

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. SHUKRI SHARIF

le jeudi 21 juin 2018

Titre :

Stomoxys calcitrans: évaluation du rôle dans la transmission de Besnoitia besnoiti et nouveaux moyens de contrôle

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP)

Directeur(s) de Thèse :

M. PHILIPPE JACQUIET

M. EMMANUEL LIENARD

Rapporteurs :

M. BERTRAND LOSSON, UNIVERSITE DE LIEGE

M. PHILIPPE SOLANO, CIRAD MONTPELLIER

Membre(s) du jury :

M. GÉRARD DUVALLET, UNIVERSITE MONTPELLIER 3, Président

M. EMMANUEL LIENARD, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. FREDERIC BALDACCHINO, VETAGRO SUP LYON, Membre

M. JEAN-BAPTISTE RAYASSE, IRD BURKINA FASO, Membre

Mme SOPHIE THEVENON, CIRAD MONTPELLIER, Membre

M. PHILIPPE JACQUIET, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

Cette étude a été réalisée grâce :

- **À Dieu** qui nous a ouvert les portes du savoir et m'a aidé à terminer ce travail.
 - **À La Libye** qui m'a accordé l'opportunité de continuer mes études en France.
 - **À l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse**, qui m'a accueilli pendant ces années d'étude
-

Remerciements

Je tiens à témoigner ma gratitude aux membres de mon jury de soutenance de thèse.

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, **Monsieur Philippe, JACQUIET**, Professeur à L'ENV de Toulouse-France, pour m'avoir accueilli chaleureusement dans son équipe, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir initié au milieu de la recherche et donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Pour son soutien, son infini disponibilité quand il a fallu lire et relire encore et encore ma thèse ainsi que pour ses qualités humaines **veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.**

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-encadrant de thèse, **Monsieur Emmanuel LIENARD**, Docteur à l'ENV de Toulouse-France, pour son attention de tout instant, pour ses conseils avisés et son investissement inestimable qui m'ont permis de progresser, d'écrire et de finaliser ce travail. Pour cette amitié partagée que je n'oublierai pas même de retour en Lybie. **Tous mes remerciements** pour ses qualités professionnelles et humaines.

J'adresse mes vifs et sincères remerciements,

Á **Monsieur Bertrand LOSSON**, Professeur à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'université de Liège-Belgique, pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour avoir accepté d'être rapporteur dans mon jury de soutenance de thèse.

Á **Monsieur Philippe SOLANO**, Directeur de recherche au CIRAD-IRD de Montpellier-France, pour avoir pris le temps d'évaluer ce travail de thèse et m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de soutenance en tant que rapporteur.

Á **Monsieur Jean-Baptiste RAYAISSE**, Chercheur entomologiste au CIRDES de Bobo-Dioulasso au Burkina Faso, pour avoir porté un regard perspicace sur mon manuscrit et avoir bien voulu venir de si loin pour être examinateur de cette thèse.

Á **Madame Sophie THEVENON**, Docteur au CIRAD-IRD de Montpellier-France, pour avoir eu la gentillesse de lire ce travail et de le discuter. Merci d'accepter d'être présente pour juger de mon travail en tant qu'examinateur dans ce jury de soutenance.

Á **Monsieur Frédéric BALDACCHINO**, Docteur à l'ENSV de Marcy l'Etoile, France. Vous me faites l'honneur de participer au jury de ma thèse en tant qu'examinateur. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Recevez ici toute ma reconnaissance.

Á **Monsieur Gérard DUVALLET**, Professeur à l'université Paul-Valéry-Montpellier III, France, pour m'avoir enseigné l'art d'attraper des mouches. L'élève ne dépassera ici jamais le maître ! Tellement de merci pour tout. C'est un grand honneur pour moi de vous avoir comme examinateur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Michel FRANC, Professeur à l'ENV de Toulouse-France

Pour votre aide depuis mon arrivée au laboratoire. Vos remarques et commentaires qui m'ont aidé à progresser dans ce travail ainsi que votre enthousiasme, votre soutien. **Un grand merci** aussi pour votre générosité et vos qualités humaines

À Christelle GRISEZ et Françoise PREVOT,

Pour leur disponibilité .Pour m'avoir appris l'art des dilutions et de la PCR quantitative. Pour leur aide technique, leur bonne humeur et leur gentillesse. Je garde un excellent souvenir de mon travail à vos côtés **hommages respectueux**.

À Émilie BOUHSIRA

Pour son aide précieuse avec tous ses encouragements, Pour son écoute, ses conseils, j'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés, merci pour m'avoir toujours fait confiance en me, **Toute ma gratitude** et sentiments sincères.

À Martine ROQUES, et Sonia GOUNAUD,

Mes collègues. Pour leur aide, pour avoir été toujours disponible, pour leur ponctualité, leur patience, bienveillance et gentillesse, Pour m'avoir formé à l'élevage des stomoxes. Et surtout pour vos encouragements, votre soutien, votre amitié sans faille. Merci n'est pas assez pour **exprimer ma profonde gratitude**. Sans vous, ce travail n'aurait pas abouti.

À Monsieur Hamza LEULMI pour son aide et son écoute.

À Monsieur Patrick ROQUES pour son aide technique efficace et indispensable.

À mes collègues de travail, Hadrien, Aurélie, Marine, Christiane, Léa que ces années de thèse m'ont offert de rencontrer, de connaître et d'apprécier.

Je remercie le projet ANR Flyscreen pour avoir financé une partie de ce travail de thèse.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux personnes qui me sont les plus chères, mon épouse, mes enfants, très chère mère et mon père, mes frères, mes sœurs, ma belle-famille et mes chers amis. Je ne saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour leur sacrifice, tendresse et affection qu'ils ont toujours accomplis avec dévouement pour me permettre de réussir dans ma vie, je suis tellement reconnaissant de toutes les peines qu'ils se sont données pour mon moi, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1- Les modes de transmission des agents pathogènes aux animaux	3
2- <i>Stomoxys calcitrans</i> ou mouche charbonneuse	5
2-1-Position systématique	6
2-2-Morphologie générale de <i>Stomoxys calcitrans</i>	7
2-3-Bio-écologie	9
2-5-Importances économique et médicale	15
2-5-1-Importance économique	15
2-5-2-Importance médicale : les stomoxes, vecteurs d'agents pathogènes	17
2-5-2-1-Transmission de bactéries	18
2-5-2-2-Transmission de virus	18
2-5-2-3-Transmission d'helminthes	19
2-5-2-4-Transmission de protozoaires	20
2-6-Dynamique saisonnière des populations de stomoxes	20
2-7-Moyens de lutte	23
2-7-1-Lutte mécanique	23
2-7-1-1- Lutte contre les immatures ; gestion des lieux de reproduction	23
2-7-1-2- Lutte contre les adultes par le piégeage	23
2-7-2-Lutte chimique	25
2-7-3-Lutte biologique	27
3- La Besnoitiose bovine (<i>Besnoitia besnoiti</i>)	30
3-1-Présentation générale	30
3-2-Position Systématique	31
3-3-Morphologie des différents stades parasitaires	34
3-3-1-Tachyzoïtes	34
3-3-2- Bradyzoïtes	35
3-4- Cycle évolutif	37
3-5- Répartition géographique	38
3-6-Modalités d'infection	40
3-7-Facteurs de risque	44
3-8- Étude clinique	46
3-8-1 Occurrence épizootique ou enzootique de la besnoitiose bovine	46
3-8-2-Signes cliniques	47
3-8-2-1 -Phase aiguë : stade fébrile et des œdèmes	47
3-8-2-2 -Stade chronique (connu sous le nom de phase de sclérodermie)	52
3-9-Diagnostic	55
3-9-1- Diagnostic direct	55
3-9-1-1-Techniques d'histopathologie	55
3-9-1-2- Techniques moléculaires	56
3-9-2- Diagnostic indirect (tests sérologiques)	58
3-10- Moyens de lutte	60
OBJECTIFS ET PRESENTATION DU TRAVAIL	64
PARTIE EXPERIMENTALE	66

1-Chapitre 1 : Persistance de <i>B. besnoiti</i> chez <i>S. calcitrans</i>	66
1-1- Évaluation de la persistance des bradyzoïtes de <i>B. besnoiti</i> chez <i>S. calcitrans</i>	66
1-1-1-Présentation de l'élevage de <i>S. calcitrans</i>	66
1-1-2-Protocole expérimental	69
1-1-3 –Article: Assessment of persistence of <i>Besnoitia besnoiti</i> (Henry, 1913) bradyzoites in <i>Stomoxys calcitrans</i> (Diptera: Muscidae)	74
1-2 - Évaluation de la persistance des tachyzoïtes de <i>B. besnoiti</i> chez <i>S. calcitrans</i>	82
1-2-1 Source et préparation des tachyzoïtes	82
1-2-2- Modèle expérimental	84
1-2-3-Résultats	86
1-2-4-Discussion et conclusion	87
2- Chapitre 2 : Transmission vectorielle de <i>B. besnoiti</i>	89
2-1- Contexte et objectifs de l'étude	89
2-2- Transmission des bradyzoïtes de <i>B. besnoiti</i> aux lapins par <i>S. calcitrans</i>	90
2-3- Résultats supplémentaires : transmission de tachyzoïtes de <i>B. besnoiti</i> aux lapins par <i>S. calcitrans</i>	124
2-3-1-Matériel et méthodes	124
2-3-1-1 Origine des tachyzoïtes	124
2-3-1-2-Lapins	124
2-3-2-Protocole expérimental	124
2-3-3-Résultats	128
2-4- Discussion générale du chapitre 2	142
3- Chapitre 3 : nouvelles méthodes de lutte contre les stomoxes.	147
3-1-Attractivité des écrans bleus	147
3-1-1-Contexte et objectifs de l'étude	147
3-1-2- article en preparation	149
3-2-Observations complémentaires	176
3-2-1-Interactions stomoxes et écrans bleus imprégnés par la deltaméthrine	177
3-2-2-Activité insecticide des écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine	180
3-3- Conclusion générale du chapitre 3	185
CONCLUSION ET DISCUSSION GÉNÉRALE	187
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (HORS ARTICLES)	200
ABSTRACT	238

LISTE DES FIGURES

Figure 1: morphologie générale comparée de <i>S. calcitrans</i> (à gauche) et de <i>M. domestica</i> (à droite) (photo originale).....	9
Figure 2: cycle de vie de <i>S. calcitrans</i> (photo originale)	11
Figure 3: œuf de <i>S. calcitrans</i> , avant (A) et après (B) l'éclosion (Salem, 2012).....	12
Figure 4: extrémité antérieures d'une larve au stade III de <i>S. calcitrans</i> . (A) détail de l'extrémité antérieure, (stp) stigmates prothoraciques, (am) complexe antenno-maxillaire, (B) extrémité postérieure d'une larve au stade III de <i>S. calcitrans</i> (Salem, 2012).....	13
Figure 5: dynamique annuelle de la s population de <i>S. calcitrans</i> du campus de l'ENVT (Toulouse, France). En abscisse gauche, nombre total de stomoxes capturés dans cinq pièges Vavoua durant une journée par semaine pendant 12 mois (Jacquet et al., 2014). 22	
Figure 6: piège Nzi (photo originale)	29
Figure 7: piège Vavoua (photo originale)	29
Figure 8: Tachyzoïtes dans le sang (cellules endothéliales) (V. Shkap).....	36
Figure 9: A : coupe histologique de la peau montrant de nombreux kystes dans le derme (coloration immunohistochimique avec un anticorps polyclonal anti- <i>Besnoitia besnoiti</i>). B : kyste agrandi (× 400, coloration hemalun-éosine) (Photo : I. Raymond-Letron).....	37
Figure 10: les départements français où au moins un foyer de besnoitiose a été recensé au 1er décembre 2017.	40
Figure 11: Voies de transmission suspectées de la besnoitiose bovine (figure original).....	43
Figure 12: la phase aiguë de la besnoitiose : hyperthermie et larmolement, peau congestionnée, aspect zébré et hyperesthésie cutanée, plis de congestion et œdème marqué de la tête « tête d'hippopotame », des lésions congestive-hémorragiques sur la mamel. (Photos Jean-Pierre Alzieu et Philippe Jacquet)	50
Figure 13: la phase des œdèmes et de vascularite. (Photos Jean-Pierre Alzieu et Philippe Jacquet)	51
Figure 14: la phase de la sclérodermie avec hyperkératose et perte de poils peau épaissie, éléphantiasis (début de la phase chronique). (Photos Philippe Jacquet).....	52
Figure 15: phase chronique : sclérodermie avec kystes sur la sclère et le vestibule vaginal. (Photos : Jean-Pierre Alzieu et Philippe Jacquet).	54
Figure 16: possibilités de diagnostic expérimental en cas de besnoitiose (Alzieu et al., 2017).	60
Figure 17: cages BugDorm-1 d'élevage et de reproduction des <i>S. calcitrans</i> adultes (photo originale).	68
Figure 18: bacs d'élevage des œufs et larves de <i>S. calcitrans</i> (photos originales).	68
Figure 19: vaches infectées naturellement en phase chronique de la besnoitiose. (Photos Originales).....	69
Figure 20: positionnement des cages de stomoxes sur les vaches infectées par <i>Besnoitia besnoiti</i> (A), traces de piqûre des stomoxes après le repas de sang sur la vache (B) (Photos originale).	72
Figure 21: étuve contenant les flasques de culture de tachyzoïtes de <i>B. besnoiti</i> sur cellules Vero et préparation de solutions detachyzoïtes pour l'étude de la persistance. (Photos originales)	83
Figure 22: exposition des stomoxes au sang infecté aux tachyzoïtes. (Photos originales)	85

Figure 23: A. Exposition des mouches aux tachyzoïtes pendant 5 min. B. Transfert des mouches sur les lapins anesthésiés pendant 30 min. C. Lésions dues aux piqûres de stomoxes sur le flanc droit des lapins.(photos originales)	126
Figure 24: Sites de prélèvement des échantillons pour les tests de PCR quantitative et les examens histologiques et immunohistologiques. A. sites cutanés. B. sites de prélèvement des muqueuses et organes.	127
Figure 25: Variations des températures rectales des 3 lapins (T1, T2, T3) exposés aux tachyzoïtes de J-2 à J152 (en °C).....	130
Figure 26 : Évolution des poids des lapins 3 lapins (T1, T2, T3) exposés aux tachyzoïtes de J-2 à J152 (en kg).....	131
Figure 27: Profils hématologiques de J-2 à J147 des 2 lapins (T1, T2) exposés aux tachyzoïtes pour lesquels les données sont disponibles.	132
Figure 28:Cinétique des modifications du leucogramme de J-2 à J147 des 2 lapins (T1, T2) exposés aux tachyzoïtes pour lesquels les données sont disponibles.....	137
Figure 29: Profil partiel du Western Blot du lapin T3 de J-2 à J147 exposés aux piqûres de 300 stomoxes potentiellement porteurs de tachyzoïtes de <i>B. besnoiti</i>	141
Figure 30: répartition des stomoxes selon leur temps de pose sur l'écran bleu KLM3 imprégné de deltaméthrine (total des observations, N = 247 ; observations en matinée, N = 125 ; observations en fin d'après-midi, N = 122).	178
Figure 31: sites d'origine des deux populations de <i>Stomoxys calcitrans</i> étudiées.....	184
Figure 32: chambre d'anesthésie des stomoxes reliée à la bouteille de Co2 (à gauche), carrés de 15 cm de côté découpés dans les écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine sur lequel est effectué le test du contact trasal de 3 secondes (à droite).....	185

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: les dix espèces décrites du genre <i>Besnoitia</i> -----	33
Tableau 2: nombre d'équivalents de parasite détectés par qPCR dans les pièces buccales et contenus abdominaux des stomoxes-----	86
Tableau 3: nombre d'équivalents de parasite détectés par qPCR dans le sang receveur. -----	87
Tableau 4: observation microscopique de tachyzoïtes mobiles dans le sang receveur. -----	87
Tableau 5: Taux de gorgement et charge parasitaire des 3 lots de stomoxes exposés 5 min à du sang contenant 10^8 tachyzoïtes/mL. -----	128
Tableau 6: Nombre d'équivalents-parasites pour les échantillons cutanés et d'organes positifs par PCR quantitative pour l'ADN de <i>B. besnoiti</i> provenant du lapin T3. -----	142
Tableau 7: estimations des temps de pose des stomoxes sur les écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine. -----	179
Tableau 8: effet KD (% de mouches présentant un effet knock down) et le pourcentage de la mortalité à 24h post exposition à l'écran bleu ou au papier filtre dans les populations de stomoxes de l'ENVY et de Pamiers. -----	183

LISTE D'ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique.
AST	Aspartate transaminase.
ATSB	Attractive toxic sugar bait.
CK	Créatine kinase.
CT	Cycle threshold.
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique.
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay.
ENVT	École Nationale Vétérinaire de Toulouse.
FRGDS	Fédération régionale des groupements de défense sanitaire.
GMQ	Gains moyens quotidiens.
HB	Hémoglobine.
HT	Hématocrite.
IFAT	Immunofluorescence antibody test.
IFI	Immunofluorescence indirecte.
IGR	Régulateurs de croissance des insectes.
IHC	Immunohistochimie.
INRA	Institut national de la recherche agronomique.
KD	Knockdown.
KDR	Knockdown resistance.
IFI	Immunofluorescence indirecte.
IGR	Régulateurs de croissance des insectes.
IHC	Immunohistochimie.
LI	Larve de premier stade.
LII	Larve de deuxième stade.
LIII	Larve de troisième stade.

