellular forms with raylike protusions (R), B: binuclear (N) form with protrusion (R), which may result from the fusion of 2 gametes.

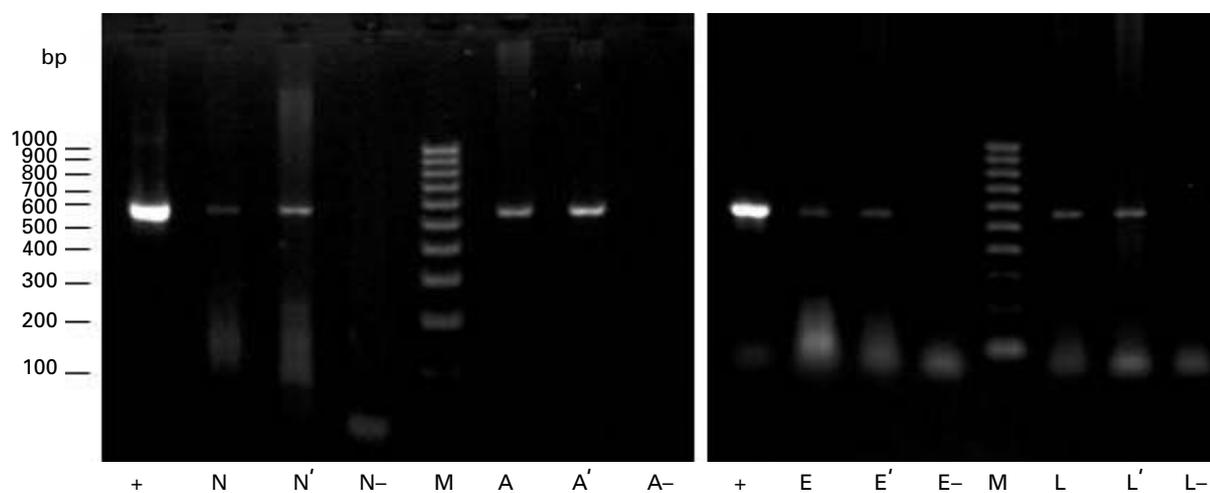


Fig. 4. PCR detection of *Babesia divergens* in *Ixodes ricinus* ticks after feeding on *B. divergens* parasitized bovine blood by skin feeding. M, 100 base-pairs DNA molecular weight marker; +, positive control on babesial genomic DNA from *in vitro* culture; Lanes N, N', salivary glands of nymphs exposed to infection as larvae; Lane N, salivary glands of nymphs moulted from larvae fed on uninfected bovine blood control; Lanes A, A', salivary glands of female adults exposed to infection as nymphs; Lane A, salivary glands of female adult after nymph feeding on uninfected bovine blood control; Lanes E, E', eggs laid by female adults exposed to infection; Lane E, eggs laid by female adults fed on uninfected bovine blood control; Lane L, L', larvae hatched from female adults exposed to infection; Lane L, larvae hatched from female adults feeding on uninfected bovine blood control.

comparison with those engorged directly on ears of naïve live rabbits during the same period ($n=95$), shows that the repletion rate was better on skin membranes ($n=23$) than on animals (78% versus 36%, χ^2 test, $P<10^{-3}$), and that weight gain was also significantly higher with skin feeding (mean of 161 mg versus 115 mg (56–218) than on rabbit; (Mann Whitney test, $P=0.002$). Opposite results were reported for *Amblyomma variegatum* with weight achieved by membrane-fed ticks lower than that achieved by ticks fed on cattle (Voigt *et al.* 1993). No difference was observed between *Rhipicephalus appendiculatus* fed either on membrane or on cattle (Musyoki *et al.* 2004). In contrast, it seems that the percentage of engorged ticks that are able to lay eggs was significantly higher with animal feeding (94%)

than with membrane feeding (72%) (two-sided Fisher's exact test, $P=0.016$). However, more data involving a larger number of ticks are required in order to validate such conclusions.

Several methods have been used to infect ticks with different pathogens, including feeding ticks on infected animals (Joyner *et al.* 1963; Donnelly and Peirce, 1975; Purnell *et al.* 1975; Lewis and Young, 1980; Rudzinska *et al.* 1983; Mackenstedt *et al.* 1990; Mosqueda *et al.* 2004), injecting pathogens through the cuticle (Kocan *et al.* 1986; Rehacek *et al.* 1994; Rechav *et al.* 1999), feeding ticks on artificial or animal skin membrane (Howarth and Hokama, 1983; Voigt *et al.* 1993; Waladde *et al.* 1993; Abbassy *et al.* 1994; Burkot *et al.* 2001; Musyoki *et al.*, 2004), or using capillary tubes filled

with infectious suspensions (Purnell, 1970; Gern *et al.* 1990; Rechav *et al.* 1999; Macaluso *et al.* 2001). Only the last 3 methods allowed the control of the amount of pathogen given to the ticks and among them, only the last 2 could reproduce the natural oral route of the infection, an essential parameter due to the complexity of parasite developmental stages in the gut of the tick. However, infection of ticks by capillary tube feeding implies a pre-feeding on a host followed by force removal of the ticks, leading to difficult manipulations and feeding conditions further from reality than membrane feeding. For all these reasons, we chose to use the membrane skin feeding technique described to evaluate the *in vitro* transmission of *B. divergens* to *I. ricinus*. The positive result obtained in the case of PCR detection performed on the remaining carcass of each positive salivary gland indicated that some parasite DNA persisted in the body of the ticks after moulting. Such a result clearly indicates the importance of performing PCR detection on salivary glands instead of whole ticks, in order to define whether or not the acari are vectors of the pathogen of interest, either in experimental or in field studies.

As a rule, it is admitted that, in the *Babesia* genera, the engorging female tick is the only stage that can acquire parasite infection from its mammalian host with the exception of *Babesia* from rodents, which are acquired by engorging larvae and transmitted by nymphs (Friedhoff and Smith, 1981). To our knowledge, only 3 studies involving tick infection on *B. divergens*-infected animals have been reported (Joyner *et al.* 1963; Donnelly and Peirce, 1975; Lewis and Young, 1980). The studies of Donnelly and Peirce (1975) on cattle showed that only adult females could acquire *B. divergens*, which was then transovarially transmitted to larvae (Joyner *et al.* 1963; Donnelly and Peirce, 1975). The transovarial transmission of the parasite demonstrated in this study, which is characteristic of the *Babesia* genera, confirmed the infection of the adult stage. However, from our results, it seems that *I. ricinus* larvae and nymphs can also acquire *B. divergens*, which persists transtadially in the subsequent nymphal and adult stages. These can probably transmit to the vertebrate host, as the parasite was detected in their salivary glands. In the study by Donnelly and Peirce (1975), ticks were infected on splenectomized calves with a parasitaemia in the range of 5 to 30%. Parasitaemia used in the present study ranged from 5 to 8%, and so this level of parasitaemia does not explain the difference in the results. However, reported failure of the larvae and nymphs to acquire infection could be explained by the small number of experiments reported as well as by the difficulties of controlling parasitaemia during the whole feeding period of the ticks on infected animals (especially at the exact site where the ticks take the blood). The authors noted that not all females of a group of ticks fed on the same

infected bovine host would become infected. Further, as larvae or nymphs take smaller volumes of blood than adults, the probability of ingesting parasites is even lower than for adult females. However, if the results presented here, based on parasite DNA detection by PCR, lead to strong evidence that the ticks are able to acquire the parasite by membrane feeding, conclusion on acquisition and transmission of *B. divergens* by larvae and nymphs could only be confirmed by future *in vivo* experiments.

Moreover, if our results have suggested that all tick instars may represent a risk of infection with *B. divergens*, it is important to note that, in the field, infection of ticks implies that they feed on reservoir hosts of the parasite, which is the case for nymphs and adults on big animals like cattle but not necessarily for larvae that feed on smaller animals like rodents, which are resistant to *B. divergens* infection. Some field studies have suggested that cattle are most readily parasitized by adult ticks and that such instars may be more important for parasite transmission (Gray, 1980; L'Hostis and Chauvin, 1999). In addition, and although occurring in large numbers, larvae tend to have a very aggregated distribution and therefore may infect a small number of hosts. Consequently, this instar is probably of limited importance for the epidemiology of bovine babesiosis caused by *B. divergens* (Gray, 1980). Such observations imply that the parasite must be able to survive throughout all the stages of a generation in order to be transmitted to a susceptible host. Here, we demonstrated by detecting *B. divergens* DNA in the nymphal stage that had fed on non-parasitized blood as infected larvae, that the parasite persists beyond more than 1 moult. A similar result was not obtained with *B. microti*, which does not persist in the tick beyond 1 instar (Gray *et al.* 2002). Concerning this experiment, even though tested, we were not able to detect any parasite in the gerbils used for gorging larvae (the test was done by *in vitro* culture of gerbil blood in sheep red blood cells). One possible explanation of such a result could be the fact that we used non-splenectomized gerbils for this. Indeed, and to our knowledge, the only study that reported *B. divergens* transmission to gerbils by ticks was that of Lewis and Young (1980) in which splenectomized gerbils were used.

As previously reported for another intraerythrocytic parasite, *Theileria parva* (Young *et al.* 1996), our results showed that *B. divergens* remained viable when drawn in heparinized blood and that its transmission to the tick appeared to be efficient in such conditions. Culture of *B. divergens* in blood from its natural bovine host was successfully achieved here and parasitaemia up to 20% was obtained without problem in this system. The demonstrated parasite transmission to the ticks implies that *B. divergens* infective stages are produced *in vitro* in the described culture conditions. This is an

important feature as it is very difficult to obtain sexual stages infective for the vector for other closely related vector-transmitted haemoprotozoan such as *Plasmodium falciparum* (Meuwissen and Ponnudurai, 1988) and because it is suspected that parasites artificially maintained *in vitro* may lose their infectiousness capacity (Stewart *et al.* 1986).

The observation of the tick gut content after repletion showed the complexity of the stages found at any given time. Such diversity came from the fact that the *Babesia* were ingested over a period of time and the development of the parasites was not synchronous. Figure 3A shows parasites with ray-like protrusions as well as some multi-nucleated bodies, which could be 'Strahlenkörper' adhering to each other, similar to those observed with *B. bigemina* (Stewart *et al.* 1986; Gough *et al.* 1998; Mosqueda *et al.* 2004). The binuclear parasite form with a vacuolated cytoplasm presented in Fig. 3B could correspond to the resulting fusion of 2 gametes and is also very similar to those observed for *B. bigemina* (Mehlhorn and Schein, 1984; Stewart *et al.* 1986; Gough *et al.* 1998) or *B. canis* (Mehlhorn *et al.* 1980). Concerning the parasite stages present in the salivary glands of host-seeking ticks, it seems to be established that, for *Babesia* species, sporozoite development begins only when the infected tick attaches to a vertebrate host (Mehlhorn and Schein, 1984). Concerning *B. divergens*, our results demonstrated that the parasites are also already located in the salivary glands before attachment and feeding begin. It will be now of interest to know if the stimulus of feeding permits the development of the parasite into an infective sporozoite form, and if all artificially infected tick instars are capable of retransmitting the parasite to a vertebrate host as previously described with ticks infected on animals (Joyner *et al.* 1963; Donnelly and Peirce, 1975).

Many questions regarding *B. divergens* epidemiology, biology, and transmission by ticks remain unanswered. In order to understand the zoonotic potential of *B. divergens* as well as to improve control mechanisms of the cattle disease, it will be necessary to elucidate the transmission process by ticks. Having a suitable artificial method to feed ticks and to infect them under controlled conditions will now enable us to study the development of the pathogen inside ticks and to discover the mechanisms of its transmission. In addition, there is the potential to study the transmission of several other pathogens transmitted by *I. ricinus*. At last, benefits offered by an effective *in vitro* feeding system for ticks would also include applications in research on substances injected into hosts by the vector as well as those ingested from hosts by the vector.

This project was supported by research funds from the Institut National de la Recherche Agronomique and the Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. We are indebted to

Dr N. Pieniazek for permitting to use primers BAB GF2 and BAB GR2. We acknowledge A. M. Marchand and I. Parray for technical assistance in ticks maintenance and E. and C. Lebigre (DVM) from 'La maison de la nature' in Belle Ile en mer for help in collecting breeding ticks. Particular thanks are also due to Dr P. David for his critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Abbassy, M. M., Stein, K. J. and Osman, M.** (1994). New artificial feeding technique for experimental infection of *Argas* ticks (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology* **31**, 202–205.
- Bonnet, S., Gouagna, C., Safeukui, I., Meunier, J. Y. and Boudin, C.** (2000). Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate infectiousness of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers to mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**, 103–106.
- Burkot, T. R., Happ, C. M., Dolan, M. C. and Maupin, G. O.** (2001). Infection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique. *Journal of Medical Entomology* **38**, 167–171.
- Chauvin, A., Valentin, A., Malandrini, L. and L'Hostis, M.** (2002). Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*. *Veterinary Research* **33**, 429–433.
- de Moura, S. T., da Fonseca, A. H., Fernandes, C. G. and Butler, J. F.** (1997). Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**, 545–548.
- Donnelly, J. and Peirce, M. A.** (1975). Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology* **5**, 363–367.
- Duh, D., Petrovec, M. and Avsic-Zupanc, T.** (2001). Diversity of *Babesia* infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3395–3397.
- Foppa, I. M., Krause, P. J., Spielman, A., Goethert, H., Gern, L., Brand, B. and Telford, S. R.** (2002). Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, in eastern Switzerland. *Emerging Infectious Diseases* **8**, 722–726.
- Friedhoff, K. T. and Smith, R. D.** (1981). Transmission of *Babesia* by ticks. In *Babesiosis* (ed. Kreier, M. R. and Kreier, J. P.), pp. 267–319. Academic Press, Inc., New York.
- Gern, L., Zhu, Z. and Aeschlimann, A.** (1990). Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Annales de Parasitologie humaine et comparée* **65**, 89–93.
- Gorenflot, A., Moubri, K., Precigout, E., Carcy, B. and Schetters, T. P.** (1998). Human babesiosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **92**, 489–501.
- Gough, J. M., Jorgensen, W. K. and Kemp, D. H.** (1998). Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* *in vitro*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **45**, 298–306.

- Gray, J., von Stedingk, L. V., Gurtelschmid, M. and Granstrom, M.** (2002). Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1259–1263.
- Gray, J. S.** (1980). Studies on the activity of *Ixodes ricinus* in relation to the epidemiology of babesiosis in Co Meath, Ireland. *British Veterinary Journal* **136**, 427–436.
- Herwaldt, B. L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S. B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S. and Pieniazek, N. J.** (2003). Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases* **9**, 942–948.
- Howarth, J. A. and Hokama, Y.** (1983). Artificial feeding of adult and nymphal *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) during studies on bovine anaplasmosis. *Journal of Medical Entomology* **20**, 248–256.
- Joyner, L. P., Davies, S. F. and Kendall, S. B.** (1963). The experimental transmission of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus*. *Experimental Parasitology* **14**, 367–373.
- Joyner, L. P. and Purnell, R. E.** (1968). The feeding behaviour on rabbits and *in vitro* of the Ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *Parasitology* **58**, 715–723.
- Kemp, D. H., Koudstaal, D., Roberts, J. A. and Kerr, J. D.** (1975). Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology* **70**, 243–254.
- Kjemtrup, A. M. and Conrad, P. A.** (2000). Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology* **30**, 1323–1337.
- Kocan, K. M., Holbert, D., Edwards, W., Ewing, S. A., Barron, S. J. and Hair, J. A.** (1986). Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midgut epithelial cells of *Dermacentor andersoni*. *American Journal of Veterinary Research* **47**, 1657–1661.
- Koch, R.** (1906). Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplasmen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **54**, 1–9.
- Kuhnert, F., Diehl, P. A. and Guerin, P. M.** (1995). The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* *in vitro*. *International Journal for Parasitology* **25**, 887–896.
- L'Hostis, M. and Chauvin, A.** (1999). *Babesia divergens* in France: descriptive and analytical epidemiology. *Parassitologia* **41**, 59–62.
- L'Hostis, M., Chauvin, A., Valentin, A., Marchand, A. and Gorenflot, A.** (1995). Large scale survey of bovine babesiosis due to *Babesia divergens* in France. *Veterinary Record* **136**, 36–38.
- Lewis, D. and Young, E. R.** (1980). The transmission of a human strain of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Parasitology* **66**, 359–360.
- Macaluso, K. R., Sonenshine, D. E., Ceraul, S. M. and Azad, A. F.** (2001). Infection and transovarial transmission of Rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* **1**, 45–53.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Mehlhorn, H., Schein, E. and Hauschild, S.** (1990). Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. *Parasitology Research* **76**, 199–206.
- Malandrin, L., L'Hostis, M. and Chauvin, A.** (2004). Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using *in vitro* culture. *Veterinary Research* **35**, 131–139.
- Mehlhorn, H. and Schein, E.** (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology* **23**, 37–103.
- Mehlhorn, H., Schein, E. and Voigt, W. P.** (1980). Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*. *Journal of Parasitology* **66**, 220–228.
- Meuwissen, J. H. E. T. and Ponnudurai, T.** (1988). Biology and biochemistry of sexual and sporogonic stages of *Plasmodium falciparum*: a review. *Biology of the Cell* **64**, 245–249.
- Mosqueda, J., Falcon, A., Antonio Alvarez, J., Alberto Ramos, J., Oropeza-Hernandez, L. F. and Figueroa, J. V.** (2004). *Babesia bigemina* sexual stages are induced *in vitro* and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *International Journal for Parasitology* **34**, 1229–1236.
- Musyoki, J. M., Osir, E. O., Kiara, H. K. and Kokwaro, E. D.** (2004). Comparative studies on the infectivity of *Theileria parva* in ticks fed *in vitro* and those fed on cattle. *Experimental Applied Acarology* **32**, 51–67.
- Purnell, R. E.** (1970). Infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva* using an artificial feeding technique. *Research in Veterinary Science* **11**, 403–405.
- Purnell, R. E., Young, A. S., Payne, R. C. and Mwangi, J. M.** (1975). Development of *Theileria mutants* (Aitong) in the tick *Amblyomma variegatum* compared to that of *T. parva* (Muguga) in *Rhipicephalus appendiculatus*. *Journal of Parasitology* **61**, 725–729.
- Rechav, Y., Zyzak, M., Fielden, L. J. and Childs, J. E.** (1999). Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis*. *Journal of Medical Entomology* **36**, 414–419.
- Rehacek, J., Sutakoya, G. and Kocianova, E.** (1994). The use of partially engorged female ticks as laboratory animals in microbiological research. *Medical and Veterinary Entomology* **8**, 165–171.
- Rudzinska, M. A., Spielman, A., Lewengrub, S., Trager, W. and Piesman, J.** (1983). Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* **80**, 2966–2970.
- Stewart, N. P., Dalgliesh, R. J. and De Vos, A. J.** (1986). Effect of different methods of maintenance on the development and morphology of *Babesia bigemina* in the gut of *Boophilus microplus*. *Research in Veterinary Science* **40**, 94–98.
- Väyrynen, R. and Tuomi, J.** (1982). Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia divergens*. *Acta Veterinaria Scandinavica* **23**, 471–472.
- Voigt, W. P., Young, A. S., Mwaura, S. N., Nyaga, S. G., Njihia, G. M., Mwakima, F. N. and Morzaria, S. P.** (1993). *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology* **107**, 257–263.

- Waladde, S. M., Young, A. S., Ochieng, S. A., Mwaura, S. N. and Mwakima, F. N.** (1993). Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed as nymphae *in vitro* on infected blood through an artificial membrane. *Parasitology* **107**, 249–256.
- Wetzel, H.** (1979). Artificial membrane for *in vitro* feeding of piercing-sucking arthropods. *Entomology Experimental Applications* **25**, 117–119.
- Young, A. S., Waladde, S. M. and Morzaria, S. P.** (1996). Artificial feeding systems for ixodid ticks as a tool for study of pathogen transmission. *Annals of the New York Academy of Sciences* **791**, 211–218.

2) Splénectomie de gerbilles

REACTIFS & MATERIEL

Mélange anesthésiant :

0,2 mL de Rompun® 2% (Bayer Santé)

1 mL d'Imalgène® 500 (Merial)

Morphine (chlorhydrate) (Cooper)

Diluer au 1/100 en H₂OΔ

Agrafeuse cutanée à usage unique : Precise™ Vista Skin Stapler 35W (3M)

Compresses stériles

Lames de bistouri n°21 (Swann-Morton)

Fil de suture synthétique monobrin résorbable : Vicryl plus 3-0 (2) aiguille 3/8 de 24 mm de longueur (Ethicon Janssen)

Boîte d'instruments chirurgicaux stériles (contenant manche de bistouri, porte-aiguille, pinces Kocher droites et plates (=clamps), pince à dissection à mors plat, pince à dissection à griffe, ciseaux)

MODE OPERATOIRE

Anesthésier la gerbille : injecter 0,07 mL du mélange anesthésiant par voie intra-péritonéale.

Laisser le produit agir, environ 10 min, jusqu'à ce que l'animal ne bouge plus.

Mettre la gerbille en décubitus latéral droit. Raser la zone abdominale en arrière des côtes.

Inciser la peau, perpendiculairement à la colonne vertébrale, 4mm en arrière des côtes, puis inciser les muscles. Ouvrir le péritoine.

Repérer la rate, la dégager de l'estomac en la décollant légèrement. Poser 2 ligatures sur le pôle vasculaire. Oter la rate, en coupant le pôle vasculaire entre les 2 ligatures.

Suturer le péritoine et les muscles, en réalisant un surjet. Refermer la peau avec des agrafes.

Injecter 0,2 mL de morphine diluée à la gerbille par voie sous-cutanée avant le réveil.

Surveiller les animaux pendant le réveil (6 heures suivant l'opération). Retirer les agrafes une semaine après l'opération.

3) Traitement des peaux d'animaux pour gorgement sur membrane

REACTIFS

Alcool modifié 70% (LPG)

PBS 10X :	NaCl	80,00 g
	Na ₂ HPO ₄	15,10 g
	KCl	2 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	H ₂ OΔ	qsp 1 L

PBS 1X : Diluer 10 fois le 10X en H₂OΔ

Eau distillée stérile

Gentamicine (Cambrex)

Streptomycine (Sigma)

Pénicilline (Sigma)

Amphotéricine B (Cambrex).

MODE OPERATOIRE

Des peaux d'animaux sont obtenues par dépeçage d'animaux euthanasiés (gerbilles et lapins). La peau est découpée en morceaux de 10 cm de diamètre et traités comme décrit par Musyoki *et al.* (Musyoki *et al.*, 2004) avec quelques modifications.

La peau est d'abord stérilisée dans l'alcool à 70% puis rincée dans un bain d'eau distillée stérile. La peau est ensuite plongée dans un bain de PBS 1X stérile. La peau est plongée finalement dans une solution d'eau distillée contenant 50 µg/mL de gentamicine, 0,25 µg/mL de streptomycine, 0,25 U/mL de pénicilline et 0,25 µg/mL d'amphotéricine B.

Les peaux sont stockées à plat dans du papier aluminium à -20°C jusqu'à utilisation.

4) Extraction d'ADN

REACTIFS

Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega)	
Isopropanol (Sigma)	
Ethanol 70%	
Ethanol absolu (99%) (SAD)	100 mL
Eau distillée	46 mL
PBS 1X	

MODE OPERATOIRE

Les échantillons utilisés ont été congelés à -20°C avant extraction.
Toutes les étapes de centrifugation se font à température ambiante, à 16 000 g.

Lyse cellulaire par 900 μL de Cell Lysis Solution du kit (incubation 10 min à température ambiante).

Centrifuger 20 s. Eliminer le surnageant.

Remettre en suspension avec 300 μL de Nuclei Lysis Solution, retourner 5-6 fois.

Ajouter 1,5 μL de RNase, incuber 15 min à 37°C .