OMS	Organisation mondiale de la santé.
PBS	Phosphate buffered saline.
PE	Post exposure.
POSEIDOM	Programme d'Options Spécifiques à l'Éloignement et à l'Insularité des Départements français d'Outre-Mer.
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative.
RBC	Red blood cell.
WB	Western Blot.
WBC	White blood cell.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs décennies, nous assistons à l'émergence et la réémergence de plusieurs maladies zoonotiques ou non dont de nombreuses sont vectorielles c'est-à-dire transmises par des arthropodes vecteurs. Les maladies vectorielles attirent l'attention des médias et du public pour les atteintes en santé humaine ou animale et pour les conséquences économiques néfastes qu'elles entraînent. Des maladies vectorielles sévissant de façon endémique ou enzootique dans les zones tropicales et subtropicales ont déjà fait par le passé des incursions dans les régions tempérées. Faute de conditions favorables notamment de relais vectoriel (absence de vecteurs spécifiques, densité ou longévité trop faibles de vecteurs potentiels, incubation trop longue par rapport à la période d'activité vectorielle par exemple) dans ces aires nouvellement conquises, elles ne se sont pas durablement implantées. Si toutes les causes d'expansion ne sont pas encore clairement élucidées, les changements globaux sont invoqués à juste titre même comme facteurs autorisant l'expansion et l'installation pérenne dans de nouvelles zones. Ils incluent notamment le développement des échanges humains, animaux et commerciaux internationaux, les modifications des écosystèmes et les changements climatiques dont le réchauffement climatique.

Pour émerger et se répandre, une maladie vectorielle a besoin de trois acteurs dans un environnement donné et possiblement changeant : le(s) vecteur(s), l'(es) hôte(s) réceptif(s) et sensible(s) et l'agent pathogène. Les enjeux de recherche sont majeurs afin de mieux connaître et comprendre les interactions au sein de cette triade et les facteurs intrinsèques et environnementaux favorisant cette diffusion. Mais l'élaboration de ces stratégies de contrôle des maladies vectorielles repose largement sur la volonté des pouvoirs publics à soutenir et développer la recherche en entomologie médicale et vétérinaire.

Parmi les arthropodes hématophages d'importance médicale et vétérinaire figurent les insectes diptères Muscidae de la sous-famille des *Stomoxyinae*, souvent négligés au profit des moustiques ou des tiques. Or, ces diptères hématophages, et plus particulièrement *Stomoxys calcitrans*, ont un impact négatif considérable sur les animaux domestiques et sauvages (**Taylor et Berkebile, 2008**) par leurs piqûres douloureuses et action hématophage spoliatrice (**Campbell et al, 1977 ; Catangui et al, 1993**). En outre, on note une corrélation négative entre leur abondance et la quantité, la qualité du lait produit, ainsi qu'avec le gain de poids moyen quotidien chez les bovins. À cela, s'ajoute leur rôle vecteur (rôle indirect). Plus de 20 agents pathogènes (virus, bactéries et parasites) sont transmis par *S. calcitrans* comme le virus de l'anémie infectieuse équine, *Anaplasma marginale*, *Bacillus anthracis*, *Coxiella burnetii*, *Habronema microstoma*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, (**Baldacchino et al., 2013**). Comme souligné dans cette revue (**Baldacchino et al, 2013**), il demeure encore des incertitudes concernant la totalité du spectre des agents pathogènes potentiellement transmis par *S. calcitrans*. Son rôle notamment dans la réémergence et l'expansion en Europe d'une parasitose grave du bétail, la besnoitiose bovine due à un Apicomplexa, *Besnoitia besnoitia*, demeure encore à explorer plus profondément depuis les travaux de **Bigalke (1968)** et d'autres plus récents (**Salem, 2012 ; Liénard et al, 2013**).

1- Les modes de transmission des agents pathogènes aux animaux

La transmission est l'étape au cours de laquelle un microorganisme pathogène rencontre un nouvel hôte et l'infecte. Il existe trois modes de transmission principaux : **la transmission par contact direct**, la transmission par **un véhicule** et la transmission par un **vecteur** animal.

Le mode de transmission par contact **direct** est un mode de transmission qui se fait sans intermédiaire, de sujet à sujet (homme et/ou animal) ou par auto-infection. La transmission par **véhicule** est un mode de transmission par contact indirect, qui fait appel à un intermédiaire le plus souvent un objet inerte qui assure la propagation d'un agent pathogène d'un réservoir à un hôte. Cet objet est qualifié de vecteur passif, il peut être d'origine alimentaire (eau, aliments), aérienne (la transmission aérienne désigne la propagation des pathogènes par l'intermédiaire de gouttelettes entre le réservoir et l'hôte) ou bien réalisant une inoculation chez l'hôte (aiguille...).

La **transmission vectorielle** est un mode de transmission indirect qui nécessite le recours à un vecteur. Un vecteur par définition est un arthropode hématophage qui assure la transmission biologique et/ou mécanique active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré. **La transmission active** signifie que le vecteur infecté sur un premier vertébré porteur de l'agent pathogène, doit pour des raisons biologiques, établir activement le contact entre cet agent (virus, bactéries ou parasites) et un nouvel hôte réceptif. Les arthropodes sont des invertébrés qui regroupent plus de 80% de toutes les espèces animales connues et comprennent plus d'espèces que les autres embranchements. Plus d'un million d'entre elles ont été décrites et des centaines de milliers ou plus seraient en attente de découverte et de description (**Wall et Shearer, 2001**). Nous pouvons classer les arthropodes d'importance médicale et vétérinaire en deux grandes catégories :

- ✓ **Les arthropodes à rôle pathogène direct** : ils sont directement responsables d'une maladie :
- Les arthropodes parasites, comme les agents des myiases et les acariens agents des gales.
 - Les arthropodes venimeux, comme les scorpions, les araignées et les hyménoptères (abeilles, guêpes), ainsi que les arthropodes urticants et/ou allergisants, dont le contact peut être à l'origine d'éruptions ou d'accidents allergiques.
- ✓ **Les arthropodes à rôle vectoriel** : ils sont impliqués dans la dissémination d'agents pathogènes selon deux modalités :
- La transmission mécanique : elle s'effectue de manière **passive**, sans évolution ou multiplication de l'agent pathogène dans le vecteur. L'agent pathogène peut avoir souillé les pièces buccales au cours d'un repas de sang ou être présent sur l'exosquelette, les pattes par exemple ou dans les fèces. Le vecteur transfère ensuite passivement l'agent pathogène à un nouvel hôte sain par inoculation (principe de l'aiguille souillée) ou par dépôt.
 - La transmission biologique : il y a une évolution obligatoire et nécessaire dans le vecteur de l'agent pathogène, avec ou sans multiplication sexuée ou asexuée. Le vecteur assure activement la transmission par exemple par la salive, au moment de la piqûre ou la morsure, ou encore par les excréments entre l'hôte infecté et le vertébré réceptif. Plusieurs protozoaires (dont les parasites du genre *Plasmodium* responsables du paludisme) et des helminthes parasites effectuent une partie de leur cycle de développement dans un insecte vecteur. Cet aspect du rôle médical des arthropodes domine largement le champ de l'entomologie médicale (**Nozais et al, 1996**).

2- *Stomoxys calcitrans* ou mouche charbonneuse

Le genre *Stomoxys* (Diptera : Muscidae), originaire de l'ancien monde (**Zumpt, 1973 ; Showler et Osbrink, 2015**), comprend 18 espèces, appelées vulgairement stomoxes (**Zumpt, 1973**). Parmi celles-ci, 17 ont une répartition tropicale, en grande majorité africaine ou asiatique ; douze espèces sont exclusivement africaines, quatre sont exclusivement asiatiques et une espèce, *Stomoxys sitiens* est signalée à la fois sur le continent africain et asiatique. Une seule espèce, *Stomoxys calcitrans*, associée au bétail et aux chevaux, est cosmopolite. Elle est bien présente en Europe (**Gregor et al., 2002**), où elle est incriminée dans la transmission de plusieurs agents pathogènes dont *Besnoitia besnoiti* (**Baldacchino et al., 2013**). *Stomoxys calcitrans* est plus connu sous le nom de mouche des étables (*stable fly* en anglais), mais également de mouche charbonneuse, en raison de son rôle dans la transmission mécanique de l'anthrax due à *Bacillus anthracis* (**Dsouli-Aymes et al., 2009**).

Ce sont des insectes hématophages obligatoires, certaines espèces de ce genre ont une forte importance économique pour le bétail et d'autres animaux à sang chaud dans de nombreuses parties du monde (**Baldacchino et al., 2013**). Les mâles et les femelles sont hématophages et ont un comportement agressif et persistant lorsqu'ils sont à la recherche d'un repas de sang sur un hôte ; ils peuvent même attaquer les humains en l'absence d'hôtes préférés. En plus de *S. calcitrans*, plusieurs autres mouches du genre *Stomoxys* harcèlent également les animaux domestiques, notamment *S. niger*, *S. sitiens* et *S. indicus* (**Wall et Shearer, 1997**). Il a été récemment démontré que *S. calcitrans* et *S. niger* prennent aussi des repas sucrés à partir de fleurs ou de fruits mûrs (**Muller et al., 2012**). Bien qu'ils soient très actifs et très abondants dans et autour des fermes d'élevage, ils peuvent également être nuisibles sur les plages côtières et dans les zones résidentielles proches des zones de production agricole (**Newson, 1977 ; Hogsette et al., 1987**).

2-1-Position systématique

Stomoxys calcitrans appartient au (Haseyama et al., 2015 ; Duvallet et al., 2017) :

Domaine des Eucaryotes (Eukaryota)

Règne Animal (Animalia)

Sous - Règne des Métazoaires (Metazoa)

Super Embranchement des Invertébrés (Invertebra)

Embranchement des Arthropodes (Arthropoda)

Sous-embranchement des Euarthropodes (Hexapoda/Mandibulata)

Super-classe des Mandibulates (Mandibulata)

Classe des Insectes (Insecta)

Sous-classe des ptérygotes (Pterygota)

Ordre des Diptères (Diptera)

Sous-ordre des Brachycères (Brachycera, section : Cyclorrhapha)

Famille des *Muscidae* (Elle comprend plus de 5000 espèces sur 200 genres)

Sous-famille des *Muscinae*

Tribu des Stomoxyni (10 genres et 51 espèces)

Genre *Stomoxys*

Espèce *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758).

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=35569>).

Le genre *Stomoxys* se distingue des autres genres des Stomoxyini par des palpes maxillaires mesurant approximativement un tiers du proboscis et par des antennes à arista ne portant des soies que sur la face dorsale. Le corps, de 3 à 10 mm de longueur, est légèrement velu à coloration terne. L'abdomen est grisâtre à jaunâtre avec des taches foncées irrégulières. Les 18 espèces du genre *Stomoxys* sont (Zumpt, 1973 ; Dsouli et al., 2011) ; 1- *S. calcitrans* (Linnaeus, 1758), 2- *S. boueti* Roubaud, 1911, 3- *S. indicus* Picard, 1908, 4- *S. inornatus* Grunberg, 1906, 5- *S. luteolus* Villeneuve, 1934, 6- *S. niger*, avec deux sous espèces *S. niger niger* Macquart, 1851 et *S. niger bilineatus* Grunberg, 1906, 7- *S. ocbrosoma* Speiser, 1910, 8- *S. omega* Newstead, 1907, 9- *S. pallidus* Rounaud, 1911, 10- *S. pullus* Austen, 1909, 11- *S. sitiens Rondani* Rondani, 1873, 12- *S. stigma* Van Emden, 1939, 13- *S. taeniatus* Bigot, 1888, 14- *S. transvittatus* Villeneuve, 1916, 15- *S. uruma* Shinonaga et Kano, 1966, 16- *S. varipes* Bezzi, 1907, 17- *S. xanthomelas* Rounaud, 1937, 18- *S. bengalensis* Picard, 1908.

2-2-Morphologie générale de *Stomoxys calcitrans*

Stomoxys calcitrans est une mouche de couleur grise généralement, mesurant de 4 à 8 mm de longueur, elle ressemble à la mouche domestique (*Musca domestica*) (Wall et Shearer, 2001). L'examen à l'œil nu permet néanmoins d'observer facilement les pièces buccales, très développées et dirigées vers l'avant (Figure 1). L'appareil buccal est de type piqueur, le proboscis, projeté vers l'avant, est composé de trois longues pièces fortement chitinisées, sclérifiées et non rétractiles : le labium ou lèvre inférieure ; le labre ou lèvre supérieure et l'hypopharynx, le tout formant deux tubes.

La salive est injectée dans le derme de l'hôte au travers de l'hypopharynx (tube le plus fin) tandis que le sang est aspiré par le tube le plus large représenté par le labre et la face dorsale de l'hypopharynx.