Rajouter 100 μL de Proteins Precipitation Solution, mélanger au vortex 15s.

Centrifuger 3 min.

Transférer le surnageant dans un nouveau tube 1,5 mL, ajouter 300 μL d'isopropanol, retourner doucement jusqu'à précipitation de l'ADN.

Centrifuger 2 min. Eliminer l'isopropanol.

Ajouter 300 μL d'éthanol 70%

Centrifugation : 2 min. Eliminer l'éthanol et sécher à l'évaporateur (Concentrator 5301, Eppendorf) 12 min à température ambiante.

Réhydrater l'ADN extrait dans un volume adapté d'eau ou de Rehydratation Solution, laisser toute la nuit 4°C ou 3 h à 37°C ou 1 h à 50°C puis conserver à 4°C .

Volume recommandé pour la réhydratation des échantillons, pour utilisation directe en PCR

Echantillon	Œufs	Larves	Nymphes	Nymphe	Adulte	Glandes salivaires	GRP
Quantité par tube	7,5 mg = 125 œufs	40	10	1	1	1	150 μL (+150 μL de PBS)
Volume de réhydratation (μL)	75	350	100	40	50	20	100

5) Liste des amorces définies pour la caractérisation des gènes *ccp* chez *B. divergens*, classées par gènes et par méthodes d'utilisation

Toutes les amorces définies au cours de cette thèse sont présentées dans ces tableaux. Les numéros de chaque amorce correspondent à ceux indiqués dans la Figure 22. Les amorces non numérotées ont été utilisées sans donner de résultats.

bdccp1

n°	nom	Up séquence	n°	nom	Down séquence
Amorces dégénérées Série 1					
	723_BIFA_UP	AGRGAARTRMAMMTMRMGG		723_BIFA_Do	TTGGTWGARCAYACAATAGC
1	723_BAB_UP	AGGGARRTMCACATYGTSGG	1'	723_BAB_Do	TTGGTKGAGCAYACWATAGC
	723_FA_UP	AGAGAAGTGAAACTAATAGG		723_FA_Do	TTGGTAGAACATACAATAGC
	723_BI_UP	AGGGAAATACACATCGTCGG		723_BI_Do	TTGGTTGAGCACACAATAGC
Amorces spécifiques de <i>B. divergens</i>					
2	723 BD Up	GCCTAACCTCTGTCAGTCCTTCC	2'	723 BD Down	CTTGTATGCAAGGGGCACG
Amorces dégénérées Série 2					
	723_3_BbiUp1	CTACCACACGACGCTGCTG	3'	723_3_BbiDo1	AACTCACCCCTTCGCAGTG
3	723_3_BbiUp2	GTGCCAGAAAAACAACCAC		723_3_BbiDo2	CACTAGGCTGTTACTACTGC
Amorces dégénérées Série 3 (régions intergéniques)					
	723 Ext Up1	TGSTKGACGAWCGGTTYCCGG		723 Ext Do	CTASACTARSSTGTTRCACTGC
	723 Ext Up2	TGTCGTWKC GGAATCC			
Amorces définies pour le RACE					
4	723 RACE Up1	CCTCTAGCTATCAGGTATCAGTGTGC	7	723 RACE Do	CCATCGGCATACATCATCGCTCTCA
5	723 RACE Up2	GGGAGATGGAAGTTCTCACCAGTA	8	723 NeRACE Do	TTTGGAAGGACTGACAGAGGTTAGG
6	723 NeRACEUp	GATGGGCTCAAGGAGGCATTGTAC			
Amorces utilisées par Millegen					
3	723_3BbiUp2	GTGCCAGAAAAACAACCAC	7	723RACEDo	CCATCGGCATACATCATCGCTCTCA
			8	723NeRACEDo	TTTGGAAGGACTGACAGAGGTTAGG
			9	723NeRACEDO_S1	TTAATGGATCCTCGGAGTGTC
Amorces internes utilisées pour le séquençage et la RT-PCR					
10	723_3Bd Up1	ATCATTTTCGTGCCCCCTTGC	14	723_3Bd Do	CGCAGTGATCGTATCCCACCCCC
11	723_3Bd Up2	AGACCGACGCACAAGGCACAGG	15	723_3 BD Do2	CCCATGTCTAGCGTATCCTGCG
12	723_3 BD Up3	CCCAATAGTGGAGACCCACG	16	723_3Bd_Do3	CTTACATTCGGGTGTTGGAC
13	723_3Bd_Up4	GTGCTGTACATACAATGAGAC			
Amorces des extrémités du gène					
	723Start1	ATGAAGCCCTGCGATCTACCATACAGG	17'	723Stop	CTACAGAAGGTTGTTGCACTGATTTACGC
17	723Start2	ATGCTTATATTWGAAGCCTGG			

bdccp2

n°	nom	Up séquence	n°	nom	Down séquence
Amorces dégénérées Série 1					
532	BIFA_UP	SAAYWTKTGYYTMTCSAAG	532	BIFA_Do	TKTWCATRTRCRAAWAYACYC
1	532_BAB_UP	KAACMTKTGCSTSTCRCAAG	1'	532_BAB_Do	TGTACATRTRCGCARTAYACCC
	532_FA_UP	CAATTTTTGTTTATCCCAAG		532_FA_Do	TTTTTCATATCACAAAATACTC
	532_BI_UP	GAACATGTGCCTCTCGCAAG		532_BI_Do	TGTACATGTGCAATACACCC

Amorces spécifiques de *B. divergens*

2	532_Bd Up	CCTACCACGGAAGCAGCACCC	2'	532_Bd Down	CCACTCAATCTGACGACGCCTG
	532NT Bd Up	CCCTCAGTTCAACGCAGAGCGTGC		532NT Bd Do	CGTTTGAAACTCGCTCGAAGGATCG

Amorces utilisées pour l'expression du peptide recombinant rpBdCCp2

3	532 ChampUp	CACCCTACCACGGAAGCAGCAC	3'	532 ChampDo	CTAGACACAATCTGACGACGCCTG
---	-------------	------------------------	----	-------------	--------------------------

Amorces dégénérées Série 2

4	532_3_BbiUp	CATCGTACAGATGCACAAGGG	4'	532_3_BbiDo	ATAGACCGACAGTTCCGCC
	532_3_BboUp	CATCATAACAGATGCACAAAGG		532_3_BboDo	ATAATCCTACAGTTCCACC

Amorces définies pour le RACE

532	RACE Up	CTAGCACAGGAACTAGAACGATCC	5	532 RACE Do	GTAAGACTGTAGGTTCCCGTCTAGTG
532NeRACEUp		GGAAGTACAAGAAAAGTACAAGACAG	6	532NeRACEDo	TGAGGGTTCGTGCTTCCGTGGTAG

Amorces dégénérées Série 3 (régions intergéniques)

532	ExtBDUp	AACAGGGAATACGTCTAACAAATG	7'	532 Ext Do1	TGYAAYSTKGAGATGTAGG
532	Ext Up1	GGATTCCCTC	8'	532 Ext Do2	AACTACRTWYTSTGTCCGC
532	Ext Up2	CATGGTAGCC		532 Ext Do3	ATWTTTRYACACYACCAAGCG

Amorces internes utilisées pour le séquençage et la RT-PCR

7	532_3BdUpA	TGAAGGGAATGGTCATTGGTGC			
8	532_3BdUpB	CAAACCTGACGCTGTAAGTGC			
9	532_3_BdUp	GAAGTACAAGATCCCTTCGAGCG	12	532_3Bd Do2	CGCACATCCTCTGCCACGGC
10	532_3_BdUp2	GACGGTACTACAAGTGTCGTGTCC	13	532_3Bd Do3	ACTCCCGTGGGTACAGTCCG
11	532_3Bd Up3	AGACACAGTGTTCGACGTGCC	14	532_3Bd Do4	ATAGAGCCCATTGTTTCCGCC
			15	532_5_BdDo2	GTTCCTCCCTGGAAGTGGAC

Amorces des extrémités du gène

16	532Start	ATGGAAGTCATACGCCTG	16'	532Stop	TCAGGAGCTACACAAACTGCGGCAGC
----	----------	--------------------	-----	---------	----------------------------

bdccp3

n° nom	Up séquence	n° nom	Down séquence
Amorces dégénérées Série 1			
067_BIFA_UP	YGAYCCKTGGTAYTGYG	067_BIFA_Do	GCCTTRCAKATYGAYGARTC
1 067_BAB_UP	YGACCCKTGGTACTGYG	1' 067_BAB_Do	GCCTTGCAKATMGACGARTC
067_FA_UP	TGATCCTTGGTATTGTG	067_FA_Do	GCTTTACATATTGATGAATC
067_BI_UP	CGACCCGTGGTACTGCC	067_BI_Do	GCCTTGCAKATCGACGAGTC
Amorces spécifiques de <i>B. divergens</i>			
2 067 Bd Up	TGGTACTGCGAGTATGTGCG	2' 067 Bd Do	ACCTTGCTGCCGTTAAGGAC
Amorces définies pour le RACE			
3 067_RACE Up	CCACTCTCCAACCTCGTATGACTGT	4 067_RACE Do	GGTGACCTCAACTGTAGCTTCGTA
Amorces dégénérées en externe			
5 067 Ext Up1	CAGATGGAGACACNCTNG	067 Ext Do1	GARAAACGRTGMGGCAC
6 067 Ext Up2	CGWCTGGACGATATSAGC	067 Ext Do2	CCGTAKATGGACTCCCC
Amorces utilisées par Millegen			
3 067RACE Up	CCACTCTCCAACCTCGTATGACTGT		
7 067RACEUP_S1	AGGCGGCGAGGCAGTTGTACGA		
8 067RACEUP_S2	TGTTACAGTGCCCTCCGGGAT		
Amorces internes utilisées pour le séquençage et la RT-PCR			
		9 067_3Do1	GAAAACACGCGCAGGAAGG
		10 067_3Do2	GTAACAGCATGCGCGTGCC
11 067BD Up2	GCTTGCCAGGAGATGGG	13 067BD Do2	CGCCCATGTTGTCAATGGC
12 067BD Up3	GGGTTTCAATGGCAATGCG	14 067BD Do3	GAAATGTCATCTTCCGTTCCC
Amorces définies pour le RACE			
15 067RACEUp2	CAGTTGTCACGATTCTACATGGTCGC		
16 067RACEUp3	CAAGGTGTTGACTCTGTCGTGTC		
Amorce dégénérée Série 2			
		17 067_3BbDo3	CTCTTSAGGTACTGGCC

6) Extraction d'ARN total avec le TRIzol®

REACTIFS

Culot de globules rouges parasités par *B. divergens* (10% de parasitémie environ) produits *in vitro*

TRIzol® Reagent (Invitrogen)

Chloroforme (Sigma)

Isopropanol (Sigma)

Ethanol à 70%

Eau ultrapure (Distilled water DNase Free RNase Free, Gibco)

RQ1 RNase-Free DNase (Promega)

Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega)

Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA (Sigma)

Acétate de sodium 3 mol/L

Sodium acetate ≥99.0%, anhydrous (Sigma) 246 mg

H₂OΔ qsp 1 mL

MODE OPERATOIRE

1. Ajouter le TRIzol sur le culot de globules rouges parasités, à raison de 5 mL de TRIzol pour 1 mL d'hématies. Mélanger vivement, en pipétant, au vortex puis en secouant. Conserver la préparation congelée à -80°C jusqu'à utilisation.
2. Décongeler la préparation et aliquoter à raison de 1 mL par tube Eppendorff. Ajouter 200 µL de chloroforme par tube, mélanger au vortex pendant 15 s. Laisser incubé 5 min à température ambiante. Centrifuger 20 min à 4°C à 12 000 g.
3. Prélever la phase supérieure et la transférer dans un nouveau tube. Ajouter 500 µL d'isopropanol. Mélanger au vortex 15 s. Placer les tubes à 4°C (au minimum 2 heures et au mieux une nuit).
4. Centrifuger 2 tubes 25 min à 4°C à 12 000 g. Eliminer le surnageant. Rajouter le contenu d'un nouveau tube sur le culot d'ARN précipité au fond du tube, centrifuger de nouveau. Procéder ainsi jusqu'à épuisement des tubes, de manière à pooler l'ARN contenu dans plusieurs tubes.
5. Ajouter sur le culot 500 µL d'éthanol à 70%. Centrifuger 20 min à 4°C à 12 000 g. Effectuer ainsi 3 lavages au total.
6. Sécher le culot 5 min à l'évaporateur (Concentrator 5301, Eppendorf). Réhydrater le culot dans 100 µL d'eau ultrapure. Conserver à -80°C.

Si besoin, l'ARN peut être traité à la DNase pour éliminer toute contamination résiduelle par de l'ADN. Ajouter pour 50 µL d'ARN, 30 µL de RQ1 RNase-Free Dnase et 8 µL du tampon 10X associé, ainsi que 2 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor. Laisser incubé 45 min à 37°C.

a) Ajouter la solution RQ1 DNase Stop Solution et utiliser la solution telle quelle (en RT-PCR par exemple) ou

b) Purifier l'ARN par extraction au phénol/chloroforme. Ajouter 400 µL de phénol/chloroforme, mélanger au vortex. Centrifuger 5 min à 4°C à 12 000 g.

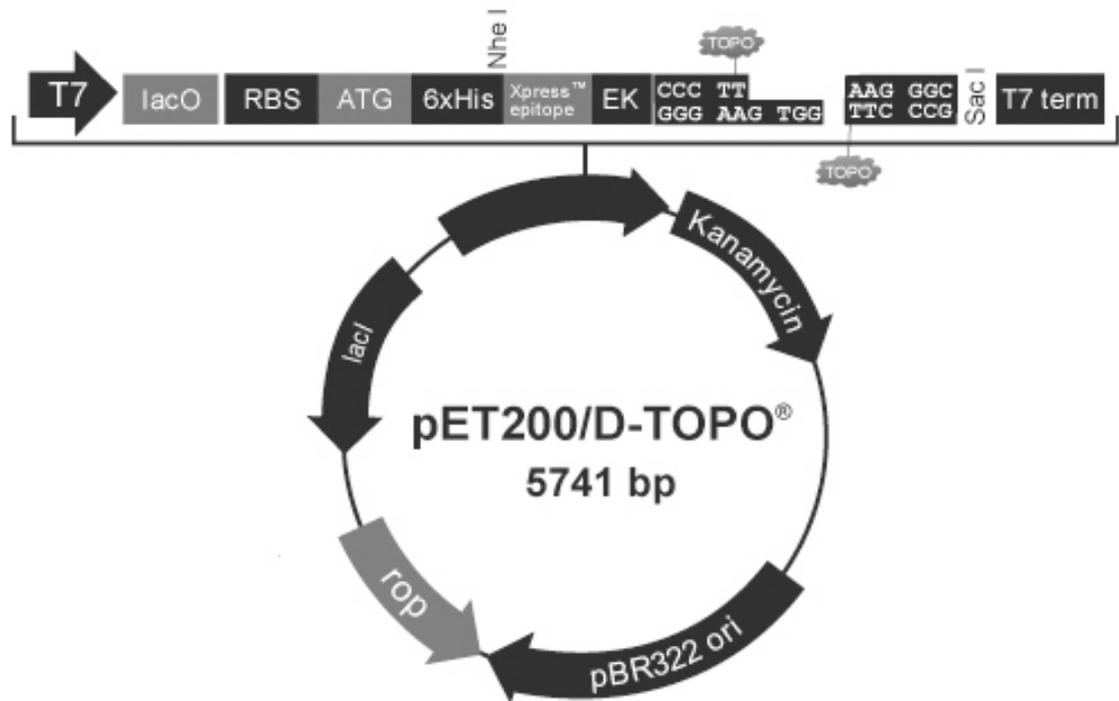
Prélever le surnageant (environ 200 µL), ajouter 15 µL d'acétate de sodium 3M et 200 µL (même volume que le surnageant) d'isopropanol. Incuber 1 h à -20°C. Centrifuger 20 min à 4°C à 12 000 g. Reprendre le protocole à l'étape 5.

Remarque : pour une conservation à long terme, laisser l'ARN dans l'éthanol à 70% et congeler à -80°C.

7) Peptide recombinant rpBdCCp2

CONSTRUCTION PLASMIDIQUE

Le vecteur utilisé est le pET200/Directional-TOPO (Invitrogen). Le peptide recombinant synthétisé comprend, du côté N-terminal, une étiquette poly-Histidine, un épitope antigénique X-press™, un site de clivage par l'entérokinase et le site d'insertion de la séquence d'intérêt.



Plan du vecteur d'expression pET200/Directional-TOPO (Invitrogen), avec zoom sur la zone d'insertion

SEQUENCE PROTEIQUE de rpBdCCp2 et spBdCCp2

MRGSHHHHHHGMASMTGGQOMGRDLYDDDDKDHPFTLPRKHDPQFNAERALDGNLQSYWASE
 WFTLDTIPEKVEFIVNLQEYYKVRKLEIDWEVPALVYNILVRKDDEEWTLIKRVRANTLSKT
 VDEM^{QNKVMRF}IKVELIRPNPEYVTQSGKIFYGIRSLAAYS^{NRLKTIVE}PCDQAKTSKDARD
 KYFLES^{IYEVDIHS}GEQLKTAEQAIETMVENMERKIAHIENLNGKMQQCKMKYINARKLAQE
 LERSFERVSN^{AVYGFEAKMELQE}KYKTEDQASSDCV

La portion soulignée correspond à la partie du peptide incluse par le fabricant dans le vecteur. La partie surlignée en gris correspond à la séquence de spBdCCp2 qui est incluse dans celle de rpBdCCp2.

Total : 284 acides aminés (dont 36 appartenant à la construction plasmidique)

Poids moléculaire : 33 kDa

8) Technique d'immunofluorescence sur lame

L'objectif de cette technique est de détecter des parasites par immunofluorescence à l'aide de sérums immuns, ou de tester un sérum pour savoir s'il reconnaît le parasite déposé sur la lame.

REACTIFS

Globules rouges parasités par *B. divergens*, provenant de gerbilles infectées ou de culture *in vitro*

PBS 1X

Acétone (Sigma)

Bleu Evans 1/100 (Mérieux)

Fluoprep (Mérieux) 75521

Sérums :

Anti-rpBdCCp2 (lapin) : diluer au 1/100 en PBS 1X

Anti-spBdCCp2 (cobaye) : diluer au 1/100 en PBS 1X

De bovins : diluer au 1/80 en PBS 1X, ou effectuer des dilutions sériées au 1/2 à partir du 1/80

Conjugués :

Anti-lapin : Fluorescein Anti-Rabbit IgG (H+L) affinity purified made in goat (Vector Laboratories)

Anti-cobaye : Anti-Guinea Pig IgG (whole molecule) FITC Conjugate (Sigma)

Anti-bovin : Anti-Bovine IgG (whole molecule) FITC antibody produced in rabbit (Sigma)

MODE OPERATOIRE

Déposer environ 20 µL par puits de l'antigène (globules rouges parasités, dilués au 1/100 en PBS 1X). Laisser sécher les lames à l'étuve à 37°C. Les lames ainsi préparées peuvent être stockées à long terme à -80°C.

Fixer les antigènes sur lame dans l'acétone, 20 s à température ambiante.

Déposer 20 µL par puits de sérum dilué et laisser incuber 30 min à 37°C en atmosphère humide. Laver 2 fois 5 min en PBS 1X, en position verticale. Sécher les lames à l'aide d'une pompe à vide.

Diluer le conjugué au 1/100 en PBS 1X contenant 1% de Bleu Evans. Déposer 20 µL par puits de conjugué dilué et laisser incuber 30 min à 37°C en atmosphère humide. Laver 2 fois 5 min en PBS 1X, en position verticale. Sécher les lames rapidement à l'air.

Monter les lames avec du Fluoprep et une lamelle.

Regarder les lames au microscope à Ultra-Violets (filtre d'excitation 490nm).

9) Production de gamétocytes de *P. berghei* chez la souris

Ce protocole décrit la manière de produire des gamétocytes de *P. berghei* (souche NK65) chez la souris (swiss OF1), selon la méthode décrite par Beetsma *et al.* (Beetsma *et al.*, 1998) et adaptée par Chris Janse, Jai Ramesar et Andy Waters.

Cette technique est basée sur l'élimination sélective des stades sanguins asexués par un médicament anti-paludique, la sulfadiazine, qui n'affecte pas les gamétocytes matures. Cette méthode produit des préparations relativement pure de gamétocytes matures.

REACTIFS

Phénylhydrazine à 25 mg/mL

Phénylhydrazine (Merck)	250 mg
NaCl 0,9%	qsp 10 mL

Globules rouges parasités par *P. berghei*

Prélever 15 µL de sang à la queue d'une souris infectée, présentant une parasitémie de 5 à 15%.

Diluer le sang parasité dans 0,2 mL de PBS 1X

Injecter cette suspension à une souris par voie intra-péritonéale.

MODE OPERATOIRE

J0. Injecter à une souris 0,1 mL de phénylhydrazine par voie intra-péritonéale. Ce traitement permet d'induire une hyper réticulose chez la souris.

J2. Infecter la souris avec environ 10^7 globules rouges parasités.

J5. Commencer le traitement de la souris avec de la sulfadiazine pour une période de 3 jours. La sulfadiazine est dissoute dans l'eau de boisson, à une concentration de 15 mg/L.

Ce traitement va tuer et éliminer les stades parasitaires asexués du sang, alors que les gamétocytes matures seront inaffectés.

J7. Vérifier le matin la présence de gamétocytes sur frottis sanguin (réalisé à la queue), coloré au MGG. Si la gamétocytémie est supérieure à 1%, procéder comme suit.

Prélever le sang de la souris par dans le sinus rétro-orbital. Puisque les gamétocytes ont une durée de vie limitée à 26-30h, il est important de les collecter le plus tôt possible.

10) IFI sur les gamétocytes de *P. berghei*

REACTIFS

Formaldéhyde (Sigma)

poly-L-lysine

Nonidet P 40 Substitute (Sigma)

PBS-NP40-lait 5 % (0,01% de NP40 et 5 % de lait écrémé en PBS 1X)

PBS-NP40-lait 1 % (0,01% de NP40 et 1 % de lait écrémé en PBS 1X)

Sérums :

Anti-rpBdCCp2 (lapin) dilué au 1/100 en PBS-NP40-lait 1 %

Anti-spBdCCp2 (cobaye) dilué au 1/100 en PBS-NP40-lait 1 %

Anti-Pfpdi (lapin) dilué au 1/250 en PBS-NP40-lait 1 %

Anti-Pfpdi (souris) dilué au 1/1000 en PBS-NP40-lait 1 %

Conjugués :

Anti-lapin (rouge) : Alexa Fluor® 568 goat ant-rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes)

Anti-souris (vert) : Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgM (µchain) (Molecular Probes)

Anti-cobaye (vert) : Anti-Guinea Pig IgG (whole molecule) FITC Conjugate (Sigma)

4', 6 Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma)

VECTASHIELD Mounting Medium reagent (Vector Laboratories)

MODE OPERATOIRE

Centrifuger le sang de la souris, puis laver les globules rouges parasités en PBS 1X.

Fixer les globules rouges une nuit dans du formaldéhyde (3,7 % en PBS 1X) à 4°C.

Laver les globules rouges en PBS 1X et les déposer sur des lames couvertes de poly-L-lysine, laisser sédimenter 15 min. Eliminer le surplus et laver délicatement en PBS 1X.

Perméabiliser les cellules avec du NP40 (0,5 % en PBS 1X), 15 min. Saturer la préparation avec du PBS-NP40-lait 5 %, 30 min.

Incuber le premier sérum anti-BdCCp2, 2 h. Laver trois fois 10 min en PBS 1X.

Incuber le deuxième sérum anti-PDI, 2 h. Laver trois fois 10 min en PBS 1X.

Incuber avec le conjugué (anticorps secondaire) approprié dilué au 1/100 en PBS-NP40-lait 1%, 2 h. Laver trois fois 10 min en PBS 1X.