- Le thorax des stomoxes est marqué par la présence de quatre bandes dorsales sombres.
- L'abdomen, plus court et plus large que celui de *M. domestica*, est également gris avec trois bandes sur le deuxième et le troisième segment abdominal (au niveau de la face dorsale de l'abdomen des tâches noires arrondies : les patterns, et sur la face ventrale un trait noir discontinu à disposition médiane).
- L'aile, présentant des nervures très caractéristiques, et constitue un critère de diagnose des espèces de Muscidae (**Zumpt, 1973**). Les stomoxes ont des ailes hyalines, au repos, elles sont disposées en lettre V majuscule inversée au-dessus de l'abdomen (**Troncy, 1989**). La première cellule postérieure est rétrécie à l'extrémité comme chez tous les membres de la Sous-Famille des Stomoxyinae.
- L'appareil copulateur du mâle, porté par le cinquième segment, est replié sous la face ventrale de l'abdomen. Chez la femelle, les segments VI à VIII forment un tube télescopique appelé ovipositeur, replié au repos dans le 5^{ème} segment.
- Les yeux des femelles sont plus écartés que ceux des mâles

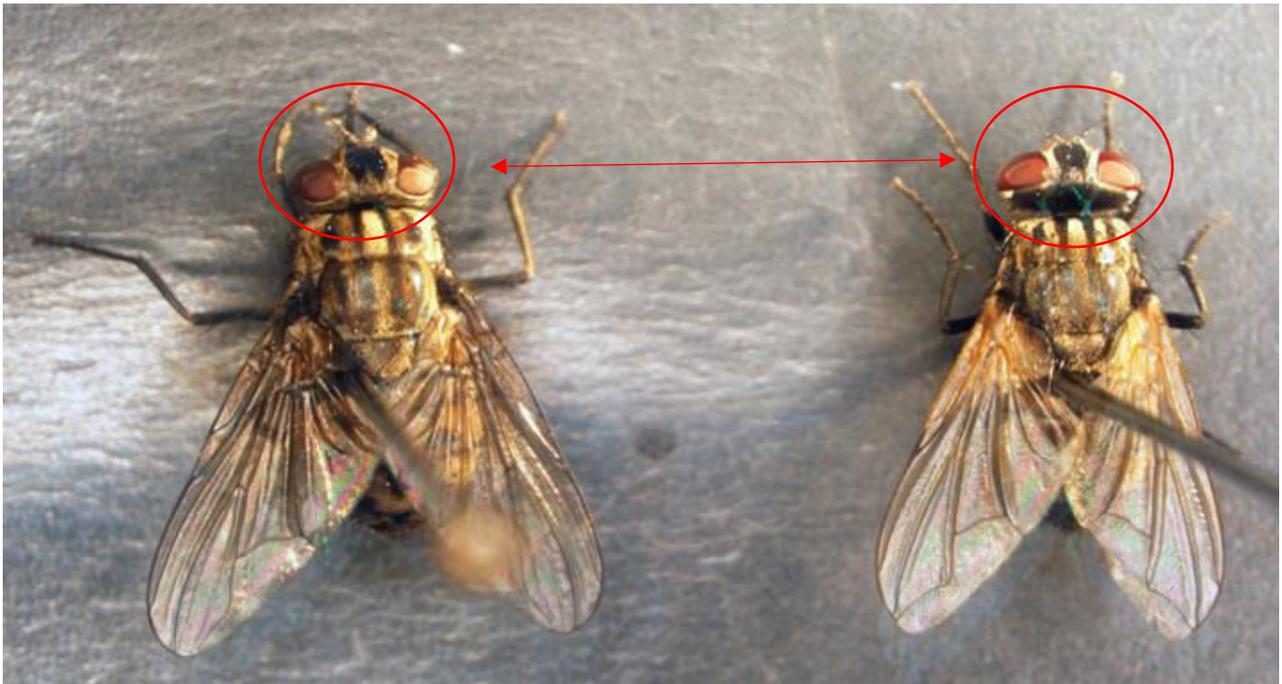


Figure 1: morphologie générale comparée de *S. calcitrans* (à gauche) et de *M. domestica* (à droite) (photo originale)

2-3-Bio-écologie

Dans la littérature, il y a bien plus de données sur *S. calcitrans* que sur les 17 autres espèces de stomoxes. *S. calcitrans* peut être abondant dans et autour des étables et des écuries. Nous rapportons ici le cycle évolutif de *S. calcitrans*. Le cycle de développement des stomoxes comprend six stades ; l'œuf, trois stades larvaires (diptère brachycère cyclorrhaphe), la nymphe et l'adulte (**Figure 2**). Les adultes des deux sexes sont hématophages et ingèrent souvent de petits repas de sang de différents hôtes plusieurs fois par jour (**Zumpt, 1973 ; Foil et Hogsette, 1994**). Les mouches d'étables peuvent doubler leur poids pendant la prise du repas sanguin (**Foil et Hogsette, 1994 ; Wall et Sherear, 2001**). Après un repas de sang qui dure 3 à 4 minutes voire 30 minutes selon l'espèce et la saison, les mouches se déplacent vers un site de repos, généralement sur des structures de bâtiments telles que des murs de grange, des clôtures ou sur de la végétation à proximité des étables (**Dougherty et al., 1995 ; Salem et al., 2012 ; Showler et Osbrink, 2015 ; Duvallet et al., 2017**). Les adultes, selon la saison, préfèrent avoir une

activité en plein air mais suivront les animaux dans les bâtiments pour se nourrir. Cette habitude explique le nom de la « *biting house fly* » qui est également appliquée à cet insecte. La ponte dans la paille humide, la litière d'étable en décomposition ou le fumier débute après que la femelle a pris quatre ou cinq premiers repas de sang. L'accouplement a lieu en vol ou lorsque les femelles sont au repos (**Duvallet et al., 2017**). Chaque femelle peut pondre jusqu'à 700 œufs au cours de sa vie, par lots de 25 à 50 œufs (**Lysyk, 1998**). Si elle est privée d'un repas de sang dans les premiers jours après l'émergence, le développement de l'ovaire est retardé et les femelles produisent moins d'œufs et sont de plus petite taille. Les larves se nourrissent de matières végétales. Les conditions optimales pour la pupaison sont l'obscurité complète et une température comprise entre 27°C et 30° C (**Duvallet et al., 2017**). Par temps chaud, le cycle de vie dure environ 4 semaines, mais il peut varier de 3 à 7 semaines, selon la température (**Lysyk, 1998**).

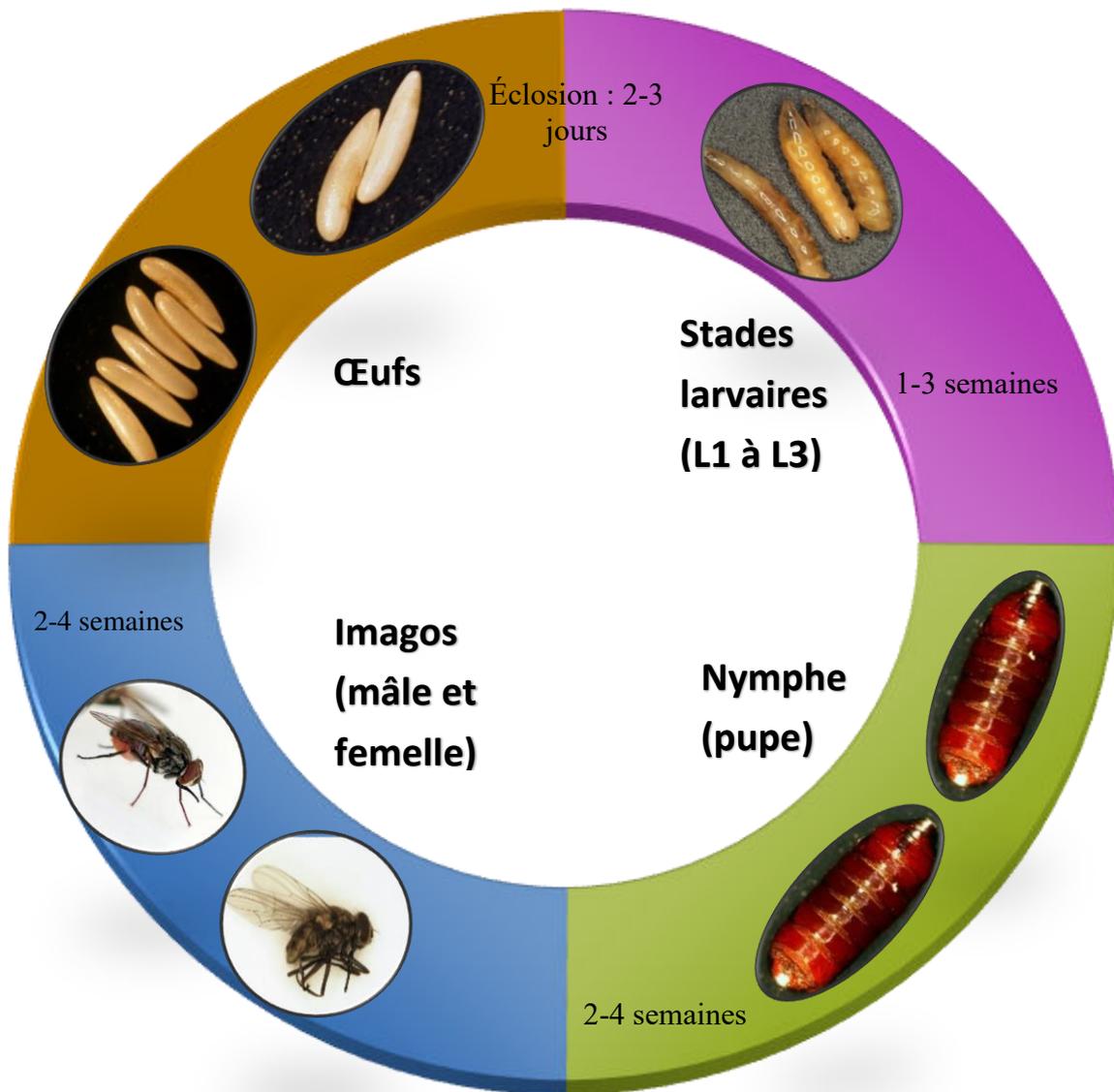


Figure 2: cycle de vie de *S. calcitrans* (photo originale)

- Œuf (Figure 3)

L'œuf pondu par *S. calcitrans* mesure 1 mm de longueur, il est blanchâtre, en forme de banane avec un sillon médian longitudinal (Zumpt, 1973 ; Hall et Smith, 1986). Le passage de l'œuf au stade larve 1 se fait en 28 heures à 22 °C et à 50 à 80 % d'humidité (Hoffman, 1968).



Figure 3: œuf de *S. calcitrans*, avant (A) et après (B) l'éclosion (Salem, 2012)

- Larves (Figure 4)

Trois stades larvaires se succèdent au cours du cycle biologique. Les larves sont de couleur blanchâtre ; elles sont caractérisées par des plaques stigmatiques postérieures plus au moins pentagonales sans péritrème net, avec un bouton central peu visible. Les fentes stigmatiques se présentent en forme de S (**Bussieras et Chermette, 1991**). La taille de la larve est de 1,5 mm (L1) à 11,5 mm (L3) de longueur. La larve comporte 12 segments visibles et un crochet buccal (**Zumpt, 1973; Peterson, 1960**).

Les larves en croissance sont actives et recherchent une température entre 15 et 30 °C et une humidité proche de la saturation (**Hafez et Gamal-Eddin, 1961**). Elles sont fortement attirées par les odeurs de fèces des chevaux et bovins et des produits chimiques comme l'ammoniac, le triméthylamine et l'acétone (**Hafez et Gamal-Eddin, 1961**). La durée de la mue de la L1 en L2 est de moins de 24 heures et celle de la mue L2-L3 est d'une journée dans les conditions optimales (**Parr, 1962**). Au stade L3, la taille de la larve varie de 4,4 à 12 mm de longueur selon les individus (**Figure 4**). La durée de vie des L3 est de 8 jours à 26 °C et 80 % d'humidité

durant l'été et plusieurs mois durant l'hiver (**Parr, 1962**). A l'approche de la pupaison, les larves préfèrent une humidité entre 75 et 83 % et une température entre 15 et 25°C (**Hafez et Gamal-Eddin, 1961**). Arrivées à maturité, les larves 3 s'immobilisent sous la matière organique en décomposition et dans le sol humide. Elles se tassent sur elles-mêmes, le tégument se durcit formant une enveloppe appelée puparium. Ce dernier renferme la nymphe qui va subir les modifications internes jusqu'à l'émergence d'un jeune imago (**Schofield et Brady, 1996**).

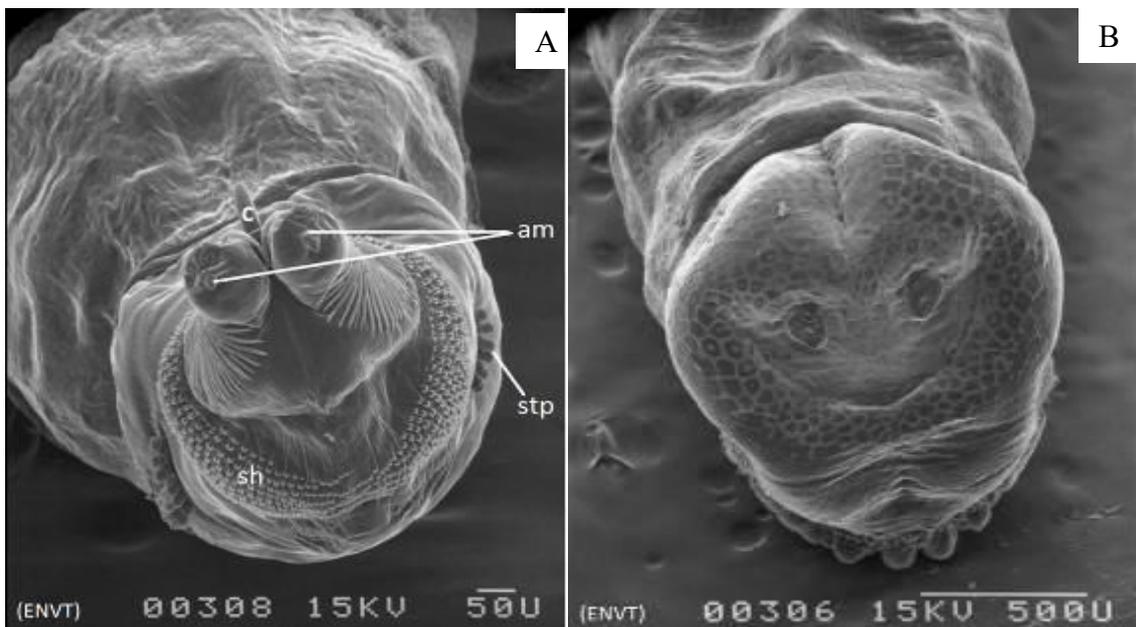


Figure 4: extrémité antérieures d'une larve au stade III de *S. calcitrans*. (A) détail de l'extrémité antérieure, (stp) stigmates prothoraciques, (am) complexe antenno-maxillaire, (sh) sclérite hypostomal, (B) extrémité postérieure d'une larve au stade III de *S. calcitrans* (Salem, 2012)

- La pupe

La pupe est de couleur rouge virant vers le noir et conserve les caractères morphologiques de la larve L3 (**Bussieras et Chermette, 1991**). Les pupes tolèrent des températures entre 20 et 30°C ; en dehors de cette gamme leur mortalité augmente (**Gilles et al., 2005**). La durée du stade pupal est de 6 à 26 jours à une température variant entre 21 et 26 °C (**Parr, 1962 ; Harwood et James, 1979**)

La durée moyenne pour passer de l'œuf à l'adulte est inversement proportionnelle à la température ; plus de 60 jours à 15 °C et moins de 12 jours à 30°C, la durée minimale du cycle étant observée à 31 °C (Lysyk, 1998). La survie des femelles et des mâles est maximale à 17 °C. Ainsi la moitié des stomoxes survivent plus de 30 jours à 15 °C, et moins de 6 jours à 35°C (Hafez et Gamal-Eddin, 1959).

2-4-Répartition géographique

D'après Zumpt (1973) et Dsouli-Aymes et al. (2011) :

1- *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) est une espèce cosmopolite, endo-exophile, qui se nourrit sur les bovins, chevaux, ânes, porcs, chèvres, mouton et chiens. Originaire de l'Ancien Monde, il a bénéficié des déplacements humains et du bétail pour se répandre dans le monde entier (Marquez et al., 2007). Elle a été signalée au Canada dès 1898 (Lysyk, 2011). Zumpt (1973) suggère une origine orientale de cette espèce. Cette hypothèse n'a pas été clairement démontrée ou infirmée par les apports récents de la génétique des populations combinant des marqueurs mitochondriaux et nucléaires (Dsouli-Aymes et al., 2011).

2- *S. boueti* Roubaud, 1911 : Bénin et Congo

3- *S. indicus* Picard, 1908 : régions orientales et territoires paléarctiques.

4- *S. inornatus* Grunberg, 1906 : régions de l'Afrique tropicale.

5- *S. luteolus* Villeneuve, 1934 : Afrique centrale et de l'ouest.

6- *S. niger*, *S. niger niger* Macquart, 1851 : Éthiopie, *S. niger bilineatus* Grunberg, 1906 ; commune en région afro-tropicale, aussi bien en forêt dense humide qu'en savane, à l'exception des zones arides ou semi-arides. Elle a été introduite à Madagascar, à l'île de la Réunion et à l'île Maurice, où elle peut être très abondante et coexister avec *S. calcitrans*, aux îles du Cap-Vert et aux Canaries.