Incuber 5 min avec le DAPI (5 mg/mL). Laver une fois en PBS 1X.

Monter les lames avec du liquide de montage.

Les lames ont été observées au microscope inversé Nikon Eclipse TE 300 DV, avec l'objectif à immersion (huile), monté sur un appareil piezo-électrique utilisant les filtres d'émission de fluorescence appropriés. L'acquisition d'images (série-z) a été réalisée avec un détecteur retro-éclairé (Photometrics CoolSnap HQ, 12 bit, RoperScientific, France) en utilisant un pas de 0,25 µm. Les images ont été traitées avec le logiciel Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Les images présentées correspondent à la projection du maximum d'intensité de la série-z.

11) Electrophorèse SDS-PAGE

Cette technique permet de séparer les protéines d'un échantillon selon leur masse moléculaire. Elle est réalisée ici en conditions dénaturantes.

REACTIFS

Marqueur de poids moléculaires : Precision Plus Proteins Standards Dual Color (Biorad)

Acrylamide/bis Acrylamide 40 % (Sigma)

TEMED (Sigma)

Persulfate d'ammonium 10 % (à préparer extemporanément)

Persulfate d'ammonium (Sigma)	50 mg
H ₂ OΔ	qsp 500 μL

SDS 10%

Lauryl sulfate (Sigma)	10 g
H ₂ OΔ	qsp 100 mL

Tris HCl 1,5M pH8,8

Trizma base (Sigma)	18,17 g
H ₂ OΔ	qsp 100 mL

Dissoudre dans 70 mL d'eau. Equilibrer le pH à 8,8 avec HCl. Ajuster à 100 mL.

Tris HCl 0,5M pH6,8

Trizma base (Sigma)	6,05 g
H ₂ OΔ	qsp 100 mL

Dissoudre dans 70 mL d'eau. Equilibrer le pH à 6,8 avec HCl. Ajuster à 100 mL.

Tampon d'électrophorèse (0,025M Tris, 0,192M glycine, 0,1% SDS pH 8,3)

TG-SDS powder (Amresco)	18,4 g
H ₂ OΔ	qsp 1 L

Tampon de Traitement

	2X	1X
Tris HCl 0,5M pH6,8	2,5 mL	1,25 mL
Glycerol (Cooper)	2 mL	1 mL
β-mercaptoéthanol (Sigma)	0,4 mL	0,2 mL
Bleu de bromophénol (Promega)	0,02 g	0,01 g
SDS (Sigma)	0,4 g	0,2 g
H ₂ OΔ		qsp 10 mL

Aliquoter et conserver à -20°C.

MODE OPERATOIRE

Préparation des gels de résolution à 12% d'acrylamide (pour 2 gels)

Mélanger les réactifs suivants, selon la dimension des gels.

	minigels 0,75mm	minigels 1,5mm	Lagon 0,75mm	Lagon 1,5mm
Tris HCl 1,5M	3,5 mL	7 mL	4,25 mL	8,5 mL
SDS 10%	140 μ L	280 μ L	170 μ L	340 μ L
Acrylamide 40%	4,2 mL	8,4 mL	5,1 mL	10,2 mL
H ₂ O Δ	6,12 mL	12,24 mL	7,43 mL	14,86 mL
Persulfate 10%	100 μ L	200 μ L	150 μ L	300 μ L
TEMED	10 μ L	20 μ L	15 μ L	30 μ L

Ajouter le persulfate d'ammonium 10% et le TEMED au dernier moment, juste avant de couler les gels.

Volumes pour 2 gels de résolution à 8% (séparation de grosses protéines).

	minigels 1,5	Lagon 1,5
Tris HCl 1,5M	7 mL	14 mL
SDS 10%	250 μ L	500 μ L
Acrylamide 40%	5,6 mL	11,2 mL
H ₂ O Δ	15,04 mL	30,08 mL
Persulfate 10%	200 μ L	300 μ L
TEMED	20 μ L	30 μ L

Nettoyer tous les éléments de la cuve de coulage avec de l'alcool-éther puis assembler 2 ensembles plaque de verre (cuve Lagon) ou plaque d'alumine (minicuve) / spacers / plaque de verre.

Couler les gels avec une pipette Pasteur le long d'un spacer en évitant toute bulle d'air.

Hauteur = 6 cm pour cuve Lagon

7,5 cm pour minigels

Couler à la surface des gels du butanol saturé en eau (1 mL pour la cuve Lagon, 500 μ L pour les minigels). Attendre 1 h de polymérisation.

Préparation et coulage des gels de dépôt 4% (pour 2 gels)

Mélanger les réactifs suivants, selon la dimension des gels.

	minigels 0,75mm	minigels 1,5mm	Lagon 0,75mm	Lagon 1,5mm
Tris HCl 0,5M	1,25 mL	2,5 mL	2 mL	4 mL
SDS 10%	50 μ L	100 μ L	80 μ L	160 μ L
Acrylamide 40%	0,5 mL	1 mL	0,8 mL	1,6 mL
H ₂ O Δ	3,15 mL	6,3 mL	5,1 mL	10,2 mL
Persulfate 10%	50 μ L	100 μ L	150 μ L	300 μ L
TEMED	5 μ L	10 μ L	15 μ L	30 μ L

Ajouter aux gels au dernier moment le persulfate d'ammonium 10% et le TEMED.

Rincer le front de gel à l'eau distillée. Enlever toute l'eau grâce à une seringue ou à du papier absorbant. Couler à la surface du gel de résolution et placer le peigne, maintenu par des pinces à dessin. Attendre une heure de polymérisation.

Préparation de l'échantillon

Pour chaque échantillon solide (culot), mélanger 1 volume d'échantillon, 1 de volume de tampon de traitement 1X. Faire chauffer 5 min à 100°C puis plonger dans de l'eau glacée.

Pour les échantillons liquides, mélanger 2 volumes de l'échantillon avec 1 volume de tampon de traitement 2X.

Migration

Monter la cuve d'électrophorèse. Placer les gels dans la cuve. Remplir la cuve de tampon d'électrophorèse. Déposer les échantillons dans les puits. Déposer 8 μL de marqueur de poids moléculaires dans un ou 2 puits de chaque gel.

Brancher le générateur à la cuve. Régler le générateur selon les indications suivantes :

Cuve Lagon : 2 gels 0,75 mm : 30 mA dans le gel de dépôt
40 mA dans le gel de résolution
2 gels 1,5 mm : 60 mA dans le gel de dépôt
80 mA dans le gel de résolution

Minigels : 150V dans le gel de concentration puis 200V dans le gel de séparation.

Faire migrer jusqu'à ce que le front de migration arrive en bas du gel.

12) Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose

Cette méthode permet de transférer les protéines (séparées par électrophorèse) sur une feuille de nitrocellulose.

REACTIFS

Tris 2M, pH 7,6

Trizma base (Sigma) : 121,1 g
H₂O Δ : 400 mL
Ajuster le pH à 7,6
H₂O Δ qsp 500 mL

NaCl 1,5M

NaCl (Sigma) 87,66 g
H₂O Δ : qsp 1 L

TBS

Tris 2M pH 7,6 : 25 mL
NaCl 1,5M 100 mL
H₂O Δ : qsp 1 L

Nitrocellulose 0,45 μm (Trans-blot Transfer medium, Biorad)

Papier Chromatographie 3MM (Whatman)

Tampon de transfert

TG powder (Amresco) 17,4 g
Méthanol 200 mL
SDS 10% 3,75 mL
H₂O Δ qsp 1 L

SDS 10% p/v

Lauryl sulfate (Sigma) 10 g
H₂O Δ qsp 100 mL

Filtrer sur 0,45 μm . Conserver à température ambiante

MODE OPERATOIRE

Couper des morceaux de nitrocellulose et de papier chromatographie :

Nitrocellulose : 14 cm x 7 cm (gel de la cuve Lagon) ou 8 cm x 8 cm (Minicuve Hoeffler)

Papier chromatographie : 10 morceaux de 14 cm x 7 cm ou de 8 cm x 8 cm

Mettre la nitrocellulose et le papier filtre à tremper dans le tampon de transfert. Démouler les gels et les faire tremper dans du tampon de transfert.

Disposer sur l'anode :

- 6 feuilles de papier chromatographie
- 1 feuille de nitrocellulose
- le gel (repérer le haut et le bas des gels, le front de migration et la migration des marqueurs sur la feuille de nitrocellulose en faisant des marques avec une aiguille et faire une encoche en haut à droite)
- 4 feuilles de papier chromatographie sur chaque gel
- la cathode.

Brancher la cuve de transfert sur le générateur et mettre à migrer 2 h à ampérage constant (0,8 mA/cm² de gel)

Rincer la feuille de nitrocellulose dans du TBS. Stocker au réfrigérateur dans du TBS pendant une semaine maxi ou à -20 °C entre 2 feuilles de papier chromatographie imbibées de TBS.

13) Immunorévélation

Cette technique permet de mettre en évidence les protéines reconnues par un sérum, transférées sur nitrocellulose après leur séparation par électrophorèse et déterminer leurs poids moléculaire.

REACTIFS

Sérum de lapin (anti-rpBdCCp2) ou de cobaye (spBdCCp2) et sérums non immuns correspondants

Conjugués :

Anti-Rabbit IgG (whole molecule), F(ab')₂ fragment_Alkaline Phosphatase antibody produced in goat (Sigma)

Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories)

BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma)

Lait écrémé en poudre (Régilait)

Tris 2M, pH 7,6

Trizma base (Sigma) : 121,1 g

H₂OΔ : 400 mL

Ajuster le pH à 7,6

H₂OΔ qsp 500 mL

NaCl 1,5M

NaCl (Sigma) : 87,66 g

H₂OΔ : qsp 1 L

TBS

Tris 2M pH 7,6 :	25 mL
NaCl 1,5M	100 mL
H ₂ OΔ :	qsp 1 L

TBS tween 0,1% (TBSt)

Tween 20 (Sigma)	1 mL
TBS	qsp 1 L

TBS tween Régilait 10 %

Régilait	5 g
TBSt	qsp 50 mL

TBS tween Régilait 5 %

TBS tween Régilait 10 %	30 mL
TBSt	30 mL

MODE OPERATOIRE

La manipulation se fait à température ambiante. Toutes les étapes se font sous agitation continue. Le protocole est indiqué pour une membrane de 8 x 8 cm, il faut adapter les volumes de réactifs en fonction de la taille de la membrane.

Découper une bande de 2,5 cm au niveau des marqueurs de poids moléculaire. Rincer la membrane dans du TBS.

Étape 1 = Saturation

Tremper la membrane dans 10 mL de Régilait 10% TBSt pendant 30 min. Rincer les bandelettes avec 20 mL de TBSt

Etape 2 : Sérums

Diluer les sérums au 1/100 en TBStr. Déposer 10 mL de sérum dilué sur la membrane et incuber 1 heure.

Rincer 1 fois et laver 3 fois pendant 5 min avec 20 mL de TBSt.

Étape 3 : Conjugué

Diluer le conjugué, couplé à l'alcaline-phosphatase, à la dilution voulue :

Anti-Lapin	1/10 000
Anti-Cobaye	1/5 000

Déposer 8 mL de conjugué dilué sur la membrane et incuber 30 min.

Rincer 1 fois et laver 2 fois pendant 5 min avec 20 mL de TBSt, puis 1 fois avec de l'eau distillée.

Étape 4 : Révélation

Déposer 10 mL de la solution NBT/BCIP. Incuber jusqu'à voir apparaître des bandes violettes nettes (5 à 10 min). Laver 3 fois avec 20 mL d'H₂OΔ.

Conserver la membrane en la séchant, à l'abri de la lumière.

14) Immunohistochimie

Cette méthode permet la localisation d'antigènes sur coupes de tissu inclus en paraffine par réaction immunochimique. La fixation de l'anticorps primaire spécifique est révélée par un système d'amplification : complexe Biotine-Streptavidine- Peroxydase.

REACTIFS

PBS

Méthylcyclohexane

Alcool à 100°

Alcool à 95°

Alcool à 80°

Substrat-Chromogène DAB (Diaminobenzidine) : ajouter 1 goutte (ou 20 µL) du Chromogène DAB pour 1ml de PBS.

Dako pen (Dako)

Trypsine en tablette 50 (Sigma)

Peroxyde d'hydrogène 3% (Gifrer)

Sérum normal de chèvre (Dako)

Anticorps secondaire couplé à la biotine : Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) ou Anti lapin Ig biotinylé / goat (Dako)

Streptavidine (Dako)

DAB plus liquide (Dako)

Hématoxyline de Gill II (surgipath) (Labonord)

Sérum de lapin (anti-rpBdCCp2) dilué au 1/100 ou de cobaye (spBdCCp2) dilué au 1/10 et sérums non immuns correspondants

MODE OPERATOIRE

Confectionner des coupes longitudinales de 4 µm d'épaisseur et les étaler sur lames "polysine". Les sécher à l'étuve, 12 h à 37°C.

Déparaffiner les coupes : 3 x 5 min dans le méthylcyclohexane ; 2 x 3 min dans l'alcool à 100° ; 2 x 3 min dans l'alcool à 95° ; 3 min dans l'alcool à 80°. Hydrater à l'eau distillée (3 bains). Repérer les prélèvements et les entourer avec un crayon Dako Pen.

Réaliser le démasquage enzymatique à la trypsine (1 mg/mL = 0,1%, soit 1 tablette /mL d'eau distillée), incubé 6 min à 37°C. Laver 3 x 5 min à l'eau distillée.

Réaliser un blocage des peroxydases endogènes, avec de l'eau oxygénée à 3% dans l'eau distillée. Incuber 10 min à température ambiante. Rincer à l'eau distillée (3 bains). Placer les coupes 5 min dans un bain de PBS.

Saturer les coupes, avec du sérum de chèvre (dilué à 2% en PBS), pendant 20 min à température ambiante.

Incuber avec l'anticorps primaire, 1 h à 37°C en chambre humide, dilué en PBS. Laver dans du PBS 3 x 5 min.

Incuber avec l'anticorps secondaire, 30 min à température ambiante, dilué en PBS. Laver dans du PBS 3 x 5 min.

Incuber avec la Streptavidine / PER, 30 min à température ambiante, dilué au 1/300 en PBS, en chambre humide. Laver dans du PBS 3 x 5 min.

Incuber avec le substrat chromogène, 5 min à température ambiante. Rincer dans 3 bains d'eau distillée. Contre colorer dans l'Hématoxyline de Gill II, 1 à 3 s. Laver à l'eau courante, 1 min. Déshydrater : 2 passages dans l'alcool à 95°, 3 passages dans l'alcool à 100°, 3 passages dans le méthylcyclohexane. Puis monter entre lame et lamelle, avec un milieu de montage permanent.

15) Article 2 : Natural transmission of zoonotic *Babesia* spp. by *Ixodes ricinus* ticks

Dispatch

BECKER Claire A.M.*†

BOUJU-ALBERT Agnès†*

JOUGLIN Maggy*†

CHAUVIN Alain†*

MALANDRIN Laurence*†

*Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1300 BioEpAR, Nantes, France

†Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, UMR 1300 BioEpAR, Nantes, France

Corresponding author : Dr Laurence Malandrin, INRA, UMR 1300 BioEpAR, ENVN, Atlanpole, La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France.

phone : +33 (0)2 40 68 78 57, fax : +33 (0)2 40 68 77 51, e-mail : malandrin@vet-nantes.fr

Emerging Infectious Diseases, 2009, 15, 320-322

Natural Transmission of Zoonotic *Babesia* spp. by *Ixodes ricinus* Ticks

Claire A.M. Becker, Agnès Bouju-Albert, Maggy Jouglin, Alain Chauvin, and Laurence Malandrin

To determine characteristics of natural transmission of *Babesia* sp. EU1 and *B. divergens* by adult *Ixodes ricinus* ticks, we examined tick salivary gland contents. We found that *I. ricinus* is a competent vector for EU1 and that their sporozoites directly invade erythrocytes. We conclude that EU1 is naturally transmitted by *I. ricinus*.

Ixodes ricinus is a ubiquitous triphasic tick found commonly in Europe. This arthropod feeds on a wide variety of vertebrate hosts, including small rodents and wild and domestic ungulates. It is therefore a potential vector of numerous pathogens, such as bacteria, viruses, and parasites, mainly apicomplexans. Among these pathogens, 2 zoonotic *Babesia* species have been described in Europe: the well-known cattle parasite *Babesia divergens* (1) and the more recently reported roe deer parasite *Babesia* sp. EU1 (2–4). Biological transmission of *B. divergens* by *I. ricinus* ticks has been proven by in vivo experimental infections (5); however, quantitative transmission studies that visualize and quantify sporozoites have never been conducted. For *Babesia* sp. EU1, biological evidence of natural transmission by *I. ricinus* ticks is still lacking; its presence has been assessed only by DNA amplification from whole ticks (4,6–8). Therefore, to analyze transmission of zoonotic *Babesia* spp. by *I. ricinus* ticks, we visualized, isolated, and identified infectious sporozoites from dissected tick salivary glands, the transmitting organs.

The Study

In 2008, ticks were collected from animals from 2 different biotopes where each *Babesia* species had been known

Author affiliations: Institut National de la Recherche Agronomique, Nantes, France (C.A.M. Becker, A. Bouju-Albert, M. Jouglin, A. Chauvin, L. Malandrin); and Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes (C.A.M. Becker, A. Bouju-Albert, M. Jouglin, A. Chauvin, L. Malandrin)

DOI: 10.3201/eid1502.081247

to circulate: a farm on which a herd was infected with *B. divergens* and a reserve on which wild fauna were infected with *Babesia* sp. EU1. A dairy farm in La Verrie (Vendée, France) was selected as a favorable biotope for *B. divergens* transmission on the basis not only of the presence of numerous ticks on cows and in pastures in 2007 but also of the parasite circulation in the herd, attested by serologic testing (prevalence of 37.5% by immunofluorescence antibody test [IFAT]) and confirmed by its isolation from cattle erythrocytes (prevalence 25% by culture) (9). Of the cows tested by IFAT, 56% had positive results, which indicated that new infections from ticks were occurring within the herd. Because we assumed that sporozoite differentiation is stimulated by blood ingestion and because of experimental proof that female ticks can transmit *B. divergens* (10), we collected only adult ticks feeding on cows. The 324 collected ticks were morphologically identified as *I. ricinus* and weighed to estimate their repletion status (range 3–398 mg). Of these, 223 ticks (4.7–339 mg) were dissected under a stereomicroscope to isolate both salivary glands, which were subsequently crushed in 30 μ L phosphate-buffered saline in a 1.5-mL microtube with an adapted pestle. A droplet of this suspension was deposited on an 18-well slide, stained with May-Grünwald-Giemsa, and examined under a light microscope. When parasites were seen, and for 41 additional negative samples within the same weight range, 5 μ L of the infected suspension was added to the culture medium with bovine (*B. divergens* selective growth) or sheep (both species growth) erythrocytes, RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium; Lonza, Basel, Switzerland), and 20% fetal calf serum (Lonza) in 96-well plates (11).

To identify the parasites, we directly sequenced the amplified 18S rDNA *Babesia* gene. PCR with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) was performed on extracted DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit; Promega, Madison, WI, USA) from the remaining crushed salivary gland suspensions (Bab primers GF2 and GR2, 540 bases long, variable part of the gene) (4) and from resulting parasitized erythrocytes (primers CryptoF and CryptoR, 1,727 bases long, complete gene) (12).

To confirm the identity of the infected ticks, we directly sequenced a variable part of the 16S rDNA mitochondrial gene of *Ixodes* ticks (310 bases long) (primers IrUp1 5'-TTGCTGTGGTATTTTGACTATAC-3' and IrDo2 5'-AATTATTACGCTGTTATCCCTGA-3'). We used DNA extracted from salivary glands.

Microscopic observation of crushed salivary gland suspensions identified small pear-shaped elements in only 3 ticks; weights were 11.7, 25.3, and 277 mg. These millions of pyriform parasites were considered to be sporozoites (13): they measured about 2 μ m in length and 1 μ m in diameter (Figure, panel A). Only a few parasites had unusual forms, which suggests binary fission (Figure, panel B).

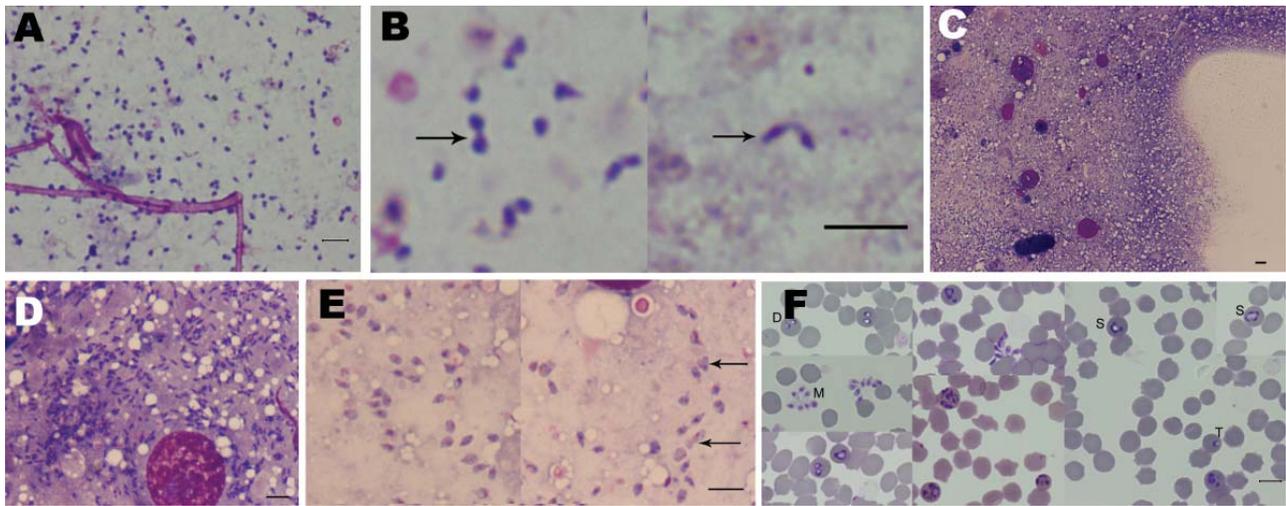


Figure. Microscopic appearance of *Babesia* sp. EU1 sporozoites isolated from tick salivary glands and of subsequent asexual development in erythrocytes. Sporozoites were stained with Giemsa and observed in the suspension of crushed salivary glands (A, B) and from salivary glands directly crushed between slides (C, D, E). Arrows indicate sporozoite dividing forms. A composite panel of asexual stages cultivated in sheep erythrocytes from these sporozoites is presented (F); developmental stages are indicated by letters (D, dividing stages; M, free merozoites; S, schizont-like form; T, trophozoite). Scale bars = 5 μ m.

Development of intraerythrocytic parasites was observed, which proved the parasites' capacity to directly infect erythrocytes. Of the 3 tick salivary glands containing pear-shaped elements, 3 days after inoculation onto a culture, $\approx 1/10,000$ erythrocytes was infected. Only sheep erythrocytes were invaded, which suggests infection with *Babesia* sp. EU1. From these 150- μ L starting wells, 10-mL amplified cultures (10% parasitized erythrocytes) could be established within 1 month (Figure, panel F). Typical *Babesiidae* developmental forms (trophozoite, dividing stages, and free merozoites) were observed, as were more atypical schizont-like parasites, which seemed to produce numerous merozoites. When sporozoites were not observed, parasites were never observed in the cultures of either bovine or sheep erythrocytes.

PCR amplification, sequencing, and comparison with *Babesia* spp. 18S rDNA genes (BLAST [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi] search in GenBank) showed the sequences to be 100% identical to the *Babesia* sp. EU1 sequence (AY046575) for the 3 infected ticks (sporozoites and culture). The partial (sporozoites) and complete (culture) 18S rDNA sequences obtained have been deposited in GenBank, accession nos. FJ215872 and FJ215873. Identity of the ticks was confirmed by sequence analysis and comparison with the 16S rDNA *I. ricinus* gene (U14154).