- 7- *S. obrosoma* Speiser, 1910 : Afrique centrale et de l'ouest.
- 8- *S. omega* Newstead, 1907 : région éthiopienne
- 9- *S. pallidus* Rounaud, 1911 : Afrique tropicale.
- 10- *S. pullus* Austen, 1909 : Inde
- 11- *S. sitiens* Rondani, 1873 : on la trouve dans la région afro tropicale, y compris l'Égypte, et la région orientale (Sud de l'Inde, Sri Lanka, Birmanie, Laos, Malaisie, sud de la Chine, Taiwan et Philippines).
- 12- *S. stigma* Van Emden, 1939 : Uganda et le Congo
- 13- *S. taeniatus* Bigot, 1888 : région éthiopienne.
- 14- *S. transvittatus* Villeneuve, 1916 : Afrique centrale et du sud.
- 15- *S. uruma* Shinonaga et Kano, 1966 : région orientale.
- 16- *S. varipes* Bezzi, 1907 : Afrique orientale et centrale jusqu'au Zimbabwe.
- 17- *S. xanthomelas* Roubaud, 1937 : Congo, Tanzanie et Ouganda.
- 18- *S. bengalensis* Picard, 1908 : région orientale : de l'Inde à Java.

2-5-Importances économique et médicale

2-5-1-Importance économique

Les piqûres incessantes des stomoxes sont très douloureuses, la salive étant dépourvue de molécules anesthésiantes (**Cortinas et Jones, 2006**). Cette piqûre douloureuse perturbe les animaux et peut entraîner une diminution du temps de pâture (**Hall et al., 1983**) et un stress dont découle un affaiblissement des défenses immunitaires et des capacités de production. La

diminution de la quantité d'aliment ingéré et la dépense d'énergie nécessaire pour repousser les stomoxes contribuent largement à ces pertes de production. L'effet est particulièrement visible dans une exploitation de bovins laitiers par la réduction de la quantité de lait produite et de sa teneur en matière grasse. Une diminution de 0,7% de production par stomoxe et par vache ainsi qu'une diminution de 0,65% du taux butyreux ont été estimées dans l'Illinois, en été, ces effets persistant des semaines voire des mois après la période de vol des stomoxes (**Bruce, 1958**). Pour les bovins à viande, des réductions de gains moyens quotidiens (G.M.Q.) de l'ordre de 20 à 600 g par animal sont rapportées par différents auteurs (**Campbell et al., 1977 ; Berry et al., 1983 ; Campbell et al., 1987 ; Catangui et al., 1997 ; Campbell et al., 2001**).

Ces pertes peuvent dans une certaine mesure être compensées par une ration plus énergétique. Des infestations en milieu contrôlé sur des génisses à l'engraissement ont montré une diminution de 20% du gain moyen quotidien des animaux infestés par environ 100 stomoxes par rapport au lot témoin (**Campbell et al., 1977**). Le seuil de rentabilité d'un traitement antiparasitaire sur des veaux à l'engraissement a été estimé à six *S. calcitrans* par animal observés à un instant t (**Campbell et al., 1987**). Le seuil d'impact économique a été estimé à environ 25 *S. calcitrans* / animal / jour (**Steelman, 1976**). Aux États-Unis, l'impact économique de *S. calcitrans* a été estimé à plus de 400 millions de dollars par an pour la filière viande bovine (**Dougherty et al., 1995 ; Taylor et Berkebile., 2006**) et à plus d'un milliard de dollars pour la filière lait (**Roeder et Bolton, 2007 ; Taylor et al., 2012**). La persistance de la pression parasitaire peut être responsable de la mort de l'animal si celui-ci n'est plus en mesure de se protéger. Une mortalité particulièrement importante a été notée sur le bétail réunionnais suite au passage du cyclone Hyacinthe en 1981 en même temps qu'une pullulation particulière des stomoxes pendant cette période. Les causes de mortalités classiques n'expliquant qu'une partie des cas, le rôle des stomoxes dans cet épisode de mortalité n'est certainement pas négligeable (**Barré, 1981**). En forte période d'infestation, il est possible d'observer :

- chez les bovins : des blessures des membres résultant directement des piqûres ou suite à des coups d'onglons que l'animal s'inflige en essayant de chasser les mouches avec les membres postérieurs (**Kunz et Monty, 1976**).

- chez les chevaux : les piqûres provoquent des papules sur les membres antérieurs qui aboutissent à la formation d'œdèmes dans les parties inférieures du membre (**Pascoe, 1993**).

2-5-2-Importance médicale : les stomoxes, vecteurs d'agents pathogènes

Les repas de sang des stomoxes sont très souvent interrompus ce qui amène fréquemment des changements d'hôtes avant complétion du repas. Ce mode d'alimentation joue un rôle important dans la transmission mécanique des agents pathogènes d'un animal à un autre par l'intermédiaire des pièces buccales souillées (**Leclercq, 1971 ; Zumpt, 1973 ; Rhodain et Pérez, 1985**). Ces pièces buccales retiennent une petite quantité de sang entre chaque repas (0,4 nl) (**Scoles et al., 2005**). Or, les insectes hématophages régurgitent le contenu de leurs pièces buccales lors d'un nouveau repas de sang ce qui a pour effet de favoriser la transmission des agents pathogènes chez le nouvel hôte, phénomène démontré chez *S. calcitrans* par marquage radioactif (**Zumpt, 1973 ; Butler et al., 1977 ; Foil et Gorham, 2000**).

2-5-2-1-Transmission de bactéries

S. calcitrans peut transmettre *Bacillus anthracis*, agent causal de la fièvre charbonneuse d'un hôte à un autre : ovin, caprin, bovin, équin, carnivore, porc, homme (**Turell et Knudson, 1987 ; Chantal, 1997**).

Les stomoxes sont aussi vecteurs de rickettsies comme *Anaplasma marginale* (**Foil et Gorham, 2000 ; Scoles, 2005**).

Dermatophilus congolensis, agent de la dermatophilose des ruminants (**Foil et Gorham, 2000**), peut être transmis par les stomoxes adultes. Les lésions occasionnées par les piqûres de stomoxes peuvent favoriser la multiplication de cette bactérie au point d'inoculation (**Lefèvre et al., 2003 ; Ahmed et al., 2005**).

L'ADN d'autres bactéries a été détecté chez les stomoxes, mais aucune preuve expérimentale ou *in vivo* d'une telle transmission vectorielle de ces bactéries par les stomoxes n'a été recueillie à ce jour. À titre d'exemples, nous pouvons citer *Coxiella burnetii* (**Nelder et al., 2008**), *Mycobacterium fortuitum* et *M. scrofulaceum* (**Fischer et al., 2001**), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Francisella tularensis* (**Krinsky , 1976**), *Bartonella henselae* (**Chung et al., 2004**), *Campylobacter* spp. (**Szalanski et al., 2004**), *Escherichia coli* (**Rochon et al., 2004 ; 2005**), *Enterobacter sakazakii* (**Mramba et al., 2007**) et *Mycoplasma suis* (**Prullage et al., 1993**).

2-5-2-2-Transmission de virus

Les stomoxes peuvent également transmettre des virus comme celui de la dermatose nodulaire contagieuse des bovins (**Hoch et al., 1985 ; Kahana-Sutin et al., 2017**), de l'anémie infectieuse équine (**Lentivirus - F. Retrovirida**) (**Foil et al., 1983 ; Eigen et al., 2002**), de la leucose bovine enzootique (**Deltarétrovirus – F. Retroviridae**) (**Buxton et al., 1985**), de la fièvre de la Vallée du Rift (**Phlebovirus - F. Bunyaviridae**) (**Hoch et al., 1985**), de la peste

porcine africaine (**Pestivirus - F. Flaviridae**) (Mellor et al., 1987), de la variole caprine à **Capripoxvirus (F. Poxviridae)** (Mellor et al., 1987), de la diarrhée virale bovine à Pestivirus (**F. Flaviridae**) (Tarry et al., 1991) et vraisemblablement de la fièvre West Nile (**F. Flaviridae**) (Johnson et al., 2010 ; Doyle et al., 2011).

2-5-2-3-Transmission d'helminthes

Stomoxys calcitrans est un hôte intermédiaire de *Habronema microstoma* (Nematoda : Spirurida) parasite de la muqueuse stomacale des chevaux (Bussieras et Chermette, 1995). Les larves de stomoxes ingèrent les larves 1 (L1) du nématode *H. microstoma* qui sont éliminées avec les crottins des équidés dans l'environnement. Il y a une évolution parallèle et synchrone entre les formes immatures de *S. calcitrans* et les 3 stades larvaires d'*H. microstoma* pour aboutir à une L3 au stade imaginal du stomoxe. La L3 est formée en 20 jours environ et gagne le labium du stomoxe adulte. Le stomoxe n'inocule pas les L3 lors d'un repas de sang. Lorsqu'il se pose sur les lèvres d'un cheval, les L3 quittent activement le labium, gagnent les lèvres puis la cavité buccale. Elles sont avalées et acquièrent la maturité sexuelle après deux mues dans l'estomac du cheval. Lorsque le stomoxe se pose sur une plaie, les larves peuvent alors évoluer localement. Les lésions observées sont alors bourgeonnantes, granuleuses, prurigineuses et récidivantes à la belle saison (plaies d'été ou « summer sores ») : il s'agit de l'habronémose cutanée ou « mal d'âne » (Rebhun, 1996 ; Ahmed et al., 2005 ; Traversa et al., 2008).

Stomoxys calcitrans est également un hôte phorétique d'autres arthropodes. Il peut transporter des œufs de *Dermatobia hominis*, agent d'une myiase cutanée chez de nombreux mammifères en Amérique latine. Cette mouche attrape le stomoxe en plein vol pour y déposer sa ponte. Le stomoxe assure ainsi le transport de 15 à 20 œufs permettant l'infestation de vertébrés à sang chaud (herbivores, humains, rongeurs oiseaux) (Rodriguez et Leite, 1997 ; Da Silva Junior

et al., 1999). Il peut véhiculer également par exemple des acariens comme *Macrocheles muscaedomesticae* et *Macrocheles subbadius* (Beresford et Sutcliffe, 2009).

2-5-2-4-Transmission de protozoaires

Les stomoxes sont connus comme vecteurs mécaniques de trypanosomes comme *Trypanosoma vivax* (Zumpt, 1973 ; Carn, 1996 ; D'Amico et al., 1996 ; Jones et Davila, 2001 ; Veer et al., 2002) et *Trypanosoma evansi* qui atteint une grande variété d'hôtes (bovidés, équidés, camélidés, porcins, chat chien). Des cas de trypanosomose à *T. evansi* ont été observés dans l'Aveyron sur des dromadaires importés des Iles Canaries en 2006 (Desquesnes et al., 2008 ; Salem, 2012).

Il est à noter que les stomoxes seraient incriminés dans la transmission mécanique de *Besnoitia besnoiti* agent de la besnoitiose bovine (Bigalke, 1968 ; Liénard et al, 2013).

2-6-Dynamique saisonnière des populations de stomoxes

Les données publiées concernant la dynamique saisonnière des populations de mouches d'étables sont limitées et concernent le Danemark (Skovgard et Nachman, 2012), la Nouvelle Zélande (Heath, 2002), le Brésil (Rodriguez et al., 2005), l'Éthiopie (Sinshaw et al., 2006), la Thaïlande (Masmeatathip et al., 2006; Keawrayp et al., 2012), l'île de la Réunion (Gilles, 2005), les États-Unis (Taylor et al., 2007 ; Taylor et al., 2012) et la France (Jacquet et al., 2014). Sur l'île de la Réunion, les variations d'abondance de deux espèces de stomoxes, *S. calcitrans* et *S. niger*, ont été étudiées selon l'altitude et la saison (Gilles, 2005). Sur cette île, les variations saisonnières sont plus marquées quand l'altitude augmente. L'hiver de l'hémisphère sud (juillet à septembre) montre des abondances plus faibles que le reste de l'année. Au printemps, une augmentation rapide de la population est observée qui perdure

jusqu'en été (de décembre à mars) pour atteindre un pic. En automne, une diminution régulière des populations est enregistrée jusqu'à l'hiver (Gilles, 2005). De janvier à décembre 2009, la dynamique saisonnière d'une population de *S. calcitrans* a été évaluée à l'aide de pièges Vavoua dans une zone péri-urbaine (Europe de l'ouest, zone tempérée) du sud-ouest de la France (campus de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse) où des pâtures utilisées par des chevaux et des bovins sont présentes (Figure 5). La dynamique saisonnière des populations de stomoxes était bimodale avec deux pics d'activité au début de l'été et en automne (Jacquet et al., 2014). L'activité des stomoxes était nulle en hiver et très faible au cœur de l'été. Les variations de la température minimale journalière ont permis d'expliquer 38% de la variation des captures et une valeur minimale de 15°C était nécessaire pour observer une activité significative avec les pièges Vavoua. En revanche, la pluviométrie dans les semaines qui précèdent les captures, la vitesse du vent, la durée d'ensoleillement et le pourcentage d'humidité ne semblent pas avoir d'effets majeurs sur la totalité de la période considérée (Jacquet et al., 2014). Taylor et al. (2007) ont étudié la dynamique de population de *S. calcitrans* au Nebraska durant cinq années successives. Les premières captures de stomoxes ont lieu fin mars-début avril. Un premier pic de population apparaît fin juin-début juillet, puis le nombre de stomoxes diminue à la fin de l'été, pour augmenter à nouveau mi-septembre pour former un second pic (Taylor et al., 2007), ce qui est très similaire à ce qui est retrouvé dans le sud-ouest de la France. Dans la même zone, l'influence de la température et des précipitations sur la dynamique des populations de *S. calcitrans*, a été évaluée dans une étude portant sur 13 années de capture dans l'est du Nebraska. Au cours de cette étude, plus de 1,7 million de stomoxes ont été capturés avec des pièges collants. Ils ont trouvé que la précipitation a un effet significatif sur la dynamique saisonnière des stomoxes avec une activité maximale entre juin et juillet (Taylor et al., 2017).

En Thaïlande (zone tropicale), l'activité saisonnière mais aussi quotidienne de *S. calcitrans* a été étudiée pendant une période de 1 an en 2010, dans deux sites sélectionnés. *Stomoxys calcitrans* était plus abondante pendant la saison des pluies (mars-septembre), mais les niveaux de capture n'étaient pas associés aux précipitations totales. Le pic d'activité quotidienne des mâles de *S. calcitrans* était compris entre 10 et 16 h, alors que les femelles ont montré une augmentation d'activité tout au long de la journée jusqu'à 16 h (Muenworn et al., 2010).