For the wild fauna reserve, we used the same approach. At the reserve of Chizé (Deux-Sèvres, France), where high prevalence *Babesia* sp. EU1 has been described (4), we captured 18 roe deer, then collected and analyzed blood samples from them. Presence of *Babesia* sp. EU1 was attested by culture of samples from 4 of the deer. For

31 female ticks, half of the ticks were processed as previously described, and the salivary glands of the other half were simply crushed between 2 slides so parasites could be better seen and quantified. With the latter method, a huge number of sporozoites, $\approx 10^7$ to 10^8 , were observed (Figure, panels C, D). The inner structures were well preserved, nuclei were clearly visible, and we could observe apparent dividing forms (Figure, panel E). From the ticks collected from roe deer, only 2 tick salivary glands contained parasites; PCR products using Bab primers showed 100% identity with *Babesia* sp. EU1 (AY046575).

Conclusions

Our study shows that *I. ricinus* ticks are competent vectors for *Babesia* sp. EU1. Not only can these ticks carry *Babesia* sp. EU1 DNA, but more importantly, they enable these parasites to complete their life cycle up to the production of infectious sporozoites. Direct invasion of erythrocytes by *Babesia* sp. EU1 undoubtedly classifies this species in the genus *Babesia*, a feature generally not proven for most *Babesia* spp.

The proportions of *Babesia* sp. EU1-infective ticks found in our study (3/223 from cattle farm and 2/31 from wild fauna reserve, not statistically different) are comparable to published prevalence of infected ticks (1%–2%) collected either from animals or vegetation (6–8,14,15). Whatever the biotope, *Babesia* sp. EU1 is always present, threatening also in anthropized zones (farming areas). Millions of parasites inside salivary glands were observed and could be injected to the vertebrate host, from the early stage of the tick feeding (11.7 mg) until repletion (277 mg),

which represents a massive infection. These 2 epidemiologic features, combined with the increasing number of immunocompromised persons, should lead to more awareness of the risk related to this zoonotic pathogen.

B. divergens sporozoites were never seen in the salivary glands of adult *I. ricinus* ticks, even when ticks were collected from cattle. This finding is despite the large number of ticks examined (223), the prevalence of nymphs carrying *B. divergens* DNA collected from the farm pastures (87% in 2007 on 113 nymphs analyzed, data not shown), and the infectious status of the herd (serologic prevalence 56%). We therefore raise questions about the main transmitting stage (larvae, nymph, or adult?) and about the quantitative transmission of *B. divergens* by *I. ricinus* ticks (low number of produced and infectious sporozoites?). In Europe, human babesiosis could be caused by these 2 *Babesia* spp., each of which is transmitted by *I. ricinus* ticks but probably with different sporozoite-production features.

Acknowledgments

We thank Bruno Guerin for kind permission to access his farm and cows, Albert Agoulon and Maxime Venisse for their help collecting ticks, Guy Van Laere and his group for technical assistance collecting roe deer samples, Nadine Brisseau for technical assistance, Hélène and C ecile Midrouillet for English corrections, and François Beaudeau for critical reading of the manuscript.

This study was supported by research funds from the Institut National de la Recherche Agronomique, the Région Pays de Loire, and the Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Mrs Becker is a veterinarian. She is pursuing a doctorate degree at the Institut National de la Recherche Agronomique, Département de Santé Animale. Her main research interests are apicomplexan pathogens, specifically with respect to their transmission and human and veterinary health importance.

References

- Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:622–36. DOI: 10.1128/CMR.16.4.622-636.2003
- Herwaldt BL, Caccio S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, et al. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:942–8.
- Haselbarth K, Tenter AM, Brade V, Krieger G, Hunfeld KP. First case of human babesiosis in Germany—clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2007;297:197–204. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.01.002
- Bonnet S, Jouglin M, L’Hostis M, Chauvin A. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1208–10.
- Joyner LP, Davies SF, Kendall SB. The experimental transmission of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus*. *Exp Parasitol*. 1963;14:367–73. DOI: 10.1016/0014-4894(63)90044-4
- Duh D, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. Molecular characterization of human pathogen *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks from Slovenia. *J Parasitol*. 2005;91:463–5. DOI: 10.1645/GE-394R
- Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*. 2006;13:65–70.
- Hilpertshauer H, Deplazes P, Schnyder M, Gern L, Mathis A. *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:6503–7. DOI: 10.1128/AEM.00823-06
- Malandrin L, L’Hostis M, Chauvin A. Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture. *Vet Res*. 2004;35:131–9. DOI: 10.1051/vetres:2003047
- Donnelly J, Peirce MA. Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol*. 1975;5:363–7. DOI: 10.1016/0020-7519(75)90085-5
- Chauvin A, Valentin A, Malandrin L, L’Hostis M. Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*. *Vet Res*. 2002;33:429–33. DOI: 10.1051/vetres:2002029
- Duh D, Petrovec M, Bidovec A, Avsic-Zupanc T. Cervids as *Babesia* hosts, Slovenia. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1121–3.
- Mehlhorn H, Shein E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv Parasitol*. 1984;23:37–103. DOI: 10.1016/S0065-308-X(08)60285-7
- Nijhof AM, Bodaan C, Postigo M, Nieuwenhuijs H, Opsteegh M, Franssen L, et al. Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007;7:585–95. DOI: 10.1089/vbz.2007.0130
- Schmid N, Deplazes P, Hoby S, Ryser-Degiorgis MP, Edelhofer R, Mathis A. *Babesia divergens*-like organisms from free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) and roe deer (*Capreolus c. capreolus*) are distinct from *B. divergens* of cattle origin—an epidemiological and molecular genetic investigation. *Vet Parasitol*. 2008;154:14–20. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.02.028

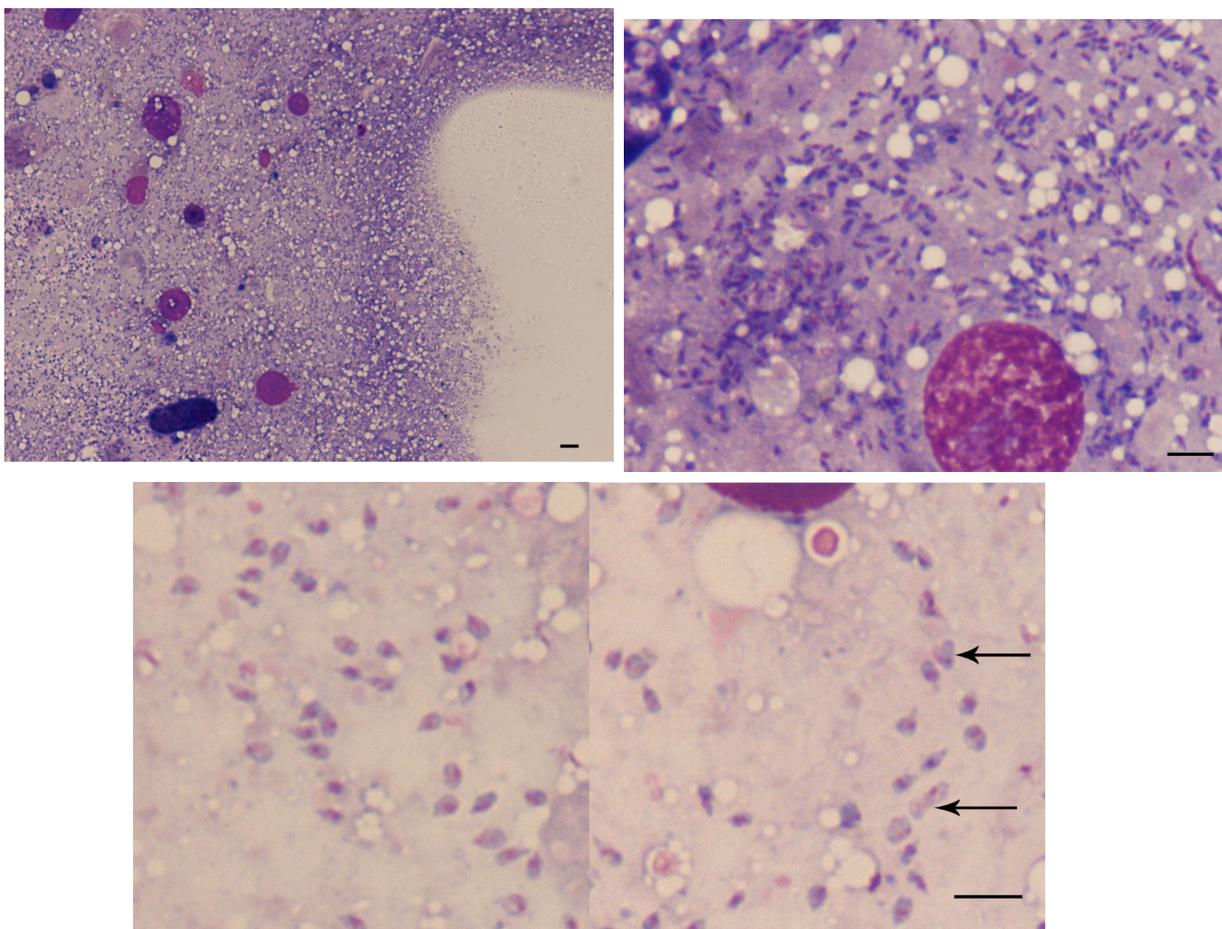
Address for correspondence: Laurence Malandrin, INRA, UMR 1300 BioEpAR, ENVN, Atlanpole, La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France; email: malandrin@vet-nantes.fr

Search past issues of EID at www.cdc.gov/eid

16) Matériel photographique complémentaire sur les sporozoïtes de *Babesia* sp. EU1 détectés dans des tiques récoltées sur des chevreuils de la réserve de Chizé

Grossissement de la Figure C, D & E de l'article 2 (Becker *et al.*, 2009)

Des femelles partiellement gorgées (31) ont été collectées sur les chevreuils (18) de la réserve de Chizé et analysées. La moitié des individus a été traitée comme celles collectées dans l'élevage de La Verrie (C2.IV.B). Pour l'autre moitié des tiques, les glandes salivaires ont été simplement écrasées entre deux lames et observées au microscope.



Glandes salivaires d'*I. ricinus* présentant des sporozoïtes de *Babesia* sp. EU1

Barre : 5 μ m. Les flèches indiquent des formes probables de division.

Une très grande quantité de sporozoïtes (10^7 à 10^8) a pu être observée *in situ*. Les structures intra-cellulaires des sporozoïtes ont été bien mieux conservées par cette méthode, les noyaux sont nettement distinguables et certains parasites semblent être en division (flèches).

P. yoelii KTHEIINDLLKNIDAIHGVDPSVISIIQDETVRVIEKAKKEFAPADILSKKQIDDTINLY
 P. berghei KTHEIINDLLKNIDAIHGVDSSVISIIQDETVRVIEKAKKEFAPADILSKKQIDDTINLY
 P. chabaudi KTHEIINDLLKNVDAIHGVDSSVISIIQDETVRVIEKAKKEFAPADILSKKQIDDTINLY
 P. falciparum NFHELISNLMENIDAIHGVDSSVISIVQEETIRIEKTKKELKPADMLSKKQIEDAMNLY
 B. bovis TTKEAAVKVLSDMNAMYGLDIKTVIN TIENIAAIVSRAKKYIKPLESVSMHQEKKMTTLY
 . :**:*:* .. : :* : * : * * .. **

P. yoelii NLTENLALYLYDLGSKYINDLEKVKERLEELKKIQRIVHNFVGFKLNYESMNFSSYFYVF
 P. berghei NLTENLALYLYDLGSKYINDLEKVKERLEELKKIQRIVHNFVGFKLNYESMNFSSYFYVF
 P. chabaudi NLTENLALYLYDLGSKYINDLEKVKERLEELKKVQRIVHNFVGFKLNYESMNFSSYFYIF
 P. falciparum NLTENLAIYLYDLSSKYIQDLEKLNKTLLEELKGAQKVAHNFVGFKLNYESMNFSTHFSLF
 B. bovis DRLESALQKATYKESSESQKSNYQRLLEHQAKG--VESEAPLVMDYTTMAFSRTFKIH
 : * . * . . : : . * * : . . . : : * * * * * : .

P. yoelii DSKLIKNKPSVWGYVDTEILGHKNSIGQMSSISNREIGEGYFAKLKGLNFYDFEIRVSVL
 P. berghei DSKLIKNKPSVWGYVDTEILGHKNSIGQMSSISNREIGEGYFAKLKGLTFYDFEIRVSVL
 P. chabaudi DSKLIKNKPSVWGYVDTEILGHKNSIGQMSSISNREIGEGYFAKLKGLNFYDFEIKVSVL
 P. falciparum DSNLIKKNESVWGYSDTNILGHENSIGQMNSVSSQIEGEGYAKLKGLNFYDFDFNISVL
 B. bovis DTSM TSGGQSRWGYSDSPFDGHMSYIVQSSDIDSSLLGEGAYAMLKDRRYFDITVDLL
 * : : . . * * * * : : * * . * * : * * * * * : * * * : : * *

P. yoelii SKGTGCAGIAFRAKDDFNFYLFDICDQDGVRRLSKIENGHADILKEKYG-EFSINNKWST
 P. berghei SKGSGCAGIAG-AKDDFKFYLFDICDQDGVRRLSKIENGHADILKEKYG-EFSINNKWST
 P. chabaudi SKGTGCAGIAFRAKDDFNFYLFDICDQDGVRRLSKIENGHADILKEKYG-DFSINNKWST
 P. falciparum SRGTGCLGVVFRKDDFNFYLFDICDKDGTKRRLSKVENGVHILKVVNSDVTLNQNWNK
 B. bovis AKNEGSGVIAFRSQGHFNYYLLLLNSRQSNKQLLKVQEGVTHVLATNPD-DGYKKNTWIK
 : : . * * . : : . * * : * * : : . . . : * * * * * . . : * * .

P. yoelii YKITTSHANIDIYEIDDKLNEMKILSSLEKFLSGTVGLYSQINGQGTFFDGLI IAKPC
 P. berghei YKITTSHANIDIYEIDDKLNEMKILSSLEKFLSGTVGLYSQINGQGTFFDGLI IAKPC
 P. chabaudi YKITTSHANIDIYEIDDKLNEMKILSSLEKFLSGTVGLYSQINGQGTFFDELE IAKPC
 P. falciparum YKIITKHANIDIYEVDKDNMILSSLEKFLSGTVGLYSQIYGLGTFDFDLEVIAPC
 B. bovis VNISATGN-----LIEVTC DGKRILKVLDT SFLHGGVGLYSCGNSG SFYDFNFTVTPKPI
 : * : . : : : * * . * * * * * . . : * * : : . *

P. yoelii SELSKNGKHEKKQYNPCPYKENYDNDLFPYTIIN----DVEYKWFANEDDSDYLFCKK
 P. berghei SELSKNGKHEKKQYNPCPYKENYDSDLFPYTIIN----DVEYKWSFAKEDDNDYLLCCK
 P. chabaudi SELSKSGKHEKKNFNCPYKENYDSDLFPYTIIN----DVEYKWSFAKEDDNDYLLCCK
 P. falciparum TQSELN TLNKNVKSNC PYKENYLNLM SYDI IYNP--NNYFNWNVEKENEQNYLLCSK
 B. bovis LMESPEVRLGRLKAVKCSYNETYTGDFSDAYKVVNP SHAHTTSWRFKDIIGGKHKAIHQ
 * : : * * . * * . : : : : * . . . : : :

P. yoelii IENIDNESNENYKSDKLYDTIALLKQKCSDGILNFDNMNYSLSKENKNLDRNKPHIYILF
 P. berghei IENIDNESNGNYKNGKLYDTIALLKQKCYDILNFDNMNYSLSKENKNLDRNKPHIYILF
 P. chabaudi IENG-----TVYDTIALLKQKCSDGILNFDNMNYSLSKENENLDKNNQHIYILF
 P. falciparum NEEE----VKNAKDEKDIYTVLLKLECTDGT FNFDIQVSDDETG-NISKKLSYIYILF
 B. bovis YHIS-----QDPRGIGSLAILNNDRTCTAGF IGFRFLP-----MCEGGSIGAVV
 . : * * * * * : : : : * : .

P. yoelii NFNENNFNALEIRQDSLKLT SYKDSKTVTLSEFNDHDKITK-----TLEQDEWFHVN
 P. berghei NFNENNFNSLEIRQDSLKLT SYKDSKSTLSEFSDHEKITK-----TLEQDEWLHVS
 P. chabaudi NFNENNFNALEIRQDSLKLT SYKDSKPI TLSEFNDHDKITK-----ILEQDEWFHVN
 P. falciparum HYKDENNFNALEMKDGKLAFLTNKNGKSFILSERNEEENDNKNIEKRFTFVQNEWIHVN
 B. bovis RFANVQNMILIEMTASELSIRLIQPGGSKVLGTVPASAYAISKWNAMQVGISSDRISVKVK
 . : : * * : * * . * * : : . . * . : : * * .

P. yoelii VKFDKLFKAVVSNNNGYEIELDANNIDTDSIDLGNVGFVNNFDEVKFDSITLSS-NVL
 P. berghei VKFDKLFKAVVSNNNGYEIELDANNIDTDLIDLGNVGFVNNFDEVKFDSITLSS-NVL
 P. chabaudi VKFDKLFKVVISSNN-----
 P. falciparum LHFDKSTFKVIIITNNNEDKFVLS-AKSRNDVPLGKVGFLVHNFDEVKFDSILLNSPTIT
 B. bovis KNVDHGSLFSGFLGNTDYECKAELEEYSGLGLGIGLKSAGCDSCYFDQFHVSPPEESTSSF
 : * : : : * .

P. yoelii NSNESFIESKTK-TWGTCEKSIHFIN-----
P. berghei NSNESFIESTTK-TWGTCEESIHLVLRNRSSCETDMHPNQKKEKHINCIKNFCCEECCLHHT
P. chabaudi -----
P. falciparum KVDENFLQVKS-KTWANCEDSVHVLHRRFSCETDIYPNETKEKHIKCIKNFCCECCLYHT
B. bovis TPSMFLQOYSSVNIWRPCAESVHVLNRIALCKQMF---NRGEASACAESFCFPCCSYHT

P. yoelii -----KCVSLEENKDYENCDDNDLNCRSKTC
P. berghei KMLDSNERKQCEKHCKRNDGLAEKMQKLFKFINKCVSLEENKDYENCDDNDLNCRSKTC
P. chabaudi -----
P. falciparum QLLDSNEKNECEKHCKQNDNLAAKMQTLFEKFINRCVSLNENEDYETCDKNDKKCKNKVC
B. bovis RLLGEVHREACMTTCQKNHHVSNLYLEKFLSYVNSCVSLEG--PAFKHCEGDRQCLKRAC

P. yoelii ILCCEQNDVVDSDIEEISFHKSKDIQKEETIECQFQCKITHGITE
P. berghei ILCCEKNGVIDSDIEEVSFHKSMDIQKEETIECQFQCKVTHGITE
P. chabaudi -----
P. falciparum VLCCCKHDPPTSSELKVLPMNQFKKIQENEIECQLQCNMIHSI--
B. bovis SLCCSSGHDEKGP-----LDKALVALETSSCLMQCNTLV----

CCp2

P. falciparum -----
P. yoelii -----
B. bovis MVAIKTVFAASIVAAKAVRAIRYLEVPKDNAGNDRDVTPEPESQKHTSGNIKDLETHHEDV

P. falciparum -----MTKLEFFINYAFVLIIFSFLNLFVKCG
P. yoelii -----
B. bovis RNIPGSQKKQGLQVPGAETSDDTTTKVQNEPSSDGTTPVNTGTDTSNSTLENSVKETNAG

P. falciparum DDISNTFFKFEFCEATSTFSSIGENGLPQYAAENALTRGSGYWCSEKHNVDVSWIGH
P. yoelii -----
B. bovis INRKTLYGAIANADSTFKALGSAGYRKYDATNAITKSGGYWCSEPNVLPDAVVSWTGE

P. falciparum LKNVRSNLGIIHWAYTPGEVSILASYDGNPEYEEVVPYQLLESRVGNVQNIIFNHVIR
P. yoelii -----MASYDGNDSYEEVVPYQAIESRAGNI IQNIIFNHVIR
B. bovis LRGPRVLTGVSIFWVYAPQYVAVLAKRSREDEFEEVAPFQTVDP--SEMTSVIQFKRKVD
*: . . :: :***.*:* :: . .:: . * *:: :

P. falciparum AKSIKVNMRHAIHDYFGINF'NVLGSRDPTLRIQSGMSSLTQDLCLQIDEKNEVVLGDCI
P. yoelii AKSIKINMRHPVHEYFGINFVNLGSRDPTLRIQGGMSSLTQDLCLQINETNNVVLGGCI
B. bovis AQFVKIAMKGQINTYFGIDFVQFHGEPNPIFTIQAGIT-SIEDLCLQADETNDVVLDSICI
: :: * : : :****:*..* . * : * : * : * : : : * : * : * : * : *

P. falciparum TAISYLDGRDLWKLNSKNQIYNP'INNLCITLKDNL'IANGGRLILEDCNASLEHNDGRSSW
P. yoelii NSMSYLDGRDLWKLNSN'QIYNP'INNLCMSLKNMIANGGELIMEDCNSSLEHNDGRSSW
B. bovis SAIASFKYNDIWAYNEKRQLYNPVSRLCMTLDYMVDTSEAI'VVMRDCRK-----DGINSW
.: : : . : . * : * * . . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Zone 1

P. falciparum QLLPNNQLKILRNGNFCLSQDGHKSGSIDVAFHKECTSTLSSD-NKNHSPDKVVDGLLDT
P. yoelii QLLPNNQLKILRDGNFCLTQDGSKSGSIDIALHKQATSSLSRK-DQKYSPEKAIDGNLDT
B. bovis DILPNNQIKVRMPGNL'CVSQAGSSAGLANVALNKIATSSI'PMKNDKSHNAESA'VDGNLQS
: : *

P. falciparum FWWSQEFNLDTAPDSVHFDVNLGSIYKLQKAIIDWKYPATKYSISLSNDGENYKEVSSNL
P. yoelii FWLSEPFDIETIPDAVYFDINLGSKYKLEKSIYWKYPATKYSIFLSNDGENYKEISSNL
B. bovis YWASESFTADSIPDKVEFIVNLQEQYKIRKLEIEWEAPALTYNIYTKLET-DWILVEKIH
* : * : * : : * * * * : * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

P. falciparum TVLKTNKPIYELPKPDIIINDDFTSSGTIGFYTYGIDNVQF'TNITVESVECSTKEILSYN
P. yoelii SIIKTNKPLYDIPNPDIVVNDDFNSAGTIGFYTYGIDSVEFAKSVVESVECLTKENYVKN
B. bovis AVIQGLEPVFDIPNNSIDVIDCTHTSGSVGIFSGQINLVHFVAKLHTETLPLCLRYDKPPPP
: : : : * : : : * : * : * : : * : * : * : * : * : * :

P. falciparum --ISPISCNIYEEYVVGKFNKSYIPFDSSENSNGSSNWKFAKNIGNEKHVILQNSNMKQI
P. yoelii KNNIPLICNIYEEFYVVGKFNKSYLSFDEANENKELSNWNYANNIGNEKRVILYTSDIYGK
B. bovis --PKPPICSLYRETYATGITNWRIVANGGQ-----WNFEENVGGEPKVMAHRQHQTVD
* * : * : * * . : * : : * : * * : * : . .