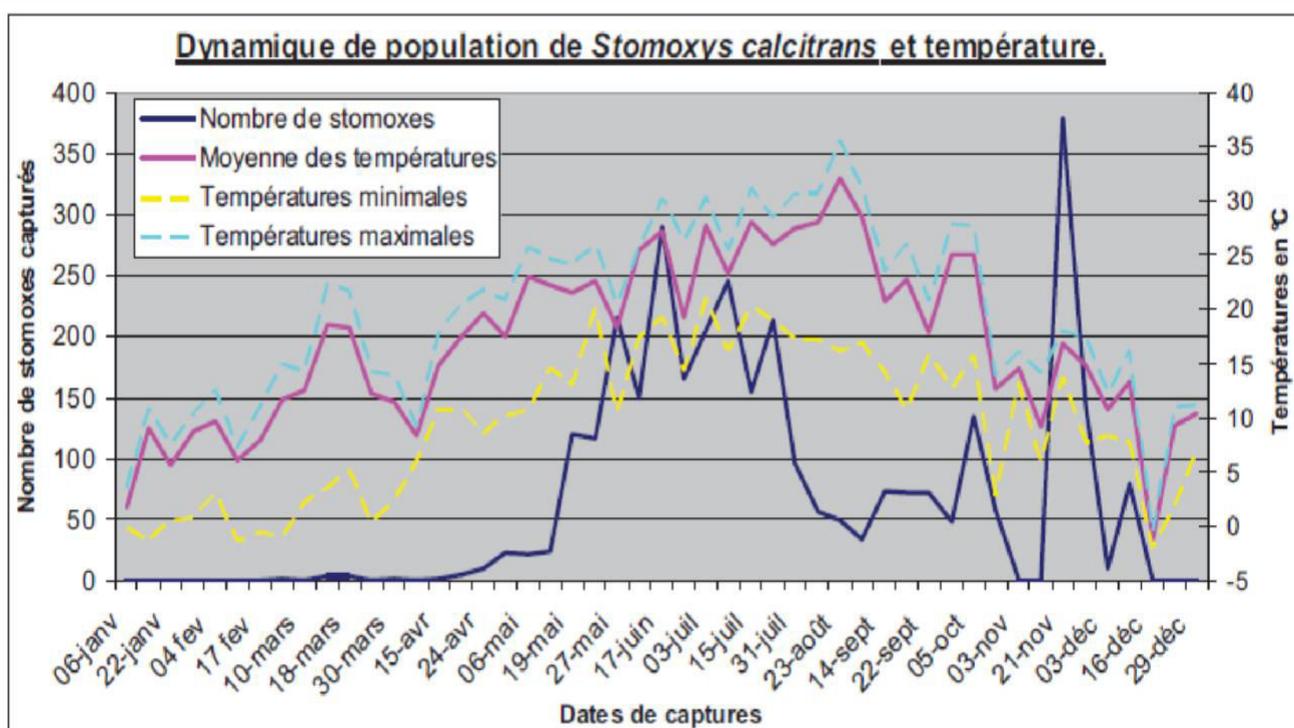


Figure 5: dynamique annuelle de la population de *S. calcitrans* du campus de l'ENVT (Toulouse, France). En abscisse gauche, nombre total de stomoxes capturés dans cinq pièges Vavoua durant une journée par semaine pendant 12 mois (Jacquet et al., 2014).

2-7-Moyens de lutte

De nombreuses méthodes de contrôle ont été testées contre les mouches d'étable, à savoir l'utilisation des insecticides ou d'appâts, le contrôle biologique et les techniques de stérilisation. Aucune méthode n'est complètement efficace à elle seule pour contrôler ces mouches, la combinaison de plusieurs d'entre elles en même temps est fortement recommandée, réalisant ainsi une lutte intégrée. Cette dernière repose sur deux axes :

- La lutte contre les stades larvaires (gestion des fumiers et assainissement de l'environnement, utilisation d'inhibiteurs de croissance ou d'insectes parasitoïdes etc...)
- La lutte contre les adultes (utilisation des insecticides, pièges mécaniques...).

2-7-1-Lutte mécanique

2-7-1-1- Lutte contre les immatures ; gestion des lieux de reproduction

Comme les sites larvaires les plus courants sont les tas de matière végétale en décomposition ou le fumier, l'assainissement de ces milieux peut réduire efficacement les populations de mouches dans les fermes d'élevage (**Duvallet et al., 2017**). Dans les installations pour animaux confinés (élevage en stabulation fermée), la priorité absolue devrait être d'éliminer autant que possible les sites de reproduction de ces mouches. Certains préconisent de recouvrir le tas de fumier avec un film de polyéthylène noir sous lequel l'élévation de température associée à un défaut d'oxygénation entraîne la mort des stades larvaires en développement (**Hogsette et al., 1987**).

2-7-1-2- Lutte contre les adultes par le piégeage

Les stomoxes adultes sont des insectes diurnes pour lesquels les pièges lumineux peuvent avoir un effet à l'intérieur des étables et des fermes (**Weidhaas et Haile, 1978**). Les stomoxes sont

attirés par certains stimuli olfactifs tels que le dioxyde de carbone, l'ammoniaque et les composés phénylpropanoïdes (Zhu et al., 2016). Ils sont également attirés par des stimuli visuels comme la lumière proche des rayons UV réfléchi par les fibres de verre Alsynite (Tarry et al., 1971 ; Agee et Patterson, 1983 ; Allan et al., 1987 ; Zhu et al., 2016). De nombreux types de pièges ont été testés pour étudier et contrôler les populations de stomoxes (Gilles et al., 2007). Müller et al ont étudié en 2012, l'attraction de 3 espèces du genre *Stomoxys* pour différents fruits et fleurs. Concernant *S. calcitrans*, un seul fruit *Piliostigma reticulatum* et 3 fleurs, notamment *Acacia albida*, se sont révélés attractifs dans les conditions de cette expérience (Müller et al., 2012). Des expériences sont maintenant effectuées pour évaluer l'association de la méthode *Attractive Toxic Sugar Bait* (ATSB) avec des dispositifs attractifs pour contrôler les mouches. L'objectif est de combiner des matériaux qui attirent les mouches d'étables (tissu bleu ou Alsynite) avec des appâts sucrés contenant un ou plusieurs insecticides afin de les tuer.

Les pièges sont des moyens de lutte mécanique, connus depuis longtemps, de par leur simplicité, leur faible coût et leur grande efficacité notamment contre les glossines.

Le Piège biconique, il s'agit d'un système de capture, à dispositif attractif surmonté d'une chambre grillagée dans laquelle le retour des mouches est impossible. Ces pièges ont été développés à la base pour lutter contre les glossines en Afrique et dans un second temps, ils ont été testés pour évaluer la dynamique saisonnière des populations de stomoxes. Les mouches entrent par des ouvertures ovales situées dans la partie bleue. Elles sont attirées grâce au contraste créé par la couleur noire du tissu intérieur. Ensuite, elles ont un trajet ascendant qui les mène vers la lumière mais aussi vers la cage de collecte, empêchant leur retour. Il existe aussi des pièges de type pyramidal **de Gouteux et Lancien**, il s'agit de pyramide de tulle moustiquaire blanc supportant deux écrans disposés en croix, l'un bleu, l'autre noir, dont la rigidité est assurée par quatre baguettes amovibles.

Le piège Nzi (Figure 6), très utilisé surtout contre les taons. Son dispositif est simple, basé sur des panneaux rectangulaires bleus et noirs, créant le fameux contraste attractif. Le corps du piège consiste en une configuration innovatrice du maillage de la moustiquaire. L'atout de ce piège réside dans la diversité des mouches qui y entrent puisque les Glossines et les Tabanidés se font prendre au piège. Les expériences menées sur terrain ont montré que ce piège n'est pas vraiment adapté aux captures et lutte contre les stomoxes (**Caroline Lantuejoul, vétérinaire GDS44, observation personnelle**).

Le piège Vavoua (Figure 7) est le piège le plus connu et plus utilisé pour le suivi de la dynamique saisonnière des populations de stomoxes (**Gilles et al., 2007 ; Jacquet et al., 2014**). Il dérive des pièges biconique et bipyramidal et se compose d'un cône supérieur fait de tulle moustiquaire blanche surmontant trois écrans (longueur 45 cm) cousus à 120° et faits d'une partie externe de couleur bleu et d'une partie interne noire (ratio bleu/noir = 2) (**Laveissière et Penchenier, 2005**). Ce piège, initialement conçu pour la capture des glossines en Afrique, a montré son efficacité dans la capture des stomoxes (**Mihok et al., 1995 ; Gilles et al., 2007**).

2-7-2-Lutte chimique

Le contrôle chimique des stomoxes comprend actuellement les régulateurs de croissance et les insecticides.

Les régulateurs de croissance des insectes (IGR) sont considérés comme des insecticides à faible risque de toxicité ; ils agissent sur les stades pré-imaginaux par des analogues de l'hormone juvénile ou par des inhibiteurs de la synthèse de la chitine. Les analogues de l'hormone juvénile empêchent l'éclosion des œufs et la transformation des L3 en pupes. Les molécules commercialisées en médecine vétérinaire sont le méthoprène, le pyriproxyfène et le fénoxycarbe (**Liu et al., 2012; Salem, 2012**). Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine agissent soit en bloquant la chitine synthétase soit en bloquant la synthèse des protéines de la

paroi (triazines, dérivés de la pyrimidine) ce qui dans les deux cas empêche l'éclosion des œufs ou bien l'acquisition d'une nouvelle paroi après une mue. Les produits commercialisés en agriculture ou en médecine vétérinaire sont le flufénoxuron, le triflumuron, le diflubenzuron, le lufénuron et la cyromazine (**Salem, 2012**).

Les principales familles d'insecticides sont : les pyréthrinoïdes, les organophosphorés, les carbamates, et aussi les néonicotinoïde, nicotinoïdes, spiroindoles, spirazolés, isozaxolines, lactones macrocycliques (**Salem, 2012**). Le contrôle des mouches d'étables adultes est réalisé principalement avec des insecticides topiques appliqués directement sur les animaux (**Baldacchino et al., 2013**). La sensibilité aux insecticides des populations de *S. calcitrans* a été testée aux États-Unis (Nebraska) pour la perméthrine, le stirofos ou le méthoxychlore, en utilisant trois techniques d'exposition : papiers filtres, boîtes de Pétri en verre traitées et applications topiques (**Marcon et al., 1997**). Les deux applications topiques et l'exposition résiduelle aux surfaces de verre traitées étaient appropriées pour tester la sensibilité des mouches d'étables. Le test de susceptibilité à la perméthrine en Floride a montré une faible résistance des mouches d'étables collectées dans une ferme laitière locale, mais après cinq générations de reproduction en laboratoire avec une exposition à des doses sub-létales de cet insecticide, cette population a commencé à montrer un phénotype de résistance (**Pitzer et al., 2010**). La résistance aux insecticides chez la mouche d'étable a déjà été démontrée, vis-à-vis des organochlorés et des organophosphorés ce qui a motivé les éleveurs à utiliser les pyréthrinoïdes. Mais des populations de *S. calcitrans* résistantes aux pyréthrinoïdes et / ou aux organophosphorés ont déjà été décrites en Amérique du Nord et en Europe (**Cilek et Greene, 1994 ; Pitzer et al., 2010 ; Salem et al., 2012**). **Salem et al. (2012)** ont ainsi montré qu'au moins une souche européenne de *S. calcitrans* était hautement résistante à cinq pyréthrinoïdes (cyperméthrine, deltaméthrine, fenvalerate, lamda-cyhalothrine et perméthrine). L'utilisation continue et/ou répétée d'un seul insecticide ou d'insecticides de la même famille entraîne donc

le développement d'une résistance et suscite de graves préoccupations pour la santé humaine et l'environnement (**Hieu et al., 2010 ; Zhu et al., 2012**). Ainsi, Il est probable que le mécanisme de résistance aux pyréthriinoïdes chez *S. calcitrans* est similaire à celui mis en œuvre par *Musca domestica*, à savoir une surexpression du gène *kdr* (Knockdown resistance) et une détoxification métabolique (**Pitzer et al., 2010**). **Olafson et al.** ont identifié une mutation ponctuelle chez la mouche d'étable associée à la résistance à la perméthrine, localisée dans le canal sodium (substitution d'une histidine à une leucine dans le domaine IS6 à IVS6, cette mutation a été dénommée *kdr-his* (**Olafson et al., 2011**).

Des efforts de recherche accrus ont été déployés pour utiliser des répulsifs naturels et non nocifs pour l'environnement, en particulier ceux à base d'huiles essentielles (**Hieu et al., 2015**). Plusieurs répulsifs végétaux, tels que l'huile de citronnelle, l'huile d'eucalyptus, l'huile de cataire et l'huile de zanthoxylum, ont déjà été testés contre les mouches d'étables et ont montré une réduction de l'attraction et de l'alimentation (réduction du nombre de piqûres et du pourcentage de stomoxes gorgés par conséquent) (**Zhu et al., 2009 ; Hieu et al., 2010 ; Hieu et al., 2015**). Ces répulsifs peuvent être appliqués par voie topique sur des animaux ou dans des étables (**Hieu et al., 2010**).

2-7-3-Lutte biologique

Le contrôle de *S. calcitrans* est principalement basé sur l'utilisation de produits chimiques. Avec le développement de résistances aux insecticides, le contrôle biologique a été proposé comme une alternative aux produits chimiques conventionnels.

La lutte biologique en général suppose une connaissance approfondie de l'écologie des vecteurs et de leurs ennemis naturels, parasites et prédateurs. L'ajout de bactéries entomopathogènes comme *Bacillus thuringiensis* produisant des toxines ou protoxines insecticides à la nourriture du bétail permet le contrôle des larves de *Musca domestica*, d'*Haematobia irritans* et surtout

de *S. calcitrans*, vivant dans les fumiers (**Lysyk et al., 2012**). L'utilisation d'insectes prédateurs de stomoxes, (les libellules par exemple) a montré son efficacité contre les stomoxes (**Leclercq, 1971**). Les hyménoptères parasitoïdes comme *Tachinaephagus stomoxicida* et *Spalangia nigroaenea* sont aussi adaptés et bien connus pour la lutte contre les mouches et les stomoxes dans les écuries et chez le bétail (**Squarzoni, 2001 ; Badelon, 2016**). Les guêpes parasitoïdes se tiennent dans la paille, déposent leurs pontes à l'intérieur des pupes puis leurs larves se nourrissent de la nymphe de stomoxe. Concernant l'utilisation du parasitoïde *T. stomoxicida*, il faut mettre en place des élevages de stomoxes infestés du parasitoïde et réaliser des lâchers sur le terrain de pupes de stomoxes infestées (**Squarzoni, 2001**). À la Réunion, un programme d'éradication des hémoparasitoses des bovins a été instauré en 1994 : le programme POSEIDOM (Programme d'Options Spécifiques à l'Éloignement et à l'Insularité des Départements français d'Outre-Mer). Ce programme comprenait une lutte contre les stomoxes par des lâchers massifs bimensuels de *S. nigroaenea*, parasitoïde des Muscidae. Toutefois, ce programme, très lourd à mettre en place et à maintenir dans le temps, a été abandonné il y a maintenant plusieurs années (**Badelon, 2016**).

La stérilisation des mouches adultes par les radiations gamma ou des substances chimiques stérilisantes est une méthode qui peut être considérée comme biologique ou génétique et vise à réduire les populations par des lâchers dans la nature d'un grand nombre d'individus mâles stériles s'accouplant avec des femelles sauvages (**Stuben, 1969, Campion, 1972**). Des expériences avec des effets favorables ont été relatées par **Offeri (1970)** pour *S. calcitrans*, mais étaient surtout appliquées aux glossines initialement. Depuis lors, aucune autre publication ne mentionne cette méthode de lutte pour les stomoxes.



Figure 6: piège Nzi (photo originale)



Figure 7: piège Vavoua (photo originale)

Une autre méthode utilise des nématodes entomopathogéniques associés à des champignons ou des bactéries pathogènes vis-à-vis des insectes. Cette méthode permet d'attaquer les larves des mouches soit avant leur pupaison soit au stade adulte, empêchant d'atteindre la maturité sexuelle. La prolifération de ce nématode dans l'insecte suivant son invasion est létale pour l'insecte. Lorsque le cadavre est épuisé en ressources, les nématodes et les organismes pathogènes qu'ils portent émergent et recherchent à nouveau un hôte à infecter (**Adler et Paul, 2012**).

Ainsi, le contrôle des populations de mouches d'étables (imagos et formes immatures) comprend ces diverses méthodes utilisées simultanément. Elle vise non seulement à prévenir les effets néfastes directs de leur pullulation mais aussi à empêcher ou limiter la transmission des agents pathogènes. Parmi ces derniers, il existe de fortes suspicions d'une transmission vectorielle de la besnoitiose bovine par *S. calcitrans* qui ont motivé ce travail de thèse dans le contexte d'expansion européenne de cette parasitose (**Cortes et al., 2014**). Le chapitre suivant est consacré à la présentation des connaissances actuelles sur *Besnoitia besnoiti* et la maladie qu'il induit chez les bovins.

3- La Besnoitiose bovine (*Besnoitia besnoiti*)

3-1-Présentation générale

La besnoitiose bovine, est une pathologie parasitaire causée par un protozoaire parasite intracellulaire formant des kystes tissulaires, *Besnoitia besnoiti* (**Besnoit et Robin, 1912**). Ce protozoaire est étroitement apparenté à d'autres parasites de la sous-famille des Toxoplasmatinae (comme *Neospora caninum* et *Toxoplasma gondii*). La maladie est répandue en Afrique, en Asie et dans le sud-ouest de l'Europe (**Jacquet et al., 2010 ; Gutiérrez-Expósito et al., 2017a**). Un cycle de vie hétéroxène est suspecté, mais l'hôte définitif reste encore inconnu (**Diesing et al, 1988**). C'est une maladie chronique, caractérisée par des signes

cliniques locaux et systémiques de sévérité variable, responsable de graves pertes économiques chez les bovins (**Frey et al., 2016**). Outre la dépréciation de l'état corporel et la réduction de la production laitière chez les vaches, les taureaux peuvent développer une infertilité passagère ou définitive et les femelles peuvent parfois avorter en raison d'une fièvre élevée et persistante sur plusieurs jours (**Álvarez-García et al., 2013b ; Cortés et al., 2014**).

La besnoitiose bovine est connue depuis l'antiquité. En 1884, Cadéac décrivait une maladie de la peau chez les bovins qu'il nommait éléphantiasis (**Cadéac, 1884**). Vingt-huit ans après, **Besnoit et Robin (1912)**, deux enseignants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, ont isolé pour la première fois le parasite responsable à partir des lésions cutanées et ont réalisé une description complète de la maladie. Besnoit et Robin ont découvert que la maladie décrite par Cadéac était causée par un parasite décrit comme une sarcosporidiose cutanée. Cependant, ils ont noté des différences morphologiques du parasite avec l'agent de la sarcosporidiose cutanée *Sarcocystis blanchardi* (= *Sarcocystis fusiformis*) : la seule espèce de *Sarcocystis* connue chez les bovins à l'époque (**Besnoit et Robin, 1912 ; Cortes et al., 2014**). La même année, deux articles ont commenté cette découverte (**Henry, 1912 ; Marotel, 1912**). Puis en 1916, Franco et Borges ont publié une étude épidémiologique et histologique de cette maladie du bétail au Portugal couvrant une période de 30 ans. Ils ont proposé le genre *Besnoitia* et nommé l'agent étiologique *Besnoitia besnoiti* (**Franco et Borges, 1916 : cité dans Cortes et al., 2014**).

3-2-Position Systématique

Domaine des Eucaryotes (Eukaryota)

Phylum des Apicomplexa

Ordre des Eucoccidioridae

Sous-ordre des Eimeriorinae

Famille des Sarcocystidae

Sous-famille des Toxoplasmatinae

Genre *Besnoitia* (Henry, 1913).

Le genre *Besnoitia* est un groupe monophylétique frère et très proche phylogéniquement de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* et des espèces du genre *Sarcocystis* (Ellis et al., 2000). Dix espèces sont décrites au sein du genre *Besnoitia* (Tableau 1), mais le statut taxonomique reste douteux pour certaines d'entre elles. Quatre espèces infectent les grands mammifères, *B. besnoiti*, *B. caprae*, *B. tarandi* et *B. bennetti* : respectivement chez les bovidés (bovins, gnous, antilopes) et de façon anecdotique le Chevreuil *Capreolus capreolus*, caprins, le renne (*Rangifer tarandus*) et les équidés (tableau 1). Six espèces infectent les petits mammifères (*B. wallacei*, *B. jelisoni*, *B. darlingi*, *B. akodoni*, *B. neotomofelis* et *B. oryctofelisi*) comme les opossums, lapins, rongeurs (Jacquet et al., 2010 ; Olias et al., 2011) (Tableau 1). Les lézards peuvent aussi être infectés (Garnham, 1966 ; Frank et Frenkel, 1981). La phylogénie du genre *Besnoitia* demeure encore peu connue, de même en ce qui concerne les caractéristiques génétiques, les cycles évolutifs et les descriptions morphologiques. Notre étude se limite à *Besnoitia besnoiti*, agent de la besnoitiose bovine connue en Europe, Afrique et Asie, une publication faisant mention de cas au Venezuela (Vogelsang et Gallo, 1941 cité par Jacquet et al., 2010), mais il semble que *B. besnoiti* ne soit pas implanté de façon pérenne dans le nouveau monde.

Tableau 1: les dix espèces décrites du genre *Besnoitia*

Espèce de <i>Besnoitia</i>	Hôtes intermédiaires	Hôtes définitifs	Distribution géographique	Références
<i>B. besnoiti</i>	Bovins, antilopes et gnous Chevreuil (accessoire)	Inconnu	Afrique, Asie, Europe (Venezuela)	Besnoit et Robin, 1912
<i>B. bennetti</i>	Âne, cheval et zèbre	Inconnu	Afrique, États-Unis et France	Bennett, 1927
<i>B. caprae</i>	Caprins	Inconnu	Iran et Kenya	Cheema et Toofanian, 1979
<i>B. tarandi</i>	Caribou, Bœuf musqué (suspicion), Cerf-mulet (suspicion), chevreuil (suspicion)	Inconnu	Canada, États-Unis, Finlande, Russie et Suède	Hadween, 1922
<i>B. akodoni</i>	<i>Akodon montensis</i> ¹	Inconnu	États-Unis	Dubey et al., 2003
<i>B. jellisoni</i>	<i>Dipodomys</i> spp. ¹ , <i>Peromyscus maniculatus</i> ¹	Inconnu	États-Unis	Frenkel, 1953
<i>B. darlingi</i>	<i>Ameiva</i> ² , <i>Basiliscus</i> ² , <i>Didelphis marsupialis</i> ³	Chat, Lynx	États-Unis et Panama	(Darling, 1910, Verma et al., 2017)
<i>B. neotomofelis</i>	<i>Neotoma micropus</i> ¹	Chat	États-Unis	Dubey et Yabsley, 2010
<i>B. oryctofelisi</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> ⁴	Chat	États-Unis et Argentine	Dubey et Lindsay, 2003
<i>B. wallacei</i>	<i>Rattus</i> sp ¹	Chat	Australie, Hawaii, Japon et Kenya	Wallace et Frenkel, 1975

(¹ rongeur ; ² reptile ; ³ marsupial ; ⁴ lagomorphe).

3-3-Morphologie des différents stades parasitaires

Deux stades parasitaires sont connus à ce jour :

3-3-1-Tachyzoïtes

Les tachyzoïtes envahissent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins où ils sont regroupés dans une vacuole parasitophore constituant ainsi un pseudo-kyste (**Álvarez-García et al., 2014a ; Alzieu et al., 2017a**). Ils peuvent aussi circuler libres dans le sang après la rupture de la cellule endothéliale hôte de façon transitoire mais peuvent aussi se multiplier dans les monocytes (**figure 8**), les neutrophiles et les hépatocytes (**Pols, 1954 ; Schares et al., 2009 ; Langenmayer et al., 2015b**). Les formes observées dans les cellules sont ovoïdes et mesurent environ $4 \times 2,5\mu\text{m}$. Les formes libres dans le sang sont en forme de croissant ou de banane avec une extrémité antérieure inclinée et une extrémité postérieure arrondie, elles mesurent de $6\mu\text{m}$ à $8\mu\text{m}$ de longueur et $2,5\mu\text{m}$ de largeur. Elles seraient la forme âgée de la forme initiale ovoïde intracellulaire (**Reis et al., 2006 ; Langenmayer et al., 2015b**). Son ultrastructure ressemble à celle déjà décrite pour d'autres protozoaires apicomplexes (**Dubey et al., 1998 ; Speer et al., 1999**) : entouré par une membrane vacuolaire parasitophore, le tachyzoïte possède tous les éléments caractéristiques des Apicomplexa : un conoïde au pôle apical, des micronèmes, des rhoptries, des granules denses et des mitochondries (**Cortes et al., 2006b**). Chez les tachyzoïtes, les granules d'amylopectine sont détectés sporadiquement et le noyau est situé au milieu ou dans le tiers postérieur du parasite. Les tachyzoïtes de *B. besnoiti* auraient un cycle identique aux autres Toxoplasmatinae qui comprend l'adhésion à la cellule hôte, la pénétration dans cette cellule, la multiplication intracellulaire et, enfin, la libération des nouveaux tachyzoïtes après lyse cellulaire (**Hemphill et al., 2006**).

3-3-2- Bradyzoïtes

Les bradyzoïtes sont les éléments observés dans les kystes tissulaires (**figure 9 A,B**) présents en phase chronique de la maladie et qui sont situés généralement dans le tissu conjonctif des bovins , principalement dans la peau et les muqueuses et dans d'autres localisations telles que les tendons, les tissus vasculaires, le tissu sclérotique, les voies respiratoires supérieures, les testicules et l'épididyme chez les mâles et le vestibule vaginal chez les femelles (**Basso et al., 2013 ; Frey et al., 2013a, b ; Langenmayer et al., 2015a ; Alzieu et al., 2017a**). Contrairement à d'autres Apicomplexa tels que *Neospora caninum* et *Toxoplasma gondii*, aucune information n'est connue sur le processus de la cystogenèse de *B. besnoiti*. Cependant, il a été souligné que les kystes tissulaires apparaissent de manière synchrone et que leur taille augmente à mesure que l'infection progresse (**Bigalke, 1968**). La multiplication des bradyzoïtes à l'intérieur des kystes est lente. Ils sont en forme de croissant et mesurent entre 5µm à 9µm de longueur et 2µm à 5µm de largeur. Le noyau n'est pas central, et se situe en général à une extrémité de la cellule. Les kystes à bradyzoïtes sont de couleur blanche et d'aspect brillant, et ont un diamètre supérieur à 600 µm lorsqu'ils sont parvenus à leur complet développement. Ils sont organisés en grappes et ils contiennent jusqu'à plus de 200 000 bradyzoïtes (**Bigalke, 1981 ; Olias et al., 2011**). Contrairement à d'autres Apicomplexa similaires, la paroi du kyste, qui entoure la cellule hôte, est constituée de deux couches : une couche externe contenant de multiples fibres de collagène entrelacées et une couche interne, formé par des protéoglycane et des extensions filamenteuses qui se projettent vers la membrane externe (**Langenmayer et al., 2015b**). Le cytoplasme de la cellule hôte apparaît déformé et contient le noyau et les différents organites cellulaires. La vacuole parasitophore est délimitée par une membrane de structure granulaire. À l'intérieur, de nombreux bradyzoïtes se trouvent à différents stades d'évolution (**Langenmayer et al., 2015b**). Les bradyzoïtes ont les mêmes organites que les tachyzoïtes. Cependant, ils ont une forme plus allongée et dans leur cytoplasme, il y a un plus

grand nombre de granules d'amylopectine. Aucune différence ultrastructurale n'a été observée entre les bradyzoïtes de *B. besnoiti*, *B. tarandi* et *B. bennetti* (Heydorn et al., 1984 ; Njenga et al., 1995 ; Dubey et Lindsay, 2003 ; Dubey et al., 2005). Les espèces de *Besnoitia* qui affectent les ongulés ne possèdent pas les structures électron-denses intracytoplasmiques liées à la membrane (appelées « corps énigmatiques »), présentes en revanche chez d'autres espèces de *Besnoitia* telles que *B. akodonti*, *B. jellisoni*, *B. darlingi*, *B. neotomofelis* et *B. oryctofelisi*. L'origine et la fonction de celles-ci sont encore inconnues (Dubey et al., 2005).



Figure 8: Tachyzoïtes dans le sang (cellules endothéliales) (V. Shkap).

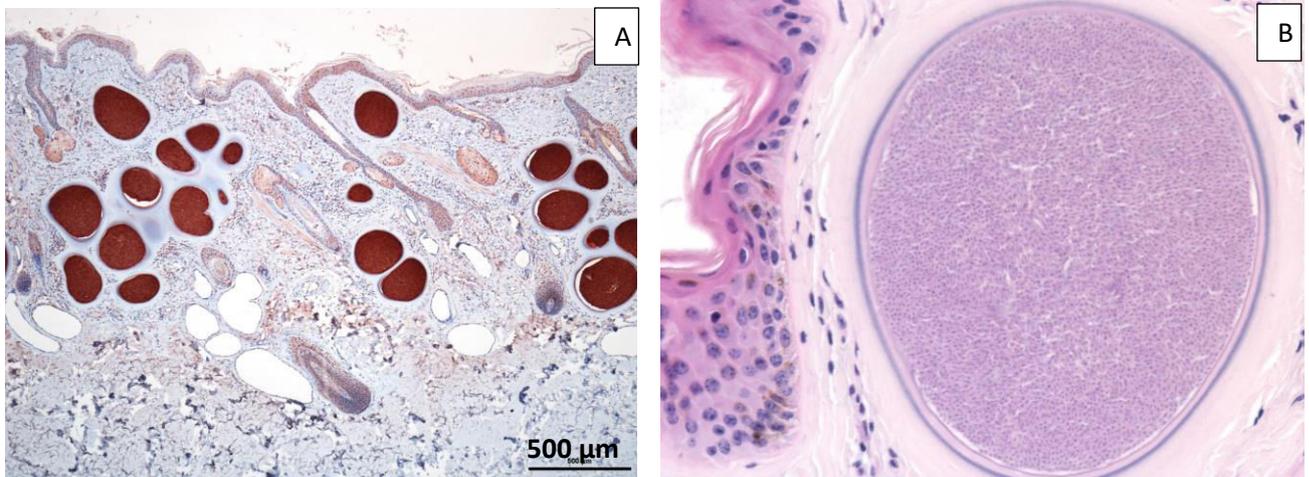


Figure 9: A : coupe histologique de la peau montrant de nombreux kystes dans le derme (coloration immunohistochimique avec un anticorps polyclonal anti-*Besnoitia besnoiti*). B : kyste agrandi ($\times 400$, coloration hemalun-éosine) (Photo : I. Raymond-Letron)

3-4- Cycle évolutif

À l'heure actuelle, le cycle biologique complet de *B. besnoiti* n'est pas connu, les seuls hôtes connus à ce jour étant les bovins (Pols, 1960), les antilopes et les gnous (Basson et al., 1965) qui joueraient tous le rôle d'hôtes intermédiaires. Ils hébergent les formes tachyzoïtes et les formes bradyzoïtes et manifestent les signes cliniques associés aux phases aiguë et chronique de la maladie. Les deux stades du parasite sont infectieux pour les hôtes intermédiaires, comme cela a été démontré dans plusieurs infections expérimentales (Pols, 1960 ; Bigalke et al., 1967 ; Bigalke, 1968 ; Diesing et al., 1988, ; Liénard et al., 2013). L'identité d'un éventuel hôte définitif de *B. besnoiti* reste inconnue (Diesing et al., 1988). Cela pourrait être un un carnivore sauvage, comme c'est le cas pour d'autres espèces du genre *Besnoitia* (*B. darlingi*, *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi* et *B. wallacei*) (Basso et al., 2011) (Tableau 1). Les travaux de

Peteshev et al. (1974) concluaient que les hôtes définitifs de *B. besnoiti* seraient le chat domestique *Felis silvestris catus* et le Chat sauvage d'Afrique *Felis silvestris lybica*. Ces chats ont ingéré des kystes dans des tissus d'une vache naturellement infectée et des oocystes ont été retrouvés dans leurs selles. Il existe une forte suspicion sur la nature réelle des ookystes observés par **Peteshev et al. (1974)**, probablement qu'il aurait pu s'agir de ceux de *T. gondii*. Malheureusement, au moment où cette étude a été réalisée, il n'y avait pas de techniques moléculaires disponibles pour les identifier génétiquement. **Rommel (1975)** a également observé que certains chiens et chats éliminaient des oocystes avec des fèces après l'ingestion de tissus contenant d'abondants kystes tissulaires de *B. besnoiti*. Cependant, ceux-ci n'étaient pas non plus caractérisés et leur identité n'a pu être déterminée. Enfin tous ces résultats n'ont jamais été confirmés ultérieurement, tous les essais d'infestations expérimentales de chats avec des bradyzoïtes de *B. besnoiti* ayant échoué (**Diesing et al., 1988 ; Basso et al., 2011**).