P. falciparum E-----NEEQIPSFIIILQNKSCQ'TGVLNFSVYPECSN-GIVGTMFKFLDSKNYTIL
P. yoelii RKQKEGYSYQNNDSPSSYIILQKKICSAGVFNFSVYPQCKNNGTVGAIKFLDPNNYTIL
B. bovis N-----NPEPSMALLKGRSCKAGVFR'TAMFPQCDPTGAMGLLVHFIDGGNYVSF
. : . . : : : * : * : * . : : : * : * * : * : * * . :

P. falciparum EIGSGFTRLRQNVNGKFQLLSKSIISGYKEHIWNRVTVSFSNNINVLG-TGFMTYPIF
P. yoelii DIGPNFTRLRQNINGNFHILGESIVSGYKENNWNIIITISFSSTNVNVNMG-NGLTTYPIF
B. bovis ECTGRQCAIQMHKGMKNL'LATTELAKIITGQWNFAEVVFRKDAV'TASIGTLEPEAIFIN
: : * : * : * . : : * * : * . : . . : * : *

P. falciparum SLIGLHLSDGESVGF'TSYNCSNVFSFNIYMHPPDFKPYTPPTLDTESFLPPIFSKFDQA
P. yoelii SLIGLDL'FKGEQIGLASYN'NVFSFNIYIHPDFKPYSP'PTPSVGI'ESMVP-IFSKIRQD
B. bovis TAIIEEVELGGTVGLYSMGCAGCAFAEIGL'KPNYAGSTQPN-----
: * . : * : * : * . * : * : * : * . * .

P. falciparum TIKEEDQSQDMGYKQIGDNKNSD-----ISKDSPIDKHSFEDS-----TRQMKKDA
P. yoelii TIHSEVLENDKSLDYNMDNHN'RDELEQAEENSNTKHTEIEKHSFHLNQDKIDNENKQNDI
B. bovis -----VQQKN
: : .

P. falciparum YYCATHKNIVDIINYCNQYDKENDNCTNEFCTICCNIDTKE-EEDIRTCEILCQKLDLDDK
P. yoelii YYCATHKDIVSREAF'CNQNIEDSNCTN'NFCKSCCDNIQ'GEMNEEDTNTCIQ'CEKLDQ'T
B. bovis ATEEQCLAVDRLEHCKSIAPSKIAACEADYCAMCCEQH'HIDAPTAQD-ICYQRCRGQDHL
: . : * : * : * : * : * : * . * .

P. falciparum ILQ'TSEVLN'YLK'KSCIESPNEELK'KSCEDDNDKEECLIE'CMCCQSVTIPD'LLTSHMD
P. yoelii VLETSEILN'FLK'KSCIESSNEELK'KACEHDDIDQCVTDMC'QMCCQSIIPEN'LLTSNIK
B. bovis AVLLQ'TTADTYWRQCAQKLD'S-----QNNTQNAEAITDCEL'CESTRIIQ'GV'PNSVNR
: . : : * : . . . : : : * : * : * * : * : . *

P. falciparum IDSLTNHCISL'CDKP
P. yoelii LNPLINQ'CISECE--
B. bovis AAKTR--CKTLCNT-
* : * :

P. BERGHEI FSHHLCSDIAGENLCGHDKERINATNFRCKGDEANLKNCPHETSEDIYCSHEEDIIIGCA
P. YOELII FSQHLCNDIAGENLCGHDTERINATNFRCKGDEPNLKNCPHETSEDIYCSHEEDIIIGCA
P. FALCIPARUM FSHHSCDTDISGENLCGPDTEKINAVNIKCKGDEKLLRNCPHETHDDIYCSHDEDVIVGCV
B. BOVIS MVGHDCSDVHGVNLCAPLTSKISAVDFRCTGLERALGQCPHESTDDIYCTHEQDVLILCS
: * * . * : * * * . . . : * . * . : : * . * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * . *

P. BERGHEI SAEEEGNDSANSTNISKYGLNKHMSMEKKKFHPKIELSCFDXISSKAELSKGNVGDIFL
P. YOELII SADEEGNNSISSTNNYKYGLNKHMSMEKKKFHPKIELSCFDKITSKAELSKGNVGDIFL
P. FALCIPARUM GGDNNSHGEEQNK-----KHLINLEKKKFHPKIELTCFDKMLSKSNLSVATTGDVFL
B. BOVIS GNGDPSEFRNKRR-----VEPYSPEMKKLPRTLNLTCYDTLSSHAELQMKHG-EFAI
. : * ** : . : * : * : * : * : * : . . :

P. BERGHEI VSCPEKCEDDIGVIKGTFFVYTFDSYICKAGIHAGVLSSTVDDMILIIITHSRNKFIGTKR
P. YOELII VSCPEKCEDDIGAIKGTFFVYTFDSYICKAAIHAGVLSSTVDDVVLIIITHSRNKFIGTKR
P. FALCIPARUM ASCPEKCEDEEVGIVKGTFLYTYDSPICKSAIHSGVLPNNAIEDIVLSIAHATHNFIGTKR
B. BOVIS AMCPGCKGDPSSSLKGTIYIYTEDSSICKAAIHVGVIDDNGGE-IVVIRAITOPTFYGSVM
. ** . * . : . : * * * : * * * * * : * * * * : . . : : : : : * * :

P. BERGHEI NNIESKEFNGESKSFSLSIPTNYIIMEERQNNISKYEDEILKEDNDFYEHIFKQNNNEQ
P. YOELII NNIESKEFIGESKSFSLSIPTNYIIMEERQNNISKYEDEILKEDNDFYEHIFKKNNEQ
P. FALCIPARUM NNIESHDFKGTSKSFTISIPMSLLREERKSNPKSEDEMINKNE-----IDLTYDHSV
B. BOVIS NGVTSLGAKHIVSEFEAGAFVSRATHRIMAMQLKPS-----RDSATPY
* . : * . . *

P. BERGHEI EKNKTFEHNHLEPTFQWLAPSSFAGFNGDENQYINANNLPNEKYIRTLNFTFIHFII
P. YOELII EKNKTFEHSMHLEPTFQWIAPSSFAGFNGDENQYINANNLPNEKYIRTLNFTFIHFII
P. FALCIPARUM FNNKLDHHTSSMKPTFQWIAPTFGVFNGKENDYIDCTNLPNEKYIRSLNFTFIVYFT
B. BOVIS DLKPIITSSDATPTPPKVRWFPELWKGFGNSALDFVSLANFPNAEKMKTLRDFTFVQMN
: * . . : * . . . : * * * . : : . * : * : * : * : * : * : * : * : *

P. BERGHEI PNSKGNKWRITILSHSLCEGISISIDEENELVIEQNCNPHLVKTKFIPKFEHPCHLVLIY
P. YOELII PNNKGNKWRITILSHSLCEGISISIDEENELIEQNCNPHLVKTKFIPKFEHPYHLVLIY
P. FALCIPARUM LNG-GEPTWRTILSHSLCEGISISINEDNELIEQNCNPHLLKSKFKPKFGQTYHISLVF
B. BOVIS PTE-LSGKWTIFSFQCGGLTCAIDNTGEVIEENCRPELFTSYFPKIGRRTNLTIYV
. . . * ** : * . . * * : : * : : . : * * * * * . * . * . : * : : : * : :

P. BERGHEI NKPNKSISLYINQKKINLEKMFDFTLNGDLTIGRSNKQATDYFIGDINFVKIYKYILTE
P. YOELII NKSNSISLYMNQKKINLENTKMFDFTLNGDLTIGRSNKQATDYFIGDINFVKIYKYILTE
P. FALCIPARUM NKINKTLYLYINGKKVITEKNTYNFTLSGDLIIGRSNQTTKDYFIGNIHLVEIYKYTLSE
B. BOVIS YSLTRDLGFFADGNLIASRNTDFNFNLQGDLLGKSAETDSDFVQILSVEVFDYLMSP
. . . : : : : : . : : * . * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

P. BERGHEI QEIKESYDSVLSNNYLNDGMSGNRDIN--TKKTQNKKTKNNRKTIDGRDCITPCKSKTNV
P. YOELII HEIKESYNSVISNNYLNDGMSGNRDIN--IKKTQNKKTKNNRKTIDGRDCITPCKSKTNV
P. FALCIPARUM QEIKESLNSLSLEYLNMNILEQMSNTKKDKKNQKNKGVQKTIDGRDCVTPCKSKNMI
B. BOVIS -----NOVQHNRMLQSIENRIYS-----RHSSTRMTVEGNLCLSKCVKMRSP
: . : : : . . . : * : * . * : * : *

P. BERGHEI NKNVQIN----TEEFYLNCSNLLSERFNGKIGAQFLVSCLEDCTNSKYIVKGSNNYYTP
P. YOELII NKNIQIN----TEEFYLNCSNLLSERFNGKIGAQFLASLEDCTNSKYIVKGSNNYYTP
P. FALCIPARUM NKDLQIN----TQQINLKCQDNLSEQFNGKIGSQFLVSCIENCTKSKYFIKGTNNYYTP
B. BOVIS GRESVLHNGPTNPAIHLCGHDLEDERFNGATGDQFLVSCSRCTDPLLLTKGSK-VYTS
. : : : . : * * * * * : * * * * * . * * . . : * : * : * * . *

Zone 2

P. BERGHEI DTSICKAVMHSGIMHKTRNTHKSNEHDEDNNTNNSFIKIVEGLTEYKSSRGHYGIVS
P. YOELII DTSICKAVMHSGIIHKTRNGHKNDEND-----NNNSFIKIVEGLTEYKSSRGHFGIVS
P. FALCIPARUM DSSICKAAIHAGIYKPNMG-----NKNNTFVIRIVEGLLEYKSSRGHFGILS
B. BOVIS DSSICKAAIHAGAIP-----HEGGEAIVTIMHGKESYDYCMGHYDRDC
* : * * * * . : * : * . . * . . * * : . .

P. BERGHEI KPEKQSQLRSFSLFSKKEDDIFTCFT-----DAAFLELPIGTTKNIICPENCHKIDKQI
P. YOELII KSEKQSQLRSFSLFSKMEDDIFTCFT-----DAAFLELPIGTTKNVICPENCHKIDKQI
P. FALCIPARUM KSEKQSQLRSFVLSENEENIFTCST-----DGQFILNLSVGEKRTINCPSNCNIIKDKI
B. BOVIS KYKVEPSRDAIILSIPRSKGFNMYGYWYIHAENAHWYPYVAKVSSWLPGTASYDSVWY
* : :.. :: : ... : * .. .

P. BERGHEI FGTNTYSPLSSVCKAAIHAGVISTKGGQIQIVVGKGQEFKSSTQNNIQSYIAEKQNRSF
P. YOELII FGTNTYSPLSSVCKAAIHAGVISIKGGHIQIVVGKGQEFKSSTQNNIQSYIAEKQNRSF
P. FALCIPARUM YGTNIYSPTSVLCKAAIHSGALSNQGGLEIIVGTGQEEFKGSTQNNVESFSSNNHSRSI
B. BOVIS SLKGIYNPISSVCQAAIHSGHLGELGGEVEIEILGSQDSFNGSTAHTSLESQYLKSF
.. *. * * :*:****:* :. ** ::* : .*:.*:.* * : : :*:

P. BERGHEI TFLKRL-----
P. YOELII TFLKHKFRGGSGKFKKGNNNNQVHKGNMWKGSNGGRGGDGGGRGGRGGGGRRGGGG
P. FALCIPARUM TFNKHMEL-----
B. BOVIS RILQGTAAATS-----
: :

P. BERGHEI -----
P. YOELII GGRGGGRRGGGGRRGGGGRRGGGNKDKGFKKGKVIIVPHRFPGVYLLKKGSDILVTKNL
P. FALCIPARUM -----
B. BOVIS -----

P. BERGHEI -----
P. YOELII VPGESVYGEKRYEVMTDDEKTEYRVWNPFRSKLGACLMGGVGNMPIKPGSKVLYLGAANG
P. FALCIPARUM -----
B. BOVIS -----

P. BERGHEI -----
P. YOELII TSVSHVSDMVGDEGIVYAVEFSHRSGRDLTNMAKKRLNIVPIVEDARQPIKYRMLVDMVD
P. FALCIPARUM -----
B. BOVIS -----

P. BERGHEI -----
P. YOELII VVFADVAQPDQARIVAMNAHMFLKTGGWFVISIKANCVDSTAKPEVVFASEMEKLLKESC
P. FALCIPARUM -----
B. BOVIS -----

P. BERGHEI -----
P. YOELII KPKEKLTLEPYHRNHAIIVLGMYS
P. FALCIPARUM -----
B. BOVIS -----

ZONE 2

Alignement des séquences protéiques de toutes les espèces étudiées

P. YOELII	TAGISYDDGSFKFFNLETSDISAIVCSTNSSENDNFSMQYLSIECDTTALD
P. BERGHEI	TAGISYDDGSFKFFNLETSDISAIVCSTNSSENDNFSMQYLSIECDTTALD
P. CHABAUDI	TAGISYDDGSFKFFNLETSDISAIVCSTNSSENDNFSMQYLSIDCDTTALD
P. FALCIPARUM	TAGISYDDGSFKFFNLETSDISAIVCSTNSTENDSALQYLSINCETTGM
B. BOVIS	AAGLSLATGEIEVFDLETANI AAIVCSTNVTEDN-VTPIPIKCDDRIDKN
B. BIGEMINA	AAGLSLETGEVEKFDLEANVEAIVCSTNITDDN-VVPIDIKCDDRIDKT
	::* *..: *:*:*: : ***** : : :
P. YOELII	DDFNGIVNTNIVALCPLGCDNERFKFENVYGSNGVYSDSSSICRASIHAGVI
P. BERGHEI	DDFNGIINTNIVALCPLGCDHEKFKFENVYGSNGVYSDSSSICRASIHAGVI
P. CHABAUDI	DDFNGIVNTNIVALCPLGCDHERFKFHFVYGSNGVYSDSSSICRASIHAGVI
P. FALCIPARUM	DSFHSIVNTNIVLCLGCDDEKYHDASIYGRGTYSDNSSICRAAIHSDII
B. BOVIS	EKLVGNNTNIVVSCSEHCADK--TELPVYGTGDVYSDRSSICRAAIHAGVI
B. BIGEMINA	EALVANTNTNIVVRCSEHCAER--KELPVYGVYSDVYSERSSICRAAIHAGVI
	: : . ***** . * . * . . : : ** * . * : ***** : * : * *

Alignement des séquences nucléotidiques de toutes les espèces étudiées

P. YOELII	GCAATAGTTTGTTCACAAATTCGTCGGAAAAATGATTTTTCAATGCAATA
P. CHABAUDI	GCAATAGTTTGTTCACAAATTCATCGGAAAAATGATTTTTCAATGCAATA
P. BERGHEI	GCAATAGTTTGTTCACAAATTCGTCGGAAAAATGATTTTTCAATGCAATA
P. FALCIPARUM	GCTATTGTATGTTCTACCAA TTCGACAGAGAATGATTCGCATTACAATA
B. BIGEMINA	GCTATTGTGTGCTCAACCAAC ATCACGGACGACAAC---GTGGTGCCGAT
B. BOVIS	GCTATAGTATGCTCCACCAAT GTACCAGGACAAT---GTAACGCCCAT

Pf/Bbi GCTATTGTRTGYTCWACCAA
Bbi/Bbo GCTATWGTBTGCTCMACCAA

P. YOELII	TTTAAGTATAGAGTGTGATACCACAGCATTAGACGATGATTTTTAATGGAA
P. CHABAUDI	TTTAAGTATAGATTGTGATACCACAGCATTAGATGATGATTTTTAATGGAA
P. BERGHEI	TTTAAGTATAGAGTGTGATACCACAGCATTAGACGACGATTTTTAATGGAA
P. FALCIPARUM	TTTGAGCATTAATTGTGAAACGACCGGTATGGAAGATTCATTTTCATTCAA
B. BIGEMINA	CGACATCAAGTGTGATGACAGGATCGACAAAACCGAGGCTTTGGTGGCAA
B. BOVIS	TCCATTAAGTGCAGACAGAAATGATAAAAACGAGAACTAGTTGGTA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *

P. YOELII	TTGTAATAACAAATATAGTAGCTTTATGCCCTTTAGGATGTGATAATGAG
P. CHABAUDI	TTGTAATAACAAATATAGTAGCTTTATGTCCCTTTAGGATGTGATCATGAG
P. BERGHEI	TTATAAATAACAAATATAGTAGCTTTATGCCCTTTAGGATGTGATCATGAG
P. FALCIPARUM	TTGTTAATAACAAATATAGTTGTGTTATGTCCATTAGGTTGTGATGAA
B. BIGEMINA	ACACCAACACCAACATCGTTGTGAGGTGTTCCGAGCACTGCGCCGAAAGG
B. BOVIS	ACACCAACACGAATATAGTGGTATCATGCTCGGAGCACTGTGCTGATAAG
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

P. YOELII	AGATTTAAGGAATTTAATGTATATGGTAGCAATGGAGTCTATTCTGATAG
P. CHABAUDI	AGATTTAAGGAATTTTCATGTATATGGTAGCAATGGGGTATATTCTGATAG
P. BERGHEI	AAATTTAAGGAATTTAATGTATATGGTAGCAATGGGGTATATTCTGATAG
P. FALCIPARUM	AAATATCATGATGCTTCAATATATGGAAGTAGAGGTACATATTACAGATAA
B. BIGEMINA	AAA-----GAGTTGCCGGTGTACGGAGTTGATGGAGTGTACAGCGAACG
B. BOVIS	ACG-----GAACTACCGGTTTATGGTACCGATGGTGTATATAGTGATCG
	* * * * * * * * * * * * * * * *

P. YOELII	TAGCTCTATTTGTAGAGCATCTATACATGCAGGTGTAATA
P. CHABAUDI	TAGCTCTATTTGTAGAGCATCTATACATGCAGGTGTAATA
P. BERGHEI	TAGCTCTATTTGTAGAGCATCTATACATGCAGGCGTAATA
P. FALCIPARUM	TAGTTCATATGTAGGGCTGCCATACATTTCTGATATTTATA
B. BIGEMINA	GAGCTCAATATGCAGGGCCGCAATCCACGCCGAGTCATC
B. BOVIS	AAGCTCAATATGTAGAGCTGCTATTCATGCTGGTGTATC
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

P. YOELII TTATGTTCAAACAGGAAAAGATATAGAAGCAGGTACTACTGGAATTATAG
P. BERGHEI TTATGTTCAAACAGGAAAAGATATAGAATCAGGTACTACTGGAATTATAG
P. CHABAUDI TTATGTTCAAACAGGAAAAGATATAGAAGCAGGTACTACTGGAATTATAG
P. FALCIPARUM TTATGTACAAACAGGTAAAGATATTTGAAGCAGCTACAACAGGTACTATTG
B. BIGEMINA CAGCATCCAGACCGGCAGCTACAAGGACTCGGGCACTTCCGGCCGCATAT
B. BOVIS CAGTATACAGACGGGGAGCCACAAAGGTTTCAGGAACCTTCCGGGAAGGTAT
* * * * *

P. YOELII ATATAATATTATTAGGTAATAATAACAAAAAGTAATACAAAAATGTTA
P. BERGHEI ATATAATATTATTAGGTAATAATAACAAAAAGTAATACAAAAATGTTA
P. CHABAUDI ATATAATATTACTAGGTAATAACAACAAAAAGTAATACAAAAATGCTA
P. FALCIPARUM AAATTATTTTATTAGGTAATAAT---AAACGAAGTAATACTAAAGTATTA
B. BIGEMINA CGCTGATGTTGATCGGCC-CGCTG--GGTAAAAGCAACACGAAGTCCCTG
B. BOVIS CTGTAATGCTTCTGGGTC-CCTTA--GGCAAGAGTAATACTAAAATCCTT
* * * * *

P. YOELII CATGAAGGGTTCATATCTGGTGGATTAAAAAAAATAAAATTTCCAAGCATC
P. BERGHEI CATGAAGGGTTCATATCTGGGGGATTAAAAAAAATAAAATTTCCAAGCATC
P. CHABAUDI CATGAAGGATTTACATCTGGCGGATTAAAAAAAATAAAATTTCCAAGCATC
P. FALCIPARUM CATGAAGGATTTAGTGTCTGGAGGTTTAAAAAAAATAAAATTTCCAAGCATC
B. BIGEMINA GGAACCTAATTTCTACGCGGGGTCGTACTTGACGTTCTGTTGTAAGGCCGC
B. BOVIS GGTACCAATTTCTATAGTGGTCTTATTTAACCTTTGTTGTTGAAGCTGC
* * * * *

P. YOELII AGATGTAGGAAATTTGGAAAATATAATATTAATAAACAATTTCTTATAA
P. BERGHEI AGATGTAGGAAATTTGGAAAATATAATATTAATAAACAATTTCTTATAA
P. CHABAUDI AGATGTAGGAAATTTAGAAAATATAATATTAATAAACAATTTCTTATAA
P. FALCIPARUM TGATGTAGGGGAATTAGAAGATATTTATTTAATTAACAATTTCTTTAAA
B. BIGEMINA GGATGTCGGCGACGTGACCGCGTGCTGCTGTCGAATTCGGCAACGTC
B. BOVIS TGACGTTGGAGATGTCAATGGTATCTTGCTGTTCAACTCTGCCGAGTC
* * * * *

P. YOELII TGATCCATGGTATTGTGATTTTATT
P. BERGHEI TGATCCATGGTATTGTGATTTTGT
P. CHABAUDI TGATCCATGGTATTGTGATTTTGT
P. FALCIPARUM **TGATCCTTGGTATTGTGATTTTGT**
B. BIGEMINA **CGACCCGTGGTACTGCGAGGACAT**
B. BOVIS **TGACCCTTGGTACTGTGAAGACGTT**
* * * * *

Pf/Bbi **YGAYCCKTGGTAYTGYG**
Bbi/Bbo **YGACCCKTGGTACTGYG**

ZONE 2

Alignement des séquences protéiques de toutes les espèces étudiées

P. YOELII TNVNKNIQIN----TEEFYLNCSNLLSERFNGKIGAQFLASCLEDCTNS
P. BERGHEI TNVNKNVQIN----TEEFYLNCSNLLSERFNGKIGAQFLVSCLEDCTNS
P. FALCIPARUM NMINKDLQIN----TQQINLKCQDNLSEQFNGKIGSQFLVSCIENCTKS
B. BIGEMINA RSPAHDSARHGSPTNPAIHLACHNTLEDERFNGATGNEFLVSCSRSDTP
B. BOVIS RSPGRESVLHNGPTNPAIHL**LGCHDTLEDERFNGATGDQFLVSCSRSDTP**
:: : . : * * : * . * : * * * * * : * * . * * . * . * . *

P. YOELII KYIVKGSNNYYTPDTSICKAVMHSGIIHKTRNGHKNDEND-----NNNNS
P. BERGHEI KYIVKGSNNYYTPDTSICKAVMHSGIMHKTRNTHKSNEHDEDNNKTNNNS
P. FALCIPARUM KYFIKGTNNYYTPDSSICKAAIHAGIYKPNMG-----NKNNT
B. BIGEMINA LLVLKGSK-VYTPDSSICKAAVHSGAIP-----LEGGE
B. BOVIS **LLTLKGSK-VYTS**DSSICKAAIHAGI**IP**-----HEGGE
: * * : : * * . * : * * * * . * : * * * * : * * * * . * * *

Alignement des séquences nucléotidiques de toutes les espèces étudiées

P. YOELII	CTGAATTGTTTCAGATAAATTTACTCAGCGAGCGATTTAATGGAAAAATTGG
P. BERGHEI	CTGAATTGTTTCAGATAAATTTACTCAGCGAGCGATTTAATGGAAAAATTGG
P. FALCIPARUM	TTAAAATGTCAAGATAAATTTACTTTCTGAACAATTTAATGGAAAAATAGG
B. BIGEMINA	CTGGCTTGCCACAACACGCTCGAAGACGAGCGCTTCAACGGCGCCACTGG
B. BOVIS	TTGGGATGCCATGACACGTTAGAAAGACGAGCGTTTTAACGGTGCCACTGG
	* ** * * * ** * ** * * * **
P. YOELII	AGCTCAATTTTTGGCTAGCTGTTTAGAAGATTGTACTAATTCAAAATATA
P. BERGHEI	AGCTCAGTTTTTTGGTTAGTTGTTTAGAAGATTGTACTAATTCAAAATATA
P. FALCIPARUM	ATCTCAGTTTTTTAGTTAGTTGCATAGAAAATGTACAAAATCAAAATATT
B. BIGEMINA	CAACGAGTTCCCTGGTGAGCTGCAGCCGGAGCTGCACCTGACCCCTGCTCG
B. BOVIS	TGACCAGTTTTCTTGTGAGCTGCAGTCGCAGTGCACGGACCCATTATTGA
	* * * * * * * * * ** * * * *
P. YOELII	TAGTAAAAGGATCTAACAATTATTATACACCAGATACATCTATATGTAAAGC
P. BERGHEI	TAGTAAAAGGATCTAACAATTACTATACACCAGATACGTCTATATGTAAAGC
P. FALCIPARUM	TTATTAAAGGAACCAATAATTATTATACCCCTGATTCATCAATATGTAAAGC
B. BIGEMINA	TGCTGAAGGG---CAGCAAGGCTACACCCCGACTCGTCTGCAAGGC
B. BOVIS	CATTAAAGGG---TAGTAAGGCTACACATCAGATTCGTCTATATGCAAGGC
	* * * * * ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * *
Pf/Bbi	GAYTCRTRATMTGYAAGGC
Bbi/Bbo	GAYTCGTCKATMTGCAAGGC
P. YOELII	AGTTATGCATTCAGGAATA
P. BERGHEI	AGTTATGCATTCAGGAATA
P. FALCIPARUM	AGCAATACATGCAGGAATA
B. BIGEMINA	CGCAGTCCACTCGGGCGCC
B. BOVIS	TGCAATTCATGCTGGAGCC
	* * * * * * *

19) Séquences des gènes *bdccp1, 2 & 3*

Les séquences complètes de *bdccp1* & *2* ainsi que la séquence partielle de *bdccp3* sont présentées ici au format Fasta. Les Start et les Stop identifiés pour chaque gène sont en gras et les introns surlignés en gris.

```
>BdCCp1
CAGGCTATTGATGCCTTATATTTGCAAGCCTGGTTCATGTTGTGTGTGCTCGAAAACGCCAA
TGAATTCATACCTTCAAGGACGCAACGGCAACGTCACACATATGTCACACATACGAACGA
CGATCAAAAGTTTGGAGCGGCGAGAGCCTTCCAAATGGTGCATCTTATTTGGTGCAGTGC
GGTTCATCACCCTCTACAGACTTCGGTAGGCCATTAGACACAGTAGCTCATGATGTCG
AAGTCCGTGGACAGGGGAGCTATGGGACCTTGCAAAGGTATCGCAGATTGAAGTTTTCT
GGGAATATGCTCCAAAGTCCGTTAAAGCGCTAGAGTTCGCACATTTGTCATACAGGAGG
TTGAAATCTCAATGTCAATCACAGATGACAGCTTCAATGTCGTTATGCCCTTCCGAGAAA
CCTTTGAGAGCAAACGTAAGGCAGTTTTGCAACGCTCACATTCATATTCAGCTGCATATA
ATGAAGTGTTCAGCTAGATTCCCAGTTGAAGCTAAATTCATCAGATTGACACTCCGAG
GATCCATTAACGAATACTTCGGCATCCGCGAAAATACACATTGTCGGAGCTGGAAACCTT
TATTCGTTATCAAATCCGGTATTTCCAGTCTGCAGGTGAAATGTGCTACAACCTTGAGG
AGGGTCGTAAGGAAAATAACACAGCTGTGATACTTGACCTATGCACTCACGCCATAGCTG
CAGCAGATGGAAGGTAAGACTTTGGTCATGCGATCAAGAGAAAATCATCTTGTAGGATCT
TTGGAGACATGATTCTAGGCAAAGAATATTAGTGCAATCACATATCCGCCAAAATGCCT
AACCTCTGTCAGTCCTCCAAATGTAAGTAGTGAAATGCTGGAAATTCACGATGTTTTAG
TTGGCGCATTTGGTAATCGCTGACTGTGAAGATGAGAGCGATGATGTATGCCGATGGGAAT
TCATGGGCAACTCACAGATCTCTCTCAAAAATGCAACCGAAAATGTGTATCACACAGCTCG
ATATTTACTCCGACAAAGCTGGAAATGGGCAACCTGCTGCAGATCATGAAAACCAACGTAA
AGCTATCTGCATCAAGCACAACTGATAAAACACAACGTTGAATTGATTATGGACGGAAAATG
TCAAGACATACTGGGCTTCAGAACTTTTCCTCGATTCCAATATCCATAGTGTCAACATCA
CCATAGACTTCGGTATGGATAGCAAATAGTTGCATGCTTTTATGTGTTTTAGGTCAAGTG
ACACGTGCTGCAAGAGTGAGAATCGATTGGGAGTACCAGCCTATGACTTATACCATAGAA
GGAAGCACCGATAACATTTGTATTCCAAGGAGCTAGCTCGAAATATGTCAAACCTTGACCAC
GTCACGATAGATTCGTCAACGATAAGGAATTCCAAGCAACTCAAAAATCGTCTTATTAAGA
CCACATCACTCAATGGGGAAGGTACAGGGAGGATTTGTGTATGGCATCAGGGAGATGGAA
GTTCTCACCAGTAATTTGCAAACCTGTGGTTGGCGACTGTAGAGCCGCTGCGAACAGCGCC
GATGCAAGGGATAAGTACTTTGTATCATACGTCTCTTCATTCCAACCACAATTAGCTCAC
GAAATCAAGACCATGGAAGACGATATACATGGCATAACTGGTGAAATCATGGATGAAATG
GCGAAAACTACGGAAACGGTCGACGATACTGACAGTTGTATGCAGGATAAGAAGGAATAT
AGCAAACATTTGAACAAATCCAGAAAAAGGAGGTCGGTATATGGAACAAATACAGATT
TCATCACATTTGTGATAAGTCAACGCGCACCCAGCAGCATGTATTCCACAATCGGGAGACC
GTAAACAACGCAGCCGAGGATTTGTTACGTCATTAAACACGTGCTTAAAAATGCCACATCA
GGATTCTACTGGATACAACCAAAATGTTCAAAAACACCAATACGGGCTTATTTGTGACATG
AGATCTCAAACATCCATGTATATATGGAATGGAAAGGATAGTTCAACATCACCTCAGTCT
CTTGCAAGTATGAAATCACCTTAGCTATCAGGTATCAGTGTGCGGCATATGGACTTGAA
CCCTTAATTATCAAGTCCAAACACCAAATCGATGGGCTCAAGGAGGCATTTGTACCTCATG
GGTTTCGAACGAAAGGTGGATCATTTCGTGCCCTTGCATACAAGTTTGGAAAGTTCTAAC
AAGTTCAGAGATCTCATGAACATATTTCTCCTTCATGACTGACTCGTCATTGGCGCCGGGG
GAGACGGAGACCGACGCACAAGGCACAGGTGTGGATATGAAAAGGCTCATATAGTCGAT
CATAATGCAGCCGGCTATCACTGGCAACAGGGGAAATCGAGAAGTTTGATCTCGAGTCG
GCTAAATTTGAAGTATTTGCCTGCTCGACCAACATAACCGAGGATAACATCGTGCCAATA
GAGCTCAAATGTGATGACAGACTTGATAAGACCGAAAGTCTTGCGTCTAATATCAACACT
AATATTTGTTGTCAGATGTTGTAAGACTGCTCAGAGAAACAACACCTCCCCGTCTACGGC
ATTGAAGGACTTTACAGCGAACGCAGCTCCATATGTAGGGCAGCCATACATGCAGGAGTG
ATTTCAGCAAGGGGAACATTCACGGTTGCCGTGGAAAGTGGACTCCCGTTCTACAATGGT
AGTAAGGAAAACGGTATCCAGAGCTTCGCGTACAACAAGGCATGGCAGGGTTCGAAGGAC
ATTCTCGATTCAGAAATGCCAGATTCGGAAAATGTAGTTGATCACAGTGGCCCTCCTACC
AAGTACAGCATTAGAATACTGCCACTGGAACGTACATGCCAATAGTGGAGACCCACGGA
TCATTTTTGCAGGTACCCCAAAATGCAGCGCGAAGCACAAAACATGAAATGGAAAATAAA
GATTCGGACAAAATTGATACAAAACAATCTAAAAAGATAGTCCAACACCCGAATGTAAG
GGGAATTTGTAATGATGAACCAGAGCTTGGCATCGCTAATCTTGACCCTACCACGAAGGTA
GAAGCGCTCAAAGTATTAGGTTATATGAATGCCCTATACGGTTTTGATCCGAAAACAGTT
GCCAACACTGTGAAAAATATCGCTGCTGTTGTTAGTCGTGCTAGGAAAATATATCAAGCCC
CTAGAAGCCATAACTCATCACCAAGAAAAATCACTAACGACATTTGTAGTTTTCTCAACAT
```

CATTTGTAACCATTTAACAGGTTTCGATCGCGTTGAAGTAGCTCTACAAAAGGCGGCGCAT
CTCAAAGAGACTGTGGAGTCGCATAAGGTTAACTACCAGAGGCTGCTCCACGAGCAACAG
GCCAAGGGGGTTGAACTATCGCGCCAATACACTTAGATTATACAAAAATGGCATTCTCC
AAAACCTTCAAGGTGTATGATACTAGCATGACTTCAGGAGGGCCAAGCCATTGGGGGTAT
GCAGACTCGCCCTTCGAGGGGCACGACAGCTATATGGTACAAAAGTAGCAATGTAGACAGC
TCGCTGCTAGGAGAAGGTTTCATTCGCTATGCTGAAAAACCACACATATGTCGATTTCCAG
CTCGAAGTGGACTTGTGGCGAAAAATGACGGCTCGATTGGTGTTCCTTCCGCGTCCAG
GATAACTTCAACTTTTTACCTATTTACCATGAACTCACGACACAGCAATAAGCAGCTGCTC
AAAGTACAGGACGGAATATTACATGTTCTTGCAACAAAATCCTGATGAAGGCTATCAAAAAG
AACAACTGGACCCATATACAAGTGTCTGCAATGCATCATTCATCAACATATCGTGCGAC
GGTAAAGCAATACTCAGGTTAGTTCATGCGTTATAGTATATCAATGACCTACAGCATTCT
AGACACATCGTTTGTGCATGGAGGAGTTGGACTCTATTCATGTGGAAGTAATGGGGAGTT
CTATTTTGCAGAAATTCACAGTTACCCCAAAGGCTACGGCAATGCCAGATCATGAAGGCCA
CATGGCACGTTTGAACTCGCTAAAGTGTGTACATACAATGAGACTTTCGCGGGAGATTT
CAGCGGCGCATTACAGTTATCAATCCTCACCACGCACATAACACCCGCTGGCGTTTCAA
GGATGTTCTGGGTGGGAAGCACAAAGCCATTCATCAGCACCGGTCATCGCAGGATACGCT
AGACATGGGATCAATAGCAATATTAAGAAGCGATAGGATGTGTTTCATCAGGGTATCTAAG
GTTTCAGATTTTTGCCGAGTGCAGGGGCGGTGTAATAGGTGCTGTGATTCGCTACGCTGA
TCATGACAAATATGATTTCTCGTGAAATCAGCGGAAAGAGCTTCGATCAGGCGTATAAA
GGGTGGTAGTGGTACTGTGTTGGCAACTGTTCCAGCCTCTTTCGCATTATCAAAGTGGAA
TGTCATGGAAGTTACGATGGGACCCCAAAGCGTCTCGGTCAAAGTGAACAACAATGTGGA
GCACGGATCGTTCTCGCTAGCCTATTTAAGGCTGCTGATTATGAATGCAAGGCAGATAT
CACTGACGACAAAACGCTGGGATTCACCTGGGGCTCAAGTCCAGTGCCTGCGACTCTTG
CTACTTTGACACATTCAGGTATCACCAGACCCAAATTCAGACCGTTGTACCAGCGACTAA
TTTCGTCGAAGAGTTCTCCAGTGCCTATGTAAGCCATGCGTGAAAACGTCATAT
ATTAAGCAGAGTGGCATTATGCAAGCAGATGTATCGTAATAAAGGAAACTCGCACGCTG
TGCAGAAAAGTTTCTGTACCCCTTGTGCGCCTATCACACTGTGCTGCTGGGAGACGGGCA
TCAGCAAATGTGTGTCGACGCATGCCAGAAAAACAACCACCGTGTGAACGCTTACCTAGA
GAATTTCTGTCGTACGTCACAGCTGTGTGTCGCTAAAGGGGTGGGATACGATCACTG
TGATGGGGTAAGTATGGCGCCAAATAGCTTGTTCATAATGCTGTAGGATCGAGGATGTCT
GAAAGACGCATGCAGACTTTGCTGCACCAGTGGGCACCAGGAGAACAGCCTGCTTGACAA
GCAACTTGTGCTTTTTGGAACGTCGAGCTGCGTAAATCAGTGCAACAACCTTCTGTAG

>BdCCp2

CTGCTGATGGAAAGCTAATGCCGCACCTTCTAAAAGAGGAGACATGCAATGGAAAGTCATAC
GCCTGTTGTCTGTGGCAGCTCTACTGATAAACATCCACGCTGTAGACTCCATCAAGTTCC
TGGAGGCGCCAAAGGGTTAGTTGTACAATCTGGTTCGGCGCAATATGTATAGACAATGCGA
CAAAGTCTGATGTGGCAAAGAATCCGCCGCAACTGGGCAGGAGACGCCAAGTGTGGAGT
CAAAGAAGCCTGATGTTAGGGTTACGCCGCGCATGAGATAAACAACCGCGCCAAACGGA
CGCTTTTTTGGCGCCGTCACGTACTGTCAGATTCACCTTACAAAATCGTGAGTTATTCCGT
CAAACGCTTACATATGAACAGACTGAGTACTAGTGGTGCCCGCAAGTATGACGCGCAGAA
CGCCGTCACACGAGGAGGAGGCTACTGGTGACGCGAGGCCAACATTTATGCCGGACCGTGA
AATTTCTGTTGACTGCCGAGCTGAGAGGGGCTCGAGTGTAACTGGAATCACTATAGTATG
GGTTTATGCACCACAAATGGGTAAGTTATTCGATCCTTTCTTTATAATGATGTAGTGTCC
GTCCTGCTAAAAGACAGCGTAATGACAAGTTCGAGGAAGTTCGCCATATCAGGCCGTG
GATGCCGGAGAAGCGACACAAAGCATAACTTTCAAGCGAAAAATAGATGCACAGTTCCGT
AAGGTAACCATGAAGGGCAGGTCAACGGATATTTTGGTATTGAGTTTCGTCAGTTCCAG
GGAGAACCCAAACCAGTTTTCCGCATTCAGGCTGGAATCACGCTTATCGATGACATGTGC
CTACAAGTAGATGATAGCGGTGAGGTTGTCTCGAATCGTGCATTTCCGGCCATTGCGAGC
TTCAGATTCATGATATCTGGAGATAACAACGAAAAACGCCAAATATACAATCCGACAACA
AACCTATGTATGACGCTGAAAAATGATGTAGCCACGGACGGAGGAAGAATAGTTATGCTT
CCATGCGATAAGGATTCAGGAAAGGAATAAACTCCTGGGATGTAATGCCAAACAACCAA
ATCAAAC TGAGACGACCAGGCAACTTGTGCCCTCTCACAGGCAGGAAGCCGTGCAGGACTT
GCCAACGTGGCACTCAATAAGATTGCATTTGAGCAACCTACCACGGAAAGCACGACCCCTCAG
TTCAACGCAGAGCGCGCACTAGACGGGAACCTACAGTCTTACTGGGCAAGCGAATGGTTC
ACCTAGACACCATTCAGAAAAGGTCGAGTTTATAGTAAACCTACAGGAATACTACAAA
GTTTCGCAAACTAGAAAATCGATTGGGAAGTACCCGCGCTGGTCTACAAATATTCTGGTACGC
AAAGACGATGAGGAATGGACGCTTATCAAAAAGGTCAGGGCCAACACCCCTCAGCAAGACC
GTAGATGAAAATGCAGAAATAAGGTCATGCGATTCATAAAAAGTAGAACTCATACGCCCGAAT
CCAGAATATGTGTAAGTAACCTCACGTTTTCGCGACGCTTTCATGGAAAAATGTAGGACTCAAT
CTGGAAAAATATTTTTATGGCATAACGAAGCTTAGCCGCTTACAGCAACAGACTCAAAAACA
TAGTGGAAACCTTGTGATCAAGCAAAAACATCAAAAAGACGCCAGGATAAGTACTTTCTAG

AATCCATATATGAAGTTGACATCCACAGCGGAGAACAGCTTAAAACTGCCGAACAAGCGA
TTGAAACTATGGTGGAAAATATGGAACGCAAAATTCACATATGAAAACTAAACGGAA
AGATGCAGCAATGTAAAATGAAGTATATCAACGCCCGAAAACTAGCACAGGAACTAGAAC
GATCCTTCGAGCGAGTTTCAAACGCAGTCTACGGATTCGAAGCCAAATTTGAACTACAAG
AAAAGTACAAGACAGAAGATCAGGCGTCGTGAGATTGTGTGGAAATCAAAAATCGCGGGG
AAAACAACCCCTACCGGATTTACTCCATACTCCCACCTTGTGCACAACGTCAATTACGGG
TATACGTGACATGTACACAGGGGCATCATACTACCTGGCAGGTTAGTTCATGCATCCGA
GACATAGCGTCACTGGAATATGCAGAAGTTGAAAGTGACGCATAAAGTCTGCCAGACGTG
TACGCCATATGCCGCAGGCACGGCTCGAACCCCTCCAACCTGCAACACAACCTCACAAAT
GAGGCACTCAAGATAATGCTGAAGACTATGGACATGCCGGCAGATAACCTATATCCAATT
GCTGTCAAAGTGGGGCAAAGTTCAAGTCGCTGGACCTGGAGAAGGATGTGACATGGGCA
CTGGATTATAAGACAGATGCCGAAAAAATATTTGTAGCGATCTCTACTGAGGGGACGCAA
TATATAGACGGAAGAAAGACAGACTTTAGCGGAATTTGTTTGTCAACCAACTATTTCGAGT
CTCAGGCTACCACCAAAGGTAATTAACCTTGGTTGTCAATCCCTCTAAAAGAACACGCA
ACCCCTAACGATGCAGCAATTTGGGACGGTACTACAAGTGTCTGTGCCAAAAGAACTGCATG
CATAACTGTAGGTGGACTTTGTGGATACAATCATAGTTTCGTGTAGATGATGAAGCAACG
GACGTAGAAGGCGGAAACAATGGGCTCTATACACTGAAAACGCCCATATGCATAGCAGCC
GTACATGCCGGCGAATATAGCAAAAACGTGACTTTAGACGTGCAAAAAGGACGCGGCGCA
GTGGAATTCGAAGGCTTCTTTCAAAATGGCATACAAAGCACCAGTGTTCGGCAGTGTG
GGGGACCTGGCGTTCAAAGTTACACGTAGAAAAGACGAATGCAGCCCGAAGAAGGTTGAA
CCTCTAGTACAGAAGGATGCGGAAACTAAGGAAAAACAGCACACTAGCGTCAATATCCAA
CAATTCAAAACGGATAGCAATCATGGGATCAGGATGTTCAAACAAAAGCCTAACACTTGAC
CCAGCTACGGGGGAGGCAATCGGGGAACCTTGTCAACCAGGTAAAACAGCAGAGTGGAAAG
TCGTCCCAGTTTTTTTTGGATATGTTAATCACCCTTTTCCGAAACCATATCGAGAGCC
ATTCAACTTGTAAAAGTTGCAGACATACAGCGCCAACCAATCGAAGTGAGTTATTTCTCG
CCGCTATAGACAAACTTTGTAGGAAACATTAGACCGCTTGATGACGGGGTCAAGTTCGTA
CAGAAGATGGTGAATGGTTTTGCTGCCAGGATGAGCTACAAAAAGGAACCCCTTGGTGGAT
GGCATAAGGAACTCCAAAGAGAAGGGGCGTGAAAACCTCATTCGAGCCGTGGTTCGAGC
CACGGAGTACGCCAAACAATCTGTTTGACCTATTCATCCAACAACCGTTGGTAACATA
CAGGGTGTCCCCAAGTGGAGCGTATCTACGCTCTCCCTCAAGACGACGCCGGAAACTGTT
ATATCACAACAGTGAATTTATATACCTCGGCGCAGGGCTGTAGCGGTGCTTGTATACCTG
GCAAAACCAACTACTACGATTTTATATACCTCGGCGCAGTGTTTGCCGGAGGAAGTGA
ACTTTGGGACTCGTCTTTAGGGTCTGGACGAAAACAATTTATTACCTATTCCAGATGATC
CAAATGAACGGAGGCTTCAAGAGGCTTGTGACAGTAGTCAACGGAGATCCCTTCGAAATC
GCAAAAATGAGGACGGCGGGTTTATTGACGGGGTATTGTATACCATACGCATCGAGGCG
CGACAGTGTGCGATATCGATATCAATATTGCAGGGCATAGACACAGTGTTCGACGTGCCG
GCAAAGGCAATTGATGTTATCGACTGTACCCACGGGAGTGGTAGCGTGGCCCTTTCAGC
GGGAGATTAACTGGTCCACTTTTCACGGATGCACGTTGAAACACTACCCGTGATACGC
TATGATAGGCCACCATTGCCACCAAAACCCCGTTGTGCAAGTCCCTCAAGCGGCATG
CCCAACTCACAAACACGCAGGCATATACAGGGAAGGTTTTACTGTAGGACTCAACGCCAA
CTGGCGTGTGCTGGATAATTCAGGGGTAAGTAAACATGTGTCCAAAAGGTTAAACAGAT
GCAGCGCTGGAGCTTCGAAAACAACGTTGGGGGAGAGTCCAGAGTAATTGCCACAGGGG
GTTCCAGGCCATAGACGGCACCCGTGGAACCTTCAATTAAGTGTCAAGGGTGAAGGAG
CTGTAGGCGAGGGTGTCCGTGTTTCAATATTCCCAATGTGATACGTCGGGCTTAAT
GGGACTTGTGTGCAATTTTGCAGACTCTGGAACTACGTAGCATTGCAATGCAGCGGGAG
AACATGTAGGATGATTTCAGATGCACAAGGGTAGCCGCATCGTCTTAGCGGAAACTTCCAT
GAAGGGAATGGTCAATGGTGCCTGGAATACCGTTGAACTGGTCTTCAAACCTGACGCTGT
AACTGCTTCTATCGGCACATACTACTAGAGGAGTGTTCATTAACACAGCCGTGGCAGA
GGATGTGCGTGAGCGGGAACGTGCGCATTTACAGTCTTGGCTGTGCGGGGTGTGCCCT
CGCTGGTATCTCATTACCCCAACTACGCCGTCCGGTATGCCAAGATGCTGGCCAGCTC
TGAGAACGCTAACACGGGTAGCAGGTCCGCACGGGAGGAGCAGTGCATGGCAATCGACCG
CCTGGACCCTGCAAGGCCATCGCACAGCCAACGTGGCAAACTGTGAGGCCAACTACTG
TGCTTCTGCTGCGAACAGCAGCATAGGGATGCACCAGGGCTCAGGATGTGTGTTACAA
CAGATGCAGAACTTAGATCATGCGGCCGTGCTACTGCAGAAAACCGTGGACCACTTCTG
GCGCAGTGCAGCGAAATAGCAACAGCGAAAACAAATGATCAAAAAGGTGGGTTCAATGA
CTTAGATATAAATGCGTAACATTACTCTCACAGGATCAGTTGGTGAATCGAATACGGAAC
CGATGCTGTGGGGATTGTGAGCTGTGTTGCGAATCCAGCCCTTTCATTGAAGGTGTCTC
AGCTCACATTAACCGTGCGGCGCAGGCGCGCTGCCGCAGTTTGTGTAGCTCC**TGA**ATTAC