3-5- Répartition géographique

La besnoitiose bovine a été décrite en Afrique (**Hofmeyr, 1945**), où elle est largement distribuée dans les pays suivants : Angola, Botswana, Cameroun, Congo, Kenya, Namibie, Nigeria, Zimbabwe, Afrique du Sud, Soudan, Swaziland, Tanzanie et l'Ouganda (**Chatikobo et al., 2013**). **Olias et al. (2011)** rapportent également sa présence dans certaines régions d'Asie (Chine, Corée du Sud, Israël, Kazakhstan, Russie et Ouzbékistan) et au Venezuela. Pendant longtemps, la besnoitiose bovine a été limitée en Europe aux régions pyrénéennes de France et d'Espagne et à la région de l'Alentejo au Portugal (zones où la maladie est endémique) (**Besnoit et Robin, 1912 ; Franco et Borges, 1916 ; Bourdeau et al., 2004**). Cependant, au cours de ces vingt dernières années, la maladie s'est répandue dans le sud du Portugal (**Cortes et al., 2004, 2005, 2006 b, c ; Alzieu, 2007**) et dans de très nombreuses régions françaises

(**Jacquet et al., 2010**). En Espagne, la Sierra de Urbasa et Andía (Navarre) et la zone de Maestrazgo (Teruel) sont également considérés comme des zones où la besnoitiose bovine est devenue endémique (**Álvarez-García et al., 2013a**). De plus, ces dernières années, de nombreuses épizooties dans le centre et le nord de l'Espagne ainsi que dans les régions frontalières avec le Portugal ont été déclarées (**Fernández-García et al., 2010 ; Álvarez-García et al., 2013a**). Ces cas ont été initialement associés à l'achat d'animaux infectés dans des zones où la maladie était endémique. En Italie, en 1994, des bovins infectés importés de France ont été détectés positifs (**Agosti et al., 1994**) et depuis 2009, des foyers de la maladie ont été décrits dans la partie nord des Apennins (**Gentile et al., 2012**). De même, en Allemagne, des exploitations bovines de Bavière ont été affectées, probablement en raison de l'importation de bovins de race charolaise et limousine de France (**Majzoub et al., 2010 ; Rostaher et al., 2010**). La propagation de la maladie de la France vers l'Italie, l'Allemagne et la Suisse, a été principalement associée au commerce d'animaux infectés (**Olias et al., 2011 ; Lesser et al., 2012**). En 2013, les premiers cas de besnoitiose en Croatie ont été détectés chez des bovins (**Beck et al., 2013 ; Esteban-Gil et al., 2017**). La Hongrie a importé 178 animaux apparemment sains du sud de la France, certains d'entre eux ont développé la maladie une fois arrivés sur place et ont contaminé des bovins locaux (**Hornok et al., 2014**). D'autres pays méditerranéens tels que la Grèce, ont suspecté la présence de la maladie car des animaux séropositifs ont été détectés dans des fermes laitières qui abritaient des animaux provenant d'Allemagne, de France et des Pays-Bas. Cependant, aucun animal présentant des signes cliniques n'a été enregistré (**Papadopoulos et al., 2014**). Récemment, la Belgique (**Vanhoudt et al., 2015**) et l'Irlande (**Ryan et al., 2016**) ont signalé la présence de foyers de la maladie. La figure 10 présente les départements français où au moins un foyer de besnoitiose a été recensé au 1^{er} décembre 2017 (données collectées par les écoles vétérinaires françaises et le Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Ariège).

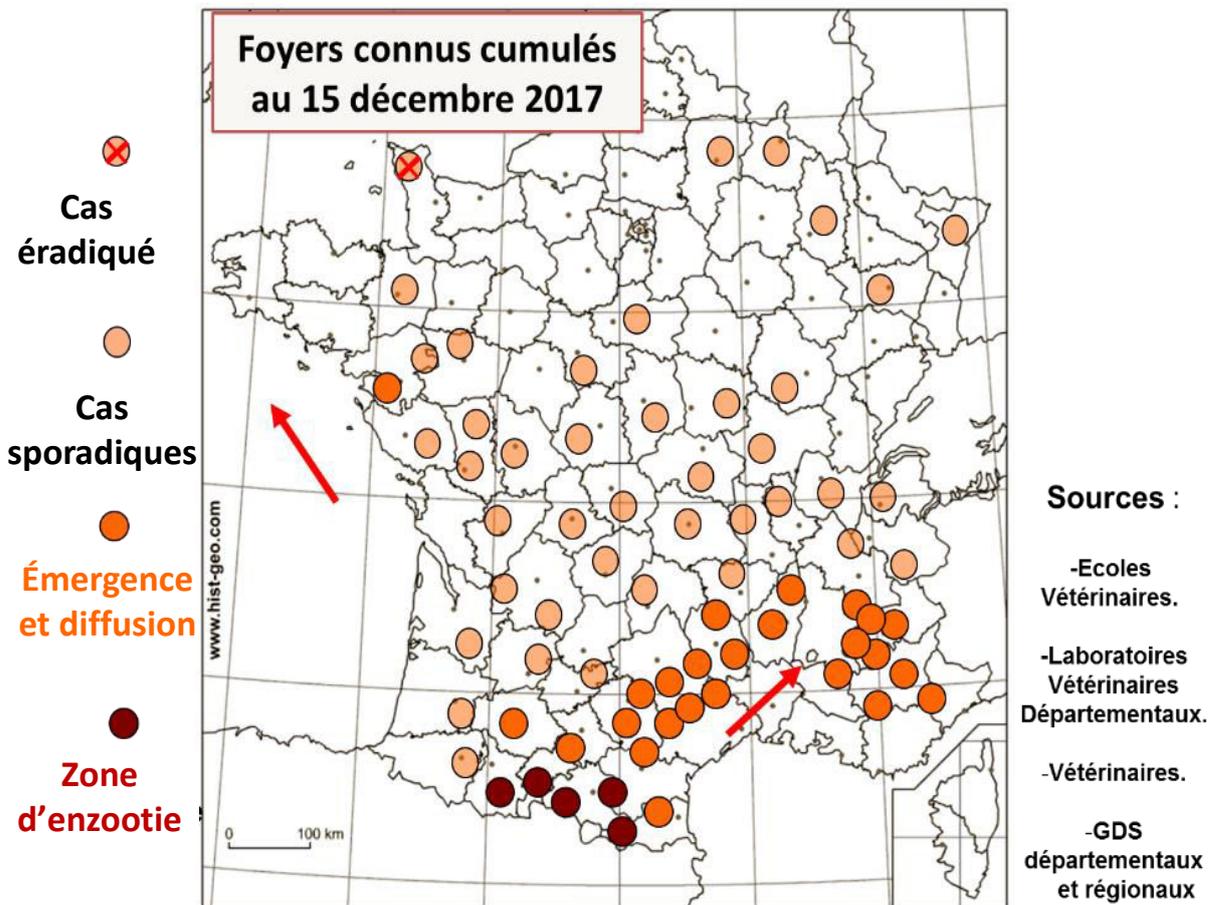


Figure 10: les départements français où au moins un foyer de besnoitiose a été recensé au 1er décembre 2017.

3-6-Modalités d'infection

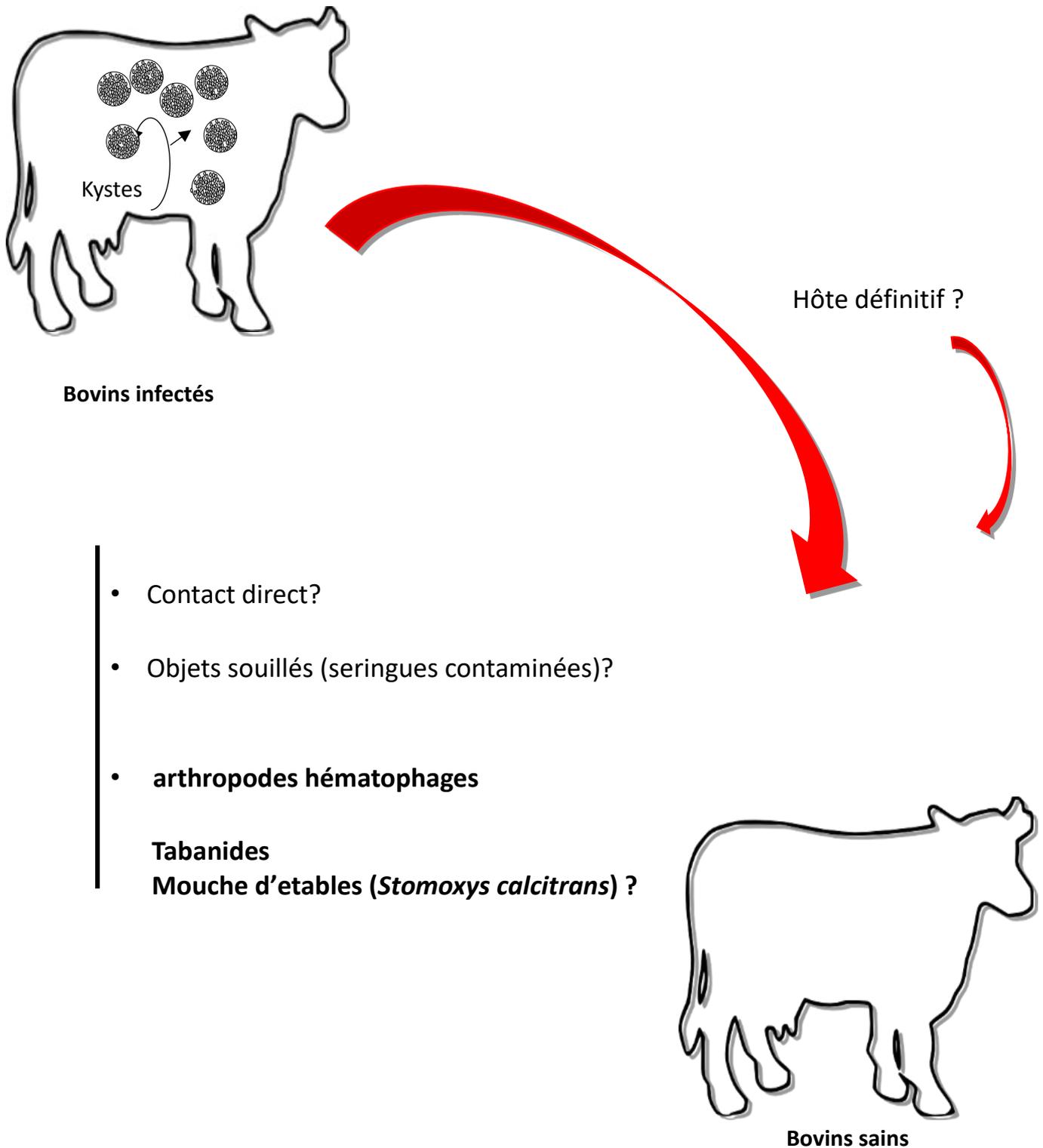
La transmission horizontale semble être responsable de la propagation de la maladie, puisqu'une association significative a été trouvée entre des taux de prévalence élevés et une augmentation de l'âge des animaux (Bigalke, 1981 ; Fernández-García et al., 2010). Plusieurs auteurs ont indiqué une augmentation saisonnière des cas cliniques au cours de l'été, lorsque les troupeaux de bovins partagent les mêmes pâturages (Alzieu, 2007 ; Frey et al., 2013a). Certains auteurs spéculent que, chez les bovins allaitants, étant donné l'importance du mélange entre taureaux et vaches durant la période de pâturage, les mâles utilisés pour la monte naturelle favorisent la

transmission par contact direct pendant l'accouplement, en supposant que les kystes présents en surface dans les muqueuses vaginales puissent se rompre (Castillo et al., 2009 ; Álvarez-García et al., 2013a). Cependant, cela n'a jamais été démontré formellement, il pourrait donc y avoir une confusion entre le risque accru de transmission vectorielle lors de proximité d'animaux infectés et non infectés et transmission par contact direct lors de l'accouplement. Par ailleurs, la transmission vénérienne semble improbable puisqu'il n'a pas été possible de détecter d'ADN de *B. besnoiti* dans le sperme ou les sécrétions spermatiques de taureaux naturellement infectés (Esteban-Gil et al., 2014). De plus, la transmission verticale du parasite (transplacentaire ou lactogénique) n'a pas été confirmée (Alzieu et al., 2017a). La besnoitiose ne semble pas se transmettre *in utero* car les veaux nés de mères infectées sont séronégatifs à la naissance avant la prise de colostrum (Alzieu et al., 2017a). L'augmentation de la prévalence au fur et à mesure que l'âge des animaux augmente, ainsi que le fait que les mères infectées de façon chronique ont une progéniture séronégative (Shkap et al., 1994) suggèrent que ce mode de transmission est sans objet pour *B. besnoiti*.

Il a été démontré expérimentalement que certaines espèces de taons (*Atylotus nigromaculatus*, *Tabanocella denticornis* et *Haematopota albihirta*) et les mouches d'étables peuvent intervenir dans la transmission mécanique de *B. besnoiti* et une transmission vectorielle est largement suspectée (Bigalke, 1968) (Figure 11). Les diptères hématophages comme les Tabanidés, les stomoxes ou les glossines sont capables de prélever des bradyzoïtes et des tachyzoïtes respectivement dans la peau ou le sang d'un bovin infecté à l'aide de leurs pièces buccales (Bigalke, 1968 ; Liénard et al., 2013) puis de les transférer à un bovin sain lors d'une deuxième piqûre. De ce fait, ces insectes sont considérés comme de simples aiguilles souillées, car le parasite ne se multiplie pas et n'évolue pas chez l'arthropode hématophage. Dès lors, la transmission vectorielle de la besnoitiose est simplement mécanique et ne peut se faire que lors d'un repas interrompu sur un bovin infecté et finalement complété sur un bovin naïf (Alzieu et

al., 2017b). Il a été démontré que 3 femelles de *Tabanus denticornis* suffisent pour transmettre le parasite virulent d'un bovin infecté à un bovin sain, et ce parasite peut persister jusqu'à 24 heures dans le tube digestif des tabanidés (**Bigalke, 1968**). Par conséquent, ce mode de transmission pourrait également contribuer à l'explication de l'augmentation du nombre de cas en été, moment auquel ces vecteurs montrent une plus grande activité (**Bigalke, 1968**). **Bigalke** a réussi deux fois à provoquer la formation de kystes de *Besnoitia* chez des lapins receveurs à la suite de repas interrompus de stomoxes sur un bovin infecté. Toutefois, cette transmission n'a été possible qu'après 52 000 et 292 500 repas interrompus, soit 870 et 2250 *S. calcitrans* adultes transférés respectivement 60 et 130 fois de bovins infectés en phase chronique aux lapins naïfs receveurs (**Bigalke, 1968**). Cette dernière observation interroge sur le rôle effectif des stomoxes dans la transmission de la besnoitiose du fait de ces nombres de repas interrompus démesurés pour assurer la transmission.

Figure 11: Voies de transmission suspectées de la besnoitiose bovine (figure originale)



3-7-Facteurs de risque

L'identification des facteurs de risque est d'un grand intérêt pour le choix et la mise en œuvre de mesures de lutte efficaces contre cette maladie. Les facteurs de risque connus de l'infection à *B. besnoiti* ont été étudiés grâce notamment à des enquêtes épidémiologiques mais tous ne sont pas encore connus. Parmi eux, nous pouvons distinguer les facteurs qui dépendent de la gestion des troupeaux, de l'environnement et des facteurs individuels.

Parmi les facteurs individuels, la race, le type de production ou le sexe ne semblent pas être des facteurs de sensibilité et de réceptivité (**Álvarez-García et al., 2014a**). La plus grande sensibilité évoquée chez les mâles pourrait résulter simplement d'une plus grande attention clinique portée aux taureaux du fait de leur valeur économique (**Álvarez-García et al., 2014a**).