>BdCCp3

ATGACGTGAGGATCAAGATCATAGGTGACGGGCGGAGACCAAAGCGATAACAATTGCTT
CTTCTGACGGAACACACAGAAG**GTA**AGTGTGCAACATTTCTTTATATCTGTCTAAGGTT

GAATGTCGAGCGCATCGACGCTGGTGATCCTCGTGCCATCGAGTTGGACTCTGGAAGTTC
TGAGTGGTCGTGCGAACGCATAATCATCTCTCGAGAGTCGAAATACTGGATTTTCGACTG
TGTAGCGGACACCTCATCTGAGCATGGCGATGACAACTCTCGTTACCTGCTCTCCGGTAA
CAAGGCATACACCATCAGCATCCAGACTGGCAGTCACAAGGACTCAGGGACATCCGGTAC
GGTGTCTTTGATGCTGCTTGGCACTTTGGGTAGAAGCAACACGAAAGTTATGGGAGCGAA
CTTTTATACGGGTTCCTACTTGGACTTTCGTTGTTAAGGCTGCCGATGTGGGCGAGCTGAA
CGGCGTGTTCCTTCAAATTCAGCCACCTCAGACCCATGGTACTGCGAGTATGTGCGTGT
ATTAACGGCAAGCGCACGGTGAGATCATTCCTATCAAACGCTGGGTGGGCGCGCCTTA
CGAAGCTACAGTTGAGGTCACCACGTCAGAGGGTACAAGTGTTCCTAACTTCAACGAAAC
TACGCCGATGGATATACAGTGCCACACACGCGCTGTCGACATTTACTCGGGGTATGGTGA
TGTTACGGATGCATGTTATTGTTTTGTAGACCTGTGAAGAAGCCCTTCAACATTACAGTGC
GATGCCAAATGAATTGCCAATCATCTGCATTGATGCACGTGGTGGGTTTCATCTTTACACC
ATTCCTTCGGCTCCATATGCACCTTCTGCACGTGTTGACGGGGTGTAAAGCCCATCAGGTA
TGATAGACCTCTTGGGTTATTATGCATGTTTTCCAGCGGTGAGGTGGTGGTATCGATAG
TGGGCCAGTTTTCGCAATACTTCAGCGCCGTTAACCTTGATAACCACATGGAGTCTGAAG
AATATGACCTTTCCTGAGAAGCCGTACTATTTCTTTCACGTTTCTGAACGAGAGCA
TTGACAACATTGACTCCCATGTCCGCTGGTTGATGGTATGTTCCGCTGTTTCTCTCCC
TAGTGTTTTTCAGCATTTGGAGCCCTTTCATCGTTCGGTTCGTTTGGAAAGTACTAAAGAATG
GGAAATGGGGCACGTATGTAACAAGGGGAAATTTGGTGCCTTTAACGAGGACCGCCAA
AATTTGTGTGCCGTAAGCTCGGTACGTTCTTTATCACGGGCTCTGTAGACCTCGTGCAGG
TTTTCAAGCATGGAATTCACGTTTTTGGAGAAATGTTTCGAGTGTGAACGACCAGAATTTATG
CGTACCTCGCGGCTACCACGTTTCATATGCTGGTTTTGATGGTAGGTCACCTCCTTTGTAT
GCACAATGCTTTACAGTGTTTGGGAACGGGAAGATGACATTTCTAACTGCATCATTGAGGA
GCCTACTGTAGATTGCCTAAGTACAAGGATGACGTGATCATTAAAGTACTAATTCAC
ATCCCATGATGGAGTTGCTTTTGGGACTTTACGCCTCGTTGACGCTTCTGGCGTTCCTAC
AGCAACCGGCACGGGTAGACTGGAGTTCACAAACCGGGTTGGCTCTGTCTGCAACGA
GTCAATGGAACAAGACAGCCGCCAAAATTTGCTTGCAGGAGATGGGTTACACCGGTCTCCA
CAATGGCGGGCTAGCGGACCACGAGTGTCTGACGTGCACGGCGTAAACCTATGTGCACC
TATGACCCATAAGATTGCGGCAGCGGGCTTCAAGTGCACCGGTTTGTTCCTTGTGGCGCA
TGCTAACGCTGTGTACAGGGCTGGAGAAGATGCTTGGCCAATGTTTCGCACGATTTGAGG
ACGATATATACCTGCATGACGAGGACGTCGTCGTTTCTTTCGCGGGTAAACCGGTGACC
CGAGTGAATTTTCGTACATAAAGCAGTTGAGCTTTTACTCCTGTTATGAAGAAGTGA
AGCGCACCGTGAATCTCACTTGTTCAGCAATCTGTCTTCTCACGTCGAGTTCAGATGA
AGTTTGGGGAATACGCGGTTGCTATGTGTCCCTCTGGGTGCAAGTATGTCCATTTCTTTT
TCATCTGAGAATTTACAGGACCGATCCTGCTGCATTTGAAGGGTACCTACATTTACACTGA
GGATTCCTCCATTTGCAAGGCCGCTATCCATTTCTGGCGTGAATGACGATTCAGGAGGCGA
GATAGTCTGTTATTCGTGCTATTACACAGTCGACGTTTTTACAGCTCCGTCATGAATGGCGT
AACCAGCTGGGATCGCACCAAATCACGACTGAGTTCAAGCCGGTGCCTTTTTTGGTGTCT
GCGTGCAACCAAACATTTTTGTCGAAGCAGATGAAGTTGCATCGACCTTCTGCCGCGAA
TGCTGACCCCAAACCTTTGACAGGTCAGGACGCCACACCTGGCCCTCCACGTCTCCGGTG
GCTCCCGACTTGGGTTGGAAGGGTTTCAATGGCAATGCGCTTGATTTTGTGAATCTTCA
CAACTATCCAACTCTGACAAGGTTAAAGTATTGCGCGATTTTACCTTCATTTCTCAGAT
AATGCTACAGTGGGACCCCTTTCCCTTCCCATCATTTGGTTTTTTCAGAATTTGCTCGGCA
AGTGGAGCACTTTTGTTTTTCAATTCCAAAGCTGCGGGGGTTTTCAGAATTTGCTCGGCAAGTG
AGCACTTTGTTTTTCAATTCCAAAGCTGCGGGGGTTTTCAGCTGCGCCATTGACAACATGGGC
GAAGTCGTGTTGGAGGAGAACTGCAAACCTGAGCTTTTCAAGACCTCTTTCTTTCTCAA
ATTGGCAGTATGTTTCGCTTATTTACTCAGGCTTCATTTGCGCTTCCAGAGAGGACCACTAT
CGGTATTGTGTACTATAGGCTAACAGGGACATTTGGTTTTTTTCGTCGATGGCAAGCTTAT
CGCGAGTCGTCCACCTCCTTTGACTTCAGTTTGCAGTTTGGTCTGTCTTTTGGCGTGGT
CTATACTTGTTTAGGGCGATTTAGTCCCTTGGGAAGTCTGCGGAGATTGATTCTGACTTTTT
TTATCGGCCAGATCCTGTGCTGGAGATTTTCGATTACGTCATGTCTCCAGATCAGGTGG
AGCACTACAGCCGCTGTTCAGGCTTCTAGCGACAATCGGATCAACTCTCGCCACTCTC
CAACTCGTATGACTGTTGATGGCAATCTGTGTCTGAGCAGCTGCGTGAAGATGCGCGCTC
CATCGCAAACGCGGGTTTGCCTGCGGGCCCTACCAATCCTGCTATCCATTTGGGTTGCC
ACGATTCGCTTGAGAACGAGCGTTTCAATGGCGCTACTGGGCATGAGTTTTTGGTGTGAGTT
GTGGTAAAAGCTGCATGGACCTGATTTGGTCTTTAACGGCAGCAAGGTGTACACCCCG
ACTCGTCTATATGCAAGGCTGCCATCCACTGTGGTGGGATTTCCAAAGGAAGGCGGGCAGG
CAGTTGTACGATTTTACATGGTCCGATAGCTACGACCACTGCCTGGGTCATTACGGTA
GGTGCACCTTTAGATTTTACATTCATACGCTTCAGGGGTGCTGAGCAACAAGTCTAGCATT
CCCCATATGCGTTTCGTTTTCTGTGCGCAGAGCCCCAAGGTGTTGACTCTGTCTGTCAA
GGTAAGCGTGGGATTTGTGTTTTCTGTATGACTGCTTGCAGACACCGCTATTTCTGTGCT
CAAGATGCACCTTGGCACGCGCATG

Références bibliographiques

- Alano, P. (2007) *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Molecular Microbiology*, 66, 291-302.
- Alano, P. and Carter, R. (1990) Sexual differentiation in malaria parasites. *Annual Review of Microbiology*, 44, 429-449.
- Babiker, H.A., Schneider, P. and Reece, S.E. (2008) Gametocytes: insights gained during a decade of molecular monitoring. *Trends in Parasitology*, 24, 525-530.
- Baker, D.A., Thompson, J., Daramola, O.O., Carlton, J.M. and Targett, G.A. (1995) Sexual-stage-specific RNA expression of a new *Plasmodium falciparum* gene detected by in situ hybridisation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 72, 193-201.
- Becker, C.A., Bouju-Albert, A., Jouglin, M., Chauvin, A. and Malandrin, L. (2009) Natural transmission of zoonotic *Babesia* spp. by *Ixodes ricinus* ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 320-322.
- Beetsma, A.L., van de Wiel, T.J., Sauerwein, R.W. and Eling, W.M. (1998) *Plasmodium berghei* ANKA: purification of large numbers of infectious gametocytes. *Experimental Parasitology*, 88, 69-72.
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A.E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R.E. and Morris, H.R. (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, 392, 289-292.
- Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M. and Nene, V. (2004) *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*, 129 Suppl, S271-283.
- Blaschitz, M., Narodoslavsky-Gfoller, M., Kanzler, M., Stanek, G. and Walochnik, J. (2008) *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4841-4846.
- Bonnet, S., Brisseau, N., Hermouet, A., Jouglin, M. and Chauvin, A. (2009) Experimental *in vitro* transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. *Veterinary Research*, 40, 21.
- Bonnet, S., Jouglin, M., L'Hostis, M. and Chauvin, A. (2007a) *Babesia* sp. EU1 from Roe Deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1208-1210.
- Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L'Hostis, M. and Chauvin, A. (2007b) Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology*, 134, 197-207.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J. and DeRisi, J.L. (2003) The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology*, 1, E5.
- Brayton, K.A., Lau, A.O., Herndon, D.R., Hannick, L., Kappmeyer, L.S., Berens, S.J., Bidwell, S.L., Brown, W.C., Crabtree, J., Fadrosch, D., Feldblum, T., Forberger, H.A., Haas, B.J., Howell, J.M., Khouri, H., Koo, H., Mann, D.J., Norimine, J., Paulsen, I.T., Radune, D., Ren, Q., Smith, R.K., Jr., Suarez, C.E., White, O., Wortman, J.R., Knowles, D.P., Jr., McElwain, T.F. and Nene, V.M. (2007) Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotezoa. *PLoS Pathogens*, 3, 1401-1413.

- Buscher, G., Friedhoff, K.T. and el-Allawy, T.A. (1988) Quantitative description of the development of *Babesia ovis* in *Rhipicephalus bursa* (hemolymph, ovary, eggs). *Parasitology Research*, 74, 331-339.
- Carter, V., Shimizu, S., Arai, M. and Dessens, J.T. (2008) PbSR is synthesized in macrogametocytes and involved in formation of the malaria crystalloids. *Molecular Microbiology*, 68, 1560-1569.
- Casati, S., Sager, H., Gern, L. and Piffaretti, J.C. (2006) Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13, 65-70.
- Chauvin, A., Valentin, A., Malandrin, L. and L'Hostis, M. (2002) Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*. *Veterinary Research*, 33, 429-433.
- Christensson, D.A. (1989) Inverse age resistance to experimental *Babesia divergens* infection in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 30, 453-464.
- Claudianos, C., Dessens, J.T., Trueman, H.E., Arai, M., Mendoza, J., Butcher, G.A., Crompton, T. and Sinden, R.E. (2002) A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Molecular Microbiology*, 45, 1473-1484.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A. and Barba-Carretero, J.C. (2004) The "expanding universe" of piroplasms. *Veterinary Parasitology*, 119, 337-345.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A. and Barba-Carretero, J.C. (2003) Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, 114, 173-194.
- Dalgliesh, R.J., Stewart, N.P. and Rodwell, B.J. (1981) Increased numbers of strahlenkorper in *Boophilus microplus* ticks ingesting a blood-passaged strain of *Babesia bigemina*. *Research in Veterinary Science*, 31, 350-352.
- de Vos, A.J., Stewart, N.P. and Dalgliesh, R.J. (1989) Effect of different methods of maintenance on the pathogenicity and infectivity of *Babesia bigemina* for the vector *Boophilus microplus*. *Research in Veterinary Science*, 46, 139-142.
- Delrieu, I., Waller, C.C., Mota, M.M., Grainger, M., Langhorne, J. and Holder, A.A. (2002) PSLAP, a protein with multiple adhesive motifs, is expressed in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121, 11-20.
- Dessens, J.T., Sinden, R.E. and Claudianos, C. (2004) LCCL proteins of apicomplexan parasites. *Trends in Parasitology*, 20, 102-108.
- Dixon, M.W., Thompson, J., Gardiner, D.L. and Trenholme, K.R. (2008) Sex in *Plasmodium*: a sign of commitment. *Trends in Parasitology*, 24, 168-175.
- Donnelly, J. and Peirce, M.A. (1975) Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*, 5, 363-367.
- Droleskey, R.E., Holman, P.J., Craig, T.M., Wagner, G.G. and Mollenhauer, H.H. (1983) Ultrastructure of *Babesia bovis* sexual stages as observed in *Boophilus microplus* cell cultures. *Research in Veterinary Science*, 34, 249-251.
- Duh, D., Petrovec, M. and Avsic-Zupanc, T. (2001) Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3395-3397.
- Duh, D., Petrovec, M., Bidovec, A. and Avsic-Zupanc, T. (2005) Cervids as *Babesia* hosts, Slovenia. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1121-1123.
- Dyer, M. and Day, K.P. (2000) Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, 16, 102-107.

- Ecker, A., Bushell, E.S., Tewari, R. and Sinden, R.E. (2008) Reverse genetics screen identifies six proteins important for malaria development in the mosquito. *Molecular Microbiology*, 70, 209-220.
- Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R. and Carucci, D.J. (2002) A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419, 520-526.
- Florent, I., Mouray, E., Dali Ali, F., Drobecq, H., Girault, S., Schrevel, J., Sergheraert, C. and Grellier, P. (2000) Cloning of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase homologue by affinity purification using the antiplasmodial inhibitor 1,4-bis[3-[N-(cyclohexyl methyl)amino]propyl]piperazine. *FEBS Letters*, 484, 246-252.
- Friedhoff, K.T. (1981) Morphologic aspects of *Babesia* in the tick. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds.), *Babesiosis*. Academic Press, New York, USA, pp. 143-169.
- Friedhoff, K.T. (1988) Transmission of *Babesia*. In Ristic, M. (ed.), *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, pp. 23-52.
- Friedhoff, K.T. and Buscher, G. (1976) Rediscovery of Koch's "Strahlenkörper" of *Babesia bigemina*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 50, 345-347.
- Friedhoff, K.T. and Smith, R.D. (1981) Transmission of *Babesia* by ticks. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds.), *Babesiosis*. Academic Press, New York, USA, pp. 267-321.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 498-511.
- Gorenflot, A., Brasseur, P., Precigout, E., L'Hostis, M., Marchand, A. and Schrevel, J. (1991) Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. *Parasitology Research*, 77, 3-12.
- Gough, J.M., Jorgensen, W.K. and Kemp, D.H. (1998) Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 298-306.
- Gray, J.S. (1980) Studies on the activity of *Ixodes ricinus* in relation to the epidemiology of babesiosis in Co. Meath, Ireland. *British Veterinary Journal*, 136, 427-436.
- Gray, J.S. (2006) Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology*, 296 Suppl 40, 131-136.
- Guglielmone, A.A., Gaido, A.B. and Mangold, A.J. (1996) Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Veterinary Parasitology*, 61, 15-20.
- Hall, N., Karras, M., Raine, J.D., Carlton, J.M., Kooij, T.W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C.S., Pain, A., Christophides, G.K., James, K., Rutherford, K., Harris, B., Harris, D., Churcher, C., Quail, M.A., Ormond, D., Doggett, J., Trueman, H.E., Mendoza, J., Bidwell, S.L., Rajandream, M.A., Carucci, D.J., Yates, J.R., 3rd, Kafatos, F.C., Janse, C.J., Barrell, B., Turner, C.M., Waters, A.P. and Sinden, R.E. (2005) A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*, 307, 82-86.

- Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Beugnet, F., Le Menach, A., Boulouis, H.J. and Vayssier-Taussat, M. (2005) Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Veterinary Research*, 36, 79-87.
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D. and Kimmig, P. (2004) Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 293 Suppl 37, 86-92.
- Hentrich, B. and Bose, R. (1993) Cryopreservation of *Babesia divergens* from jirds as a live vaccine for cattle. *International Journal for Parasitology*, 23, 771-776.
- Higuchi, S., Fujimori, M., Hoshi, F., Kawamura, S. and Yasuda, Y. (1995) Development of *Babesia gibsoni* in the salivary glands of the larval tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57, 117-119.
- Higuchi, S., Oya, H., Hoshi, F., Kawamura, S. and Yasuda, Y. (1994) Development of *Babesia ovata* in the salivary glands of the nymphal tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56, 207-209.
- Higuchi, S., Simomura, S., Yoshida, H., Hoshi, F., Kawamura, S. and Yasuda, Y. (1991) Development of *Babesia gibsoni* in the hemolymph of the vector tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53, 491-493.
- Hilpertshausen, H., Deplazes, P., Schnyder, M., Gern, L. and Mathis, A. (2006) *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6503-6507.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd, Krause, P.J. and Persing, D.H. (2000) Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 451-469.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A. and Gray, J.S. (2008) Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38, 1219-1237.
- Joyner, L.P., Davies, S.F. and Kendall, S.B. (1963) The Experimental Transmission of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus*. *Experimental Parasitology*, 14, 367-373.
- Joyner, L.P. and Donnelly, J. (1979) The epidemiology of babesial infections. *Advances in Parasitology*, 17, 115-140.
- Karakashian, S.J., Rudzinska, M.A., Spielman, A., Lewengrub, S., Piesman, J. and Shoukrey, N. (1983) Ultrastructural studies on sporogony of *Babesia microti* in salivary gland cells of the tick *Ixodes dammini*. *Cell and Tissue Research*, 231, 275-287.
- Khan, S.M., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Lasonder, E., Janse, C.J., Mann, M. and Waters, A.P. (2005) Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*, 121, 675-687.
- Kooij, T.W., Janse, C.J. and Waters, A.P. (2006) *Plasmodium* post-genomics: better the bug you know? *Nature reviews. Microbiology*, 4, 344-357.
- Kooij, T.W. and Matuschewski, K. (2007) Triggers and tricks of *Plasmodium* sexual development. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 547-553.
- Kuzna-Grygiel, W., Bukowska, K., Cichocka, A., Kosik-Bogacka, D. and Skotarczak, B. (2002) The prevalence of piroplasms in a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) from north-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 9, 175-178.
- L'Hostis, M. and Chauvin, A. (1999) *Babesia divergens* in France: descriptive and analytical epidemiology. *Parassitologia*, 41 Suppl 1, 59-62.
- L'Hostis, M., Chauvin, A., Valentin, A., Marchand, A. and Gorenflot, A. (1995) Large scale survey of bovine babesiosis due to *Babesia divergens* in France. *The Veterinary Record*, 136, 36-38.

- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J.S., Vermunt, A.M., Pain, A., Sauerwein, R.W., Eling, W.M., Hall, N., Waters, A.P., Stunnenberg, H.G. and Mann, M. (2002) Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*, 419, 537-542.
- Lavazec, C., Moreira, C.K., Mair, G.R., Waters, A.P., Janse, C.J. and Templeton, T.J. (2009) Analysis of mutant *Plasmodium berghei* parasites lacking expression of multiple PbCCp genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 163, 1-7.
- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J. and Winzeler, E.A. (2003) Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*, 301, 1503-1508.
- Lewengrub, S., Rudzinska, M.A., Piesman, J., Spielman, A. and Zung, J. (1989) The influence of heat on the development of *Babesia microti* in unfed nymphs of *Ixodes dammini*. *Canadian Journal of Zoology*, 67, 1510-1515.
- Lewis, D. and Williams, H. (1979) Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*. *Nature*, 278, 170-171.
- Lewis, D. and Young, E.R. (1980) The transmission of a human strain of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Parasitology*, 66, 359-360.
- Liepinsh, E., Trexler, M., Kaikkonen, A., Weigelt, J., Banyai, L., Patthy, L. and Otting, G. (2001) NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. *EMBO Journal*, 20, 5347-5353.
- Lobo, C.A. and Kumar, N. (1998) Sexual differentiation and development in the malaria parasite. *Parasitology Today*, 14, 146-150.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Fuchs, P., Zapf, F., Schein, E. and Mehlhorn, H. (1995) DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitology Research*, 81, 595-604.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Mehlhorn, H., Schein, E. and Hauschild, S. (1990) Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. *Parasitology Research*, 76, 199-206.
- Madder, M., Speybroeck, N., Berkvens, D., Baudoux, V., Marcotty, T., Pita Bah, I., Geysen, D. and Brandt, J. (2003) Merogony in in vitro cultures of *Theileria parva*. *Veterinary Parasitology*, 114, 195-203.
- Malandrini, L., Jouglin, M., Moreau, E. and Chauvin, A. (2009) Individual heterogeneity in erythrocyte susceptibility to *Babesia divergens* is a critical factor for the outcome of experimental spleen-intact sheep infections. *Veterinary Research*, 40, 25.
- Malandrini, L., L'Hostis, M. and Chauvin, A. (2004) Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture. *Veterinary Research*, 35, 131-139.
- Marcotty, T., Berkvens, D., Besa, R.K., Losson, B., Dolan, T.T., Madder, M., Chaka, G., Van den Bossche, P. and Brandt, J. (2003) Lyophilisation and resuscitation of sporozoites of *Theileria parva*: preliminary experiments. *Vaccine*, 22, 213-216.
- McCosker, P.J. (1981) The global importance of babesiosis. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds.), *Babesiosis*. Academic Press, New York, USA, pp. 1-24.
- Mehlhorn, H., Moltmann, U., Schein, E. and Voigt, W.P. (1981) Fine structure of supposed gametes and syngamy of *Babesia canis* (Piroplasma) after in-vitro development. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A*, 250, 248-255.
- Mehlhorn, H. and Schein, E. (1984) The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology*, 23, 37-103.

- Mehlhorn, H., Schein, E. and Voigt, W.P. (1980) Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*. *Journal of Parasitology*, 66, 220-228.
- Mehlhorn, H. and Walldorf, V. (1988) Life cycles. In Mehlhorn, H. (ed.), *Parasitology in focus. Facts and trends*. Springer-Verlag, Berlin, German Federal Republic, pp. 1-148.
- Moltmann, U.G., Mehlhorn, H. and Friedhoff, K.T. (1982) Electron microscopic study on the development of *Babesia ovis* (Piroplasmia) in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus bursa*. *Acta Tropica*, 39, 29-40.
- Morrison, W.I. and McKeever, D.J. (2006) Current status of vaccine development against *Theileria* parasites. *Parasitology*, 133 Suppl, S169-187.
- Morzaria, S.P., Bland, P. and Brocklesby, D.W. (1976) Ultrastructure of *Babesia major* in the tick *Haemaphysalis punctata*. *Research in Veterinary Science*, 21, 1-11.
- Mosqueda, J., Falcon, A., Antonio Alvarez, J., Alberto Ramos, J., Oropeza-Hernandez, L.F. and Figueroa, J.V. (2004a) *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *International Journal for Parasitology*, 34, 1229-1236.
- Mosqueda, J., McElwain, T.F. and Palmer, G.H. (2002a) *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70, 6448-6455.
- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Stiller, D. and Palmer, G.H. (2002b) *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70, 1599-1603.
- Mosqueda, J., Ramos, J.A., Falcon, A., Alvarez, J.A., Aragon, V. and Figueroa, J.V. (2004b) *Babesia bigemina*: sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular characterization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 222-231.
- Mouray, E., Moutiez, M., Girault, S., Sergheraert, C., Florent, I. and Grellier, P. (2007) Biochemical properties and cellular localization of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase. *Biochimie*, 89, 337-346.
- Musyoki, J.M., Osir, E.O., Kiara, H.K. and Kokwaro, E.D. (2004) Comparative studies on the infectivity of *Theileria parva* in ticks fed *in vitro* and those fed on cattle. *Experimental and Applied Acarology*, 32, 51-67.
- Nijhof, A.M., Bodaan, C., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F. and Jongejan, F. (2007) Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7, 585-595.
- Ozaki, L.S., Gwadz, R.W. and Godson, G.N. (1984) Simple centrifugation method for rapid separation of sporozoites from mosquitoes. *Journal of Parasitology*, 70, 831-833.
- Piccolin, G., Benedetti, G., Doglioni, C., Lorenzato, C., Mancuso, S., Papa, N., Pitton, L., Ramon, M.C., Zasio, C. and Bertiato, G. (2006) A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 6, 24-31.
- Pichon, B., Egan, D., Rogers, M. and Gray, J. (2003) Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 40, 723-731.

- Pieniasek, N., Sawczuk, M. and Skotarczak, B. (2006) Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. *Journal of Parasitology*, 92, 32-35.
- Piesman, J., Karakashian, S.J., Lewengrub, S., Rudzinska, M.A. and Spielman, A. (1986) Development of *Babesia microti* sporozoites in adult *Ixodes dammini*. *International Journal for Parasitology*, 16, 381-385.
- Potgieter, F.T. and Els, H.J. (1976) Light and electron microscopic observations on the development of small merozoites of *Babesia bovis* in *Boophilus microplus* larvae. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 43, 123-128.
- Pradel, G. (2007) Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology*, 134, 1911-1929.
- Pradel, G., Hayton, K., Aravind, L., Iyer, L.M., Abrahamsen, M.S., Bonawitz, A., Mejia, C. and Templeton, T.J. (2004) A multidomain adhesion protein family expressed in *Plasmodium falciparum* is essential for transmission to the mosquito. *The Journal of Experimental Medicine*, 199, 1533-1544.
- Pradel, G., Wagner, C., Mejia, C. and Templeton, T.J. (2006) *Plasmodium falciparum*: Co-dependent expression and co-localization of the PfCCp multi-adhesion domain proteins. *Experimental Parasitology*, 112, 263-268.
- Raine, J.D., Ecker, A., Mendoza, J., Tewari, R., Stanway, R.R. and Sinden, R.E. (2007) Female Inheritance of Malarial Infection Genes Is Essential for Mosquito Transmission. *PLoS Pathogens*, 3, e30.
- Ribeiro, M.F. and Patarroyo, J.H. (1998) Ultrastructure of *Babesia bigemina* gametes obtained in "in vitro" erythrocyte cultures. *Veterinary Parasitology*, 76, 19-25.
- Rudzinska, M.A., Spielman, A., Lewengrub, S., Trager, W. and Piesman, J. (1983) Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 2966-2970.
- Rudzinska, M.A., Spielman, A., Riek, R.F., Lewengrub, S.J. and Piesman, J. (1979) Intraerythrocytic 'gametocytes' of *Babesia microti* and their maturation in ticks. *Canadian Journal of Zoology*, 57, 424-434.
- Schein, E., Mehlhorn, H. and Voigt, W.P. (1979) Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Tropica*, 36, 229-241.
- Schmid, N., Deplazes, P., Hoby, S., Ryser-Degiorgis, M.P., Edelhofer, R. and Mathis, A. (2008) *Babesia divergens*-like organisms from free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) and roe deer (*Capreolus c. capreolus*) are distinct from *B. divergens* of cattle origin - an epidemiological and molecular genetic investigation. *Veterinary Parasitology*, 154, 14-20.
- Scholz, S.M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M.A., Templeton, T.J. and Pradel, G. (2008) PfCCp proteins of *Plasmodium falciparum*: gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *International Journal for Parasitology*, 38, 327-340.
- Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., Di Giulio, E., Bultrini, E., Picci, L., Derisi, J.L., Pizzi, E. and Alano, P. (2005) Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143, 100-110.
- Skotarczak, B. and Cichocka, A. (2001) Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 8, 187-189.

- Smith, T.G., Walliker, D. and Ranford-Cartwright, L.C. (2002) Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa. *Trends in Parasitology*, 18, 315-323.
- Sonenshine, D.E. (1991) *Biology of ticks*. Oxford University Press, Inc., New York, USA.
- Stewart, N.P., Dalglish, R.J. and De Vos, A.J. (1986) Effect of different methods of maintenance on the development and morphology of *Babesia bigemina* in the gut of *Boophilus microplus*. *Research in Veterinary Science*, 40, 94-98.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S. and Menard, R. (1997) TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell*, 90, 511-522.
- Talman, A.M., Domarle, O., McKenzie, F.E., Ariey, F. and Robert, V. (2004) Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 3, 24.
- Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A. and Pietrobelli, M. (2008) Wild Ungulates as *Babesia* Hosts in Northern and Central Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*.
- Templeton, T.J. (2007) Whole-genome natural histories of apicomplexan surface proteins. *Trends in Parasitology*, 23, 205-212.
- Templeton, T.J., Iyer, L.M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Subramanian, G.M., Hoffman, S.L., Abrahamsen, M.S. and Aravind, L. (2004) Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome Research*, 14, 1686-1695.
- Tosini, F., Agnoli, A., Mele, R., Gomez Morales, M.A. and Pozio, E. (2004) A new modular protein of *Cryptosporidium parvum*, with ricin B and LCCL domains, expressed in the sporozoite invasive stage. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134, 137-147.
- Tosini, F., Trasarti, E. and Pozio, E. (2006) Apicomplexa genes involved in the host cell invasion: the Cpa135 protein family. *Parassitologia*, 48, 105-107.
- Trager, W., Gill, G.S., Lawrence, C. and Nagel, R.L. (1999) *Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Experimental Parasitology*, 91, 115-118.
- Trueman, H.E., Raine, J.D., Florens, L., Dessens, J.T., Mendoza, J., Johnson, J., Waller, C.C., Delrieu, I., Holders, A.A., Langhorne, J., Carucci, D.J., Yates, J.R., 3rd and Sinden, R.E. (2004) Functional characterization of an LCCL-lectin domain containing protein family in *Plasmodium berghei*. *Journal of Parasitology*, 90, 1062-1071.
- Uilenberg, G. (2006) *Babesia*--a historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138, 3-10.
- Vermeulen, A.N., Ponnudurai, T., Beckers, P.J., Verhave, J.P., Smits, M.A. and Meuwissen, J.H. (1985) Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *Journal of Experimental Medicine*, 162, 1460-1476.
- Vichido, R., Falcon, A., Ramos, J.A., Alvarez, A., Figueroa, J.V., Norimine, J., Brown, W.C., Castro, L.A. and Mosqueda, J. (2008) Expression analysis of heat shock protein 20 and rhoptry-associated protein 1a in sexual stages and kinetes of *Babesia bigemina*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 136-140.
- Voigt, W.P., Young, A.S., Mwaura, S.N., Nyaga, S.G., Njihia, G.M., Mwakima, F.N. and Morzaria, S.P. (1993) *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology*, 107 (Pt 3), 257-263.
- Waladde, S.M., Young, A.S., Ochieng, S.A., Mwaura, S.N. and Mwakima, F.N. (1993) Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults

- fed as nymphae *in vitro* on infected blood through an artificial membrane. *Parasitology*, 107 (Pt 3), 249-256.
- Walker, A.R. and McKellar, S.B. (1983) Observations on the separation of *Theileria* sporozoites from ticks. *International Journal for Parasitology*, 13, 313-318.
- Weber, G. and Friedhoff, K.T. (1977) Preliminary observations on the ultrastructure of supposed sexual stages of *Babesia bigemina* (Piroplasma). *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 53, 83-92.
- Weber, G. and Walter, G. (1980) *Babesia microti* (apicomplexa: piroplasmida): electron microscope detection in salivary glands of the tick vector *Ixodes ricinus* (Ixodoidea: Ixodidae). *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 64, 113-115.
- Wielinga, P.R., Fonville, M., Sprong, H., Gaasenbeek, C., Borgsteede, F. and Giessen, J.W. (2008) Persistent Detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in The Netherlands During a 5-Year Surveillance: 2003-2007. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*.
- Winston, V. (1989) Use of a polynomial exponential function to describe migration of proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 10, 220-222.
- Yano, Y., Saito-Ito, A., Anchalee, D. and Takada, N. (2005) Japanese *Babesia microti* cytologically detected in salivary glands of naturally infected tick *Ixodes ovatus*. *Microbiology and Immunology*, 49, 891-897.
- Young, A.S. and Morzaria, S.P. (1986) Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, 2, 211-219.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M. and Gray, J.S. (2003) *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 622-636.
- Zintl, A., Westbrook, C., Mulcahy, G., Skerrett, H.E. and Gray, J.S. (2002) Invasion, and short- and long-term survival of *Babesia divergens* (Phylum Apicomplexa) cultures in non-bovine sera and erythrocytes. *Parasitology*, 124, 583-588.

Table des matières

Remerciements.....	1
Sommaire.....	2
Liste des Figures.....	3
Liste des Tableaux.....	5
Liste des Annexes.....	6
Liste des Abréviations.....	7
Introduction.....	9
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	11
I. <i>Babesia divergens</i> , parasite des bovins, transmis par les tiques.....	11
A. Cycle de développement parasitaire.....	11
B. Biologie d' <i>I. ricinus</i> et lien avec le développement de <i>B. divergens</i>	14
C. La babésiose bovine à <i>B. divergens</i>	15
1. Epidémiologie.....	15
2. Symptômes.....	16
3. Diagnostic.....	16
4. Traitement et prévention.....	17
D. Transmission de <i>B. divergens</i> par <i>I. ricinus</i>	17
1. Transmission de l'hôte vertébré à la tique.....	18
2. Transmission d'un stade à l'autre de la tique.....	20
a. Transmission trans-ovarienne.....	20
b. Transmission trans-stadiale.....	21
3. Transmission de la tique à l'hôte vertébré.....	21
4. Transmission en conditions naturelles.....	22
II. Le sporozoïte : stade de transmission du vecteur au vertébré.....	25
A. Formation et caractères morphologiques des sporozoïtes.....	25
B. Méthodes de production et d'isolement des sporozoïtes.....	29
C. Caractérisation moléculaire des sporozoïtes.....	30
III. Les stades sexués : stades de transmission du vertébré au vecteur.....	32
A. Le gamétocyte.....	32
1. Le cas de <i>Plasmodium</i>	32
a. Gamétocytogenèse et gamétocytes chez <i>P. falciparum</i>	33
b. Facteurs induisant et influençant la gamétocytogenèse.....	35
c. Expression génique chez les gamétocytes.....	37
2. Le cas de <i>Babesia</i>	38
B. Développement du parasite chez le vecteur : émergence des gamètes et reproduction sexuée.....	40
1. Le cas de <i>Plasmodium</i>	40
a. Différenciation des gamétocytes en gamètes.....	40
b. Facteurs influençant l'émergence des gamètes.....	40
2. Le cas de <i>Babesia</i>	41
a. Description du développement parasitaire dans le tube digestif de tique.....	41
b. Induction de la différenciation morphologique des stades sexués <i>in vitro</i>	44
C. Les marqueurs des stades parasitaires sexués.....	46
1. Protéines spécifiques des stades sexués et présents chez le vecteur, connues chez <i>Plasmodium</i>	46
a. Principales protéines connues chez <i>P. falciparum</i>	46
b. La famille Ccp.....	48
α. Les protéines et leurs domaines.....	49
β. Expression des différentes protéines de la famille CCp.....	51
γ. Fonction des protéines de la famille CCp.....	53
δ. Orthologues connus chez les Apicomplexes.....	55
2. Marqueurs des stades sexués de <i>Babesia</i>	56
Objectifs de la thèse.....	59

Chapitre 2 : Matériel et méthodes	61
I. Matériel biologique	61
A. Isolats et souches de <i>B. divergens</i>	61
B. Sang	61
C. Tiques	62
1. Elevage de tiques saines	62
2. Collecte de tiques sur la végétation	62
3. Récolte de tiques sur animaux	62
D. Animaux expérimentaux	63
1. Moutons	63
2. Bovins	63
3. Gerbilles	63
4. Lapin	63
E. ADN d'autres Apicomplexes	64
II. Entretien du matériel biologique	64
A. Culture <i>in vitro</i> de <i>B. divergens</i>	64
1. Conditions générales de culture	64
2. Conservation des souches et isolats	65
3. Purification des formes parasitaires libres	65
B. Elevage des tiques	66
1. Système de gorgement artificiel sur membrane	66
2. Gorgement sur animaux	67
III. Infections de l'hôte vertébré et du vecteur par <i>B. divergens</i>	68
A. Infections expérimentales d'animaux par <i>B. divergens</i>	68
1. Gerbilles	68
2. Veaux	68
B. Infections expérimentales de tiques par <i>B. divergens</i>	69
1. Infections <i>in vitro</i> sur membrane	69
2. Infections <i>in vivo</i>	69
IV. Production expérimentale et recherche des sporozoïtes de <i>B. divergens</i>	70
A. Protocoles d'infections expérimentales de tiques en vue de l'isolement des sporozoïtes	70
1. Transmission trans-stadiale de <i>B. divergens</i>	70
2. Transmissions trans-ovarienne et trans-stadiale de <i>B. divergens</i>	70
B. Méthodes utilisées pour mettre en évidence la présence des sporozoïtes dans les glandes salivaires	71
1. Essais de retransmission parasitaire par les tiques	72
2. Analyse des glandes salivaires	73
a. Dissection des tiques	73
b. Recherche des sporozoïtes dans les glandes salivaires	73
3. Recherche d'ADN de <i>B. divergens</i> par amplification par PCR sur tiques	74
V. Essais d'induction de la différenciation sexuée <i>in vitro</i>	76
A. Facteurs favorisant la gamétocytogenèse	76
1. Saturation du milieu en formes parasitaires asexuées	76
2. Babésicide	76
3. Stress des globules rouges parasités par choc thermique	76
B. Facteurs reproduisant le passage chez le vecteur	77
1. Acide xanthurénique	77
2. Modification du pH du milieu	77
3. Incubation des globules rouges parasités à température ambiante	77
4. Extrait de tube digestif de tique gorgée	77
VI. Identification de gènes spécifiques de gamétocytes	77
A. Sélection de gènes <i>in silico</i>	77
1. Recherche de protéines spécifiques des stades sexués dans le genre <i>Plasmodium</i>	77
2. Recherche d'orthologues chez les <i>Babesia</i> spp.	78
3. Alignements de séquences et définition d'amorces dégénérées	78

B. Identification des gènes <i>ccp</i> chez <i>B. divergens</i>	79
1. Extraction d'ADN	79
2. Mise en évidence des gènes <i>ccp</i> chez <i>B. divergens</i> par PCR et amorces dégénérées	79
3. Nouvelle série d'amplifications par PCR avec des amorces dégénérées	80
4. RACE	80
5. Séquençage	81
a. Produits de PCR et plasmides	81
b. Séquençage direct sur ADN génomique	81
C. Analyse de l'expression des gènes <i>bdccp</i> par détection des transcrits correspondants	81
1. Extraction d'ARN total	81
2. Détection des ARNm des <i>ccp</i> par RT-PCR	82
3. Détermination de la séquence codante des gènes <i>ccp</i> chez <i>B. divergens</i>	82
4. Analyse des domaines protéiques	82
VII. Validation de la protéine BdCCp2 comme marqueur des gamétocytes de <i>B. divergens</i>	83
A. Obtention de sérums dirigés contre la protéine BdCCp2	83
1. Production de protéine recombinante	83
2. Obtention d'un sérum de lapin dirigé contre rpBdCCp2	83
3. Obtention d'un sérum de cobaye dirigé contre spBdCCp2	84
B. Evaluation de la spécificité des sérums par IFI sur la population parasitaire intra-érythrocytaire	85
1. Sur globules rouges parasités par <i>B. divergens</i>	85
2. Sur gamétocytes de <i>P. berghei</i>	85
a. Production de gamétocytes de <i>P. berghei</i> chez la souris	85
b. IFI sur les gamétocytes de <i>P. berghei</i>	85
C. Recherche des stades sexués de <i>B. divergens</i> par Western Blot	86
1. Analyse de la population parasitaire intra-érythrocytaire	86
2. Analyse de tube digestif de tiques infectées	86
3. Technique de Western Blot	87
D. Recherche des stades sexués de <i>B. divergens</i> par immunohistochimie dans des tiques	88
Chapitre 3 : Etude des sporozoïtes de <i>B. divergens</i>	89
I. Production et collecte de tiques infectées	89
A. Infections expérimentales de tiques <i>in vitro</i>	89
B. Infections expérimentales de tiques sur gerbilles parasitées	89
C. Infections expérimentales de tiques sur moutons	89
D. Infections expérimentales de tiques sur veaux	89
E. Collecte de tiques sur des vaches laitières	91
II. Capacité infectante d' <i>I. ricinus</i> après acquisition et transmission trans-stadiale de <i>B. divergens</i>	92
A. Acquisition par la larve et retransmission par la nymphe	92
1. Analyse de la retransmission <i>in vitro</i>	92
2. Analyse de la retransmission <i>in vivo</i>	93
B. Acquisition par la nymphe et retransmission par l'adulte	93
III. Capacité infectante d' <i>I. ricinus</i> après transmission trans-ovarienne et trans-stadiale de <i>B. divergens</i>	94
A. Retransmission par les larves	94
1. Analyse de la retransmission <i>in vitro</i>	94
2. Analyse de la retransmission <i>in vivo</i>	95
B. Retransmission par les nymphes	97
C. Retransmission par les adultes : recherche de sporozoïtes dans les glandes salivaires	98
IV. Analyses de tiques issues de populations infectées naturellement	99
A. Essais de retransmission par des larves issues d'adultes gorgées sur bovins infectés	99
B. Mise en évidence des sporozoïtes dans les glandes salivaires d'adultes	100
1. Tiques collectées à Mache coul	100
2. Tiques collectées à La Verrie	100

V. Discussion	103
Chapitre 4 : Identification des stades sexués de <i>B. divergens</i>	113
I. Essais d'induction de la différenciation sexuée <i>in vitro</i>	113
II. Identification de trois nouveaux gènes de <i>B. divergens</i>	114
A. Identification de gènes des Apicomplexes spécifiques de stades sexués par analyses bioinformatiques	114
B. Mise en évidence des gènes <i>ccp</i> chez <i>B. divergens</i>	117
1. Définition d'amorces dégénérées par comparaisons de séquences	117
2. Amplification par PCR de portions des gènes <i>ccp</i> chez <i>B. divergens</i>	118
3. Obtention de la séquence des gènes <i>bdccp1, 2 & 3</i>	120
C. Expression des gènes <i>bdccp</i> : analyse des transcrits	122
1. Mise en évidence des ARNm dans la population parasitaire intra-érythrocytaire présente <i>in vitro</i>	122
2. Séquence codante et domaines protéiques des CCp chez <i>B. divergens</i>	123
III. Marqueurs des stades sexués de <i>B. divergens</i>	125
A. Expression de BdCCp2 par les parasites intra-érythrocytaires	125
1. Recherche de BdCCp2 dans des globules rouges parasités par <i>B. divergens</i>	125
a. Détection par IFI	125
b. Détection par Western Blot	125
2. Validation de la spécificité des sérums sur gamétocytes de <i>P. berghei</i>	129
B. Expression de BdCCp2 par les parasites présents dans le tube digestif de tiques infectées	130
1. Analyse par Western Blot du contenu digestif de tiques partiellement gorgées	130
a. Tiques infectées sur animaux	130
b. Tiques infectées <i>in vitro</i>	132
2. Analyses immunohistochimiques de tiques infectées	133
IV. Discussion	136
Conclusion et perspectives	141
Annexes	145
Références bibliographiques.....	199
Table des matières.....	209

VU
Le Directeur de thèse

VU
Le Responsable de l'École Doctorale

**VU pour autorisation de soutenance
Rennes, le**

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINÉAU

**VU après soutenance pour autorisation de publication :
Le Président de Jury,**

Etude des stades de transmission de *Babesia divergens*

Babesia divergens est un protozoaire parasite des globules rouges des bovins. Il est transmis par une tique dure, *Ixodes ricinus*. Le cycle de développement de ce parasite n'est pas défini précisément chez son vecteur. L'objectif était d'identifier les stades de transmission de *B. divergens*, d'une part du vecteur à l'hôte vertébré, le sporozoïte et d'autre part de l'hôte vertébré au vecteur, le gamétocyte. Dans la première partie, de nombreuses infections expérimentales de tiques ont été réalisées pour isoler les sporozoïtes à partir des organes de transmission de la tique, les glandes salivaires. Même si aucun parasite n'a pu être isolé pour *B. divergens*, la mise en évidence de sporozoïtes d'une autre espèce, *B. sp. EU1* chez *I. ricinus* a permis de valider les méthodes développées. Pour l'étude des gamétocytes, des gènes conservés chez les Apicomplexes et spécifiques des stades sexués ont été sélectionnés chez *P. falciparum* par analyses bioinformatiques. Les 3 gènes *bdccp1*, 2 & 3 ont été mis en évidence chez *B. divergens*, ainsi que la présence de leurs transcrits dans la population parasitaire intra-érythrocytaire. L'étude d'une des protéines, BdCCp2, a permis à l'aide de sérums immuns dirigés contre cette protéine, de montrer l'existence des stades sexués de *B. divergens*, dans le tube digestif de tique. Les outils et les méthodes développés au cours de cette thèse pourront servir à préciser les connaissances sur la transmission de *B. divergens*.

Study of *Babesia divergens*' transmission stages

Babesia divergens is a protozoan parasite of bovine red blood cells. It is transmitted by the hard tick *Ixodes ricinus*. The life cycle of this parasite inside its vector is not precisely known. The aim was here to identify the transmission stages of *B. divergens*, on one hand the sporozoite (transmission from the vector to the vertebrate host) and on the other hand the gametocyte (transmission from the vertebrate to the vector). First numerous tick experimental infections were conducted to isolate the sporozoites from the tick transmitting organ, the salivary glands. Even if no parasite could be isolated for *B. divergens*, the identification of sporozoites from another species *B. sp. EU1* inside *I. ricinus* confirmed that the developed methods were appropriate. Concerning the gametocyte, genes, that are conserved among the Apicomplexa and specific of sexual stages, were selected in *P. falciparum* genome by bioinformatics. Three orthologs *bdccp1*, 2 & 3 were identified in *B. divergens* and their mRNA were proved to be present inside the intraerythrocytic parasite population. The study of one of the corresponding proteins, BdCCp2, using immune sera directed against recombinant peptides, confirm the existence of *B. divergens*' sexual stages inside tick gut. Produced tools and methods will allow the acquisition of knowledge on *B. divergens*' transmission.