En ce qui concerne la conduite d'élevage, le déplacement des animaux infectés des zones endémiques vers les zones indemnes ou bien d'un élevage infecté à un élevage sain dans la même zone géographique représente le plus grand risque de propagation de la maladie (**Olias et al., 2011**).

Une saisonnalité dans l'apparition des cas cliniques a été décrite, la plupart des nouveaux cas survenant au pâturage pendant les mois chauds et relativement humides lorsque les arthropodes hématophages sont dans leur période d'activité maximale (**Alzieu, 2007 ; Fernández-García et al., 2010 ; Alzieu et al., 2017b; Gutiérrez-Expósito et al., 2017**). Si la plupart des cas cliniques sont observés lors des grosses chaleurs estivales de juillet à octobre en relation avec la pullulation des Tabanidés et des stomoxes, la besnoitiose connaît désormais une saisonnalité élargie, à l'exception notable du cœur de l'hiver (**Alzieu et al., 2017b**). Des périodes d'incubation plus longues de la maladie chez certains animaux et la persistance d'une activité notable des stomoxes en dehors des périodes estivales en seraient probablement les causes (**Liénard et al., 2011 ; Alzieu et al., 2017b**).

En ce qui concerne les facteurs individuels, il convient de noter qu'une augmentation de la séroprévalence a été observée à mesure que l'âge des animaux augmente (**Bigalke, 1968 ; Fernández-García et al., 2010**). Toutefois, quelques cas cliniques ont été observés en France et en Espagne sur de jeunes génisses de renouvellement ou des broutards âgés de 3 à 6 mois (**Grangé et Alzieu, communications personnelles ; Diezma-Díaz et al., 2015**). Un cas très récent de besnoitiose a pu être décrit et confirmé en mars 2016 sur deux veaux allaitants nés et élevés en stabulation et âgés de 3 mois seulement (**Grangé et Alzieu, observations personnelles**). En Espagne, en 2013, un veau limousin âgé de 4 mois et en phase de sclérodermie aurait exprimé les symptômes compatibles avec la phase aiguë de la maladie à 2 mois seulement (**Diezma-Díaz et al., 2015**). En fait, les animaux infectés de manière chronique peuvent présenter une diminution apparente de la sévérité des signes cliniques et être résistants à la réinfection, mais restent infectés à vie et leur production est réduite (**Kumi-Diaka et al., 1981 ; Nobel et al., 1981**). De cette manière, il a été observé que dans les zones où la maladie est endémique, un pourcentage élevé d'animaux infectés, présentant des anticorps spécifiques contre *B. besnoiti*, ne montrent pas de signes cliniques détectables (infections subcliniques) (**Gutiérrez-Expósito et al., 2017d**). Cependant, toute situation d'immunodépression pourrait favoriser une nouvelle manifestation clinique chez un animal séropositif mais ceci reste encore à démontrer (**Alzieu et al., 2017b**).

3-8- Étude clinique

3-8-1 Occurrence épizootique ou enzootique de la *besnoitiose bovine*

Le fait que les troupeaux soient infectés de façon enzootique ou épizootique a un impact sur la fréquence des cas cliniques qui surviennent dans l'année. En effet, en zone d'enzootie, ce sont les jeunes bovins (de 2 à 4 ans), mâles ou femelles, qui présentent préférentiellement des formes cliniques alors que les individus plus âgés sont plutôt des infectés subcliniques (**Alzieu et al., 2017b**). En revanche, dans les zones d'émergence, ou d'épizootie, les cas cliniques sont très nombreux, quels que soient l'âge et la race, durant les deux à trois premières années après la survenue du tout premier cas clinique : avec un taux de morbidité élevé et un taux de mortalité atteignant parfois 7 à 10 % (**Alzieu et al., 2017b**). La variation de la prévalence de l'infection et/ou de la maladie au cours du temps, ainsi que le type et la gravité des signes cliniques détectés, pourraient être révélateurs du schéma épidémiologique de la maladie. Des études menées dans des zones ou dans des troupeaux où la maladie est enzootique (en l'absence d'un programme de lutte) ont signalé des taux de prévalence et d'incidence constamment élevés au fil du temps (**Gutiérrez-Expósito et al., 2017a, b, c**). Les kystes tissulaires, qui sont considérés par certains auteurs comme caractéristiques de l'infection à *B. besnoiti*, peuvent être détectés chez certains animaux mais pas chez d'autres en raison d'une plus faible charge parasitaire (**Frey et al., 2013a**). Les cas de besnoitiose aiguë sont sporadiques et se limitent principalement à des animaux récemment arrivés dans un troupeau contaminé. Par exemple les taureaux reproducteurs peuvent développer une forte fièvre, une orchite évoluant vers une hypofertilité ou une azoospermie et des lésions cutanées (**Gutiérrez-Expósito et al., 2017d**). Si la situation d'une forme épizootique persiste pendant une période prolongée, la maladie peut devenir enzootique. Les animaux infectés subcliniques restent séropositifs durant plusieurs années (**Bigalke, 1968 ; Liénard et al., 2011**). Ceux qui ont développé à un moment de leur vie des signes cliniques peuvent ensuite présenter une amélioration clinique sensible : la peau semble

moins épaissie au bout de quelques mois d'évolution en phase chronique, l'animal mange correctement, une vache peut donner naissance à des veaux viables dont elle s'occupe..., cela décourage les éleveurs d'éliminer ces animaux des troupeaux contribuant ainsi à la pérennité de l'infection au sein de l'exploitation.

3-8-2-Signes cliniques

La période d'incubation peut durer jusqu'à deux mois après la contamination (**Jacquet et al., 2010**). Ensuite, les deux phases successives de la maladie sont la phase **aigüe** (stade fébrile et des œdèmes) et chronique, la mort de l'animal pouvant survenir dans chacune de ces deux phases (**Jacquet et al., 2010 ; Alzieu et al., 2017b**). Les durées de la phase aigüe et de la transition vers la phase chronique varient selon les animaux et dépendraient notamment de la charge parasitaire et de l'isolat (**Álvarez-García et al., 2014b**).

3-8-2-1 -Phase aigüe : stade fébrile et des œdèmes

Dans un premier temps, la maladie est caractérisée par une forte hyperthermie (40-41,6°C), c'est le **stade fébrile (Figure 12)**. Cette phase peut durer de trois à dix jours et des signes cliniques non spécifiques tels que dépression, tachypnée, tachycardie, congestion des muqueuses, écoulement nasal, anorexie et perte de poids peuvent également apparaître. Dans les cas graves, les animaux infectés peuvent développer ensuite des œdèmes qui se situent principalement dans les parties déclives du corps et peuvent être responsables de troubles respiratoires, d'orchite et de boiteries. Les signes cliniques sont non spécifiques et peuvent parfois passer inaperçus quand ils sont d'intensité limitée. Le diagnostic différentiel doit inclure la fièvre catarrhale et la photosensibilisation (**Jacquet et al., 2010 ; Rostaher, 2010**). Des organismes proliférants peuvent être détectés dans les frottis sanguins du 3^{ème} au 12^{ème} jour après le début de la réaction fébrile chez des bovins infectés expérimentalement (**Bigalke, 1968 ; Basson et al., 1970**). Cependant, cette observation n'a pas pu être corroborée dans les

infections naturelles (**Gollnick et al., 2015**). Les lésions dérivées de l'invasion des cellules endothéliales avec vascularite, thrombose, nécrose des veinules et des artéριοles et œdèmes (**Figure 13**) peuvent être observées (**McCully et al., 1966 ; Basson et al., 1970**). Dans les coupes histologiques de peau, l'infiltration inflammatoire périvasculaire peut être détectée, avec des tachyzoïtes à l'intérieur des cellules endothéliales essentiellement dans la couche papillaire, alors que seulement quelques tachyzoïtes sont dispersés dans la couche réticulaire du derme. Les tachyzoïtes peuvent être détectés pendant 10-12 jours *post* infection (**Basson et al., 1970**) et jusqu'à une semaine avant la séroconversion (**Langenmayer et al., 2015a**). Plus tard, les tachyzoïtes sont rarement observés dans la peau (**Langenmayer et al., 2015b**). Simultanément, la formation de kystes tissulaires débute dans la région où le parasite proliférait initialement, et de nombreux kystes tissulaires en tout début de développement peuvent être trouvés dans l'intima des vaisseaux sanguins, avec un tropisme pour les tissus conjonctifs (**Neuman, 1972 ; Kumi-Diaka et al., 1981 ; Nobel et al., 1981**). Durant cette phase aiguë, les premiers kystes tissulaires sont petits, de 10 à 23 μm ; la vacuole parasitophore (70 μm) occupe environ un cinquième du cytoplasme de la cellule hôte et contient entre un et quatre bradyzoïtes ; plus tard, elle pourra en contenir jusqu'à 12 (**Dubey et al., 2013 ; Langenmayer et al., 2015a**). Cette première phase de la maladie peut durer entre une et quatre semaines, et des IgG spécifiques sont présents dès 15 à 18 jours *post* infection avec un pic à 30-60 jours *post* infection. Le parasite peut être détecté par PCR dans les biopsies cutanées quelques jours avant la séroconversion. La phase aiguë peut durer moins de deux semaines chez les animaux qui développent ensuite une besnoitiose chronique légère (**Gollnick et al., 2015**).

Une infection subaiguë est possible et passe souvent inaperçue jusqu'au développement macroscopique des premiers kystes tissulaires, entre 11 et 31 jours après la séroconversion (**Gollnick et al., 2015**). Un signe notable mais non spécifique est un pelage terne et rugueux (**Gollnick et al., 2015**).

Les altérations des paramètres hématologiques et biochimiques durant la phase aiguë consistent en une diminution des concentrations de leucocytes et d'érythrocytes, de l'hématocrite, de l'albumine sérique, de l'urée, du magnésium et du calcium, ainsi que des concentrations sériques totales de protéines, de globulines, de bilirubine totale et de créatinine, d'aspartate transaminase (AST) et de créatine kinase (CK). Ces résultats pourraient être attribués aux lésions vasculaires avec des foyers inflammatoires et nécrotiques (**Dubey et al., 2013 ; Langenmayer et al., 2015a**). Un syndrome néphrotique mortel a été reporté pendant cette phase aiguë (**Dubey et al., 2013**).

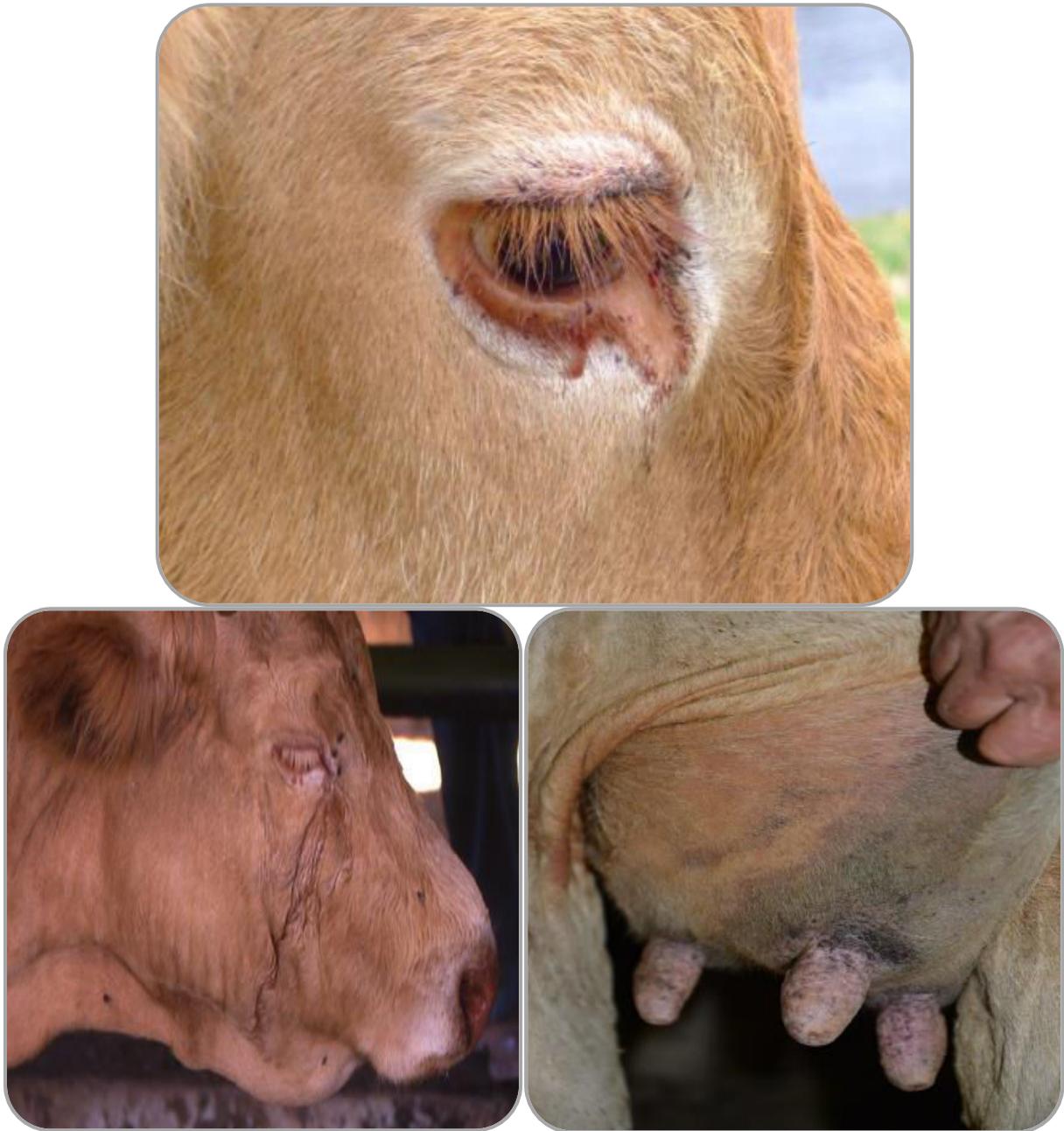


Figure 12: phase aiguë de la besnoitiose : hyperthermie et larmoiement, peau congestionnée, aspect zébré et hyperesthésie cutanée, plis de congestion et œdème marqué de la tête « tête d'hippopotame », lésions congestive-hémorragiques sur la mamelle. (Photos Jean-Pierre Alzieu et Philippe Jacquet)



Figure 13: phase des œdèmes et de vascularite. (Photos Jean-Pierre Alzieu et Philippe Jacquet)



Figure 14: phase de la sclérodémie avec hyperkératose et perte de poils peau épaissie, éléphantiasis (début de la phase chronique). (Photos Philippe Jacquet)

3-8-2-2 -Stade chronique (connu sous le nom de phase de sclérodémie)

Les kystes tissulaires sont responsables des lésions cutanées. Ils se développent, avec un nombre progressivement croissant de bradyzoïtes, et déformant les cellules hôtes qui présentent alors plus de noyaux et de nucléoles (**Langenmayer et al., 2015b**). Ils se retrouvent dans le derme, le tissu conjonctif sous-cutané, les fascias intermusculaires, les muqueuses des voies respiratoires supérieures, le pharynx, la conjonctive oculaire, le tractus génital inférieur chez les femelles et dans les testicules et l'épididyme chez les mâles (**Figure 14**) (**Bigalke, 1981 ; Kumi-Diaka et al., 1981**). Récemment, la fourbure chronique a été associée à de multiples kystes tissulaires de *B. besnoiti* dans le coron laminaire (**Gollnick et al., 2015 ; Langenmayer et al., 2015a**). Les kystes conjonctivaux (qui ont une valeur diagnostique) de la sclère se développent 6-7 semaines *post* infection (19-32 jours après la séroconversion) et apparaissent plus tôt que les kystes tissulaires du vestibule vaginal (entre 26 et 180 jours après la séroconversion) (**Bigalke., 1968 ; Gollnick et al., 2015**). L'âge de l'infection peut être estimé

en fonction de la taille du kyste tissulaire, bien qu'il dépende aussi de la période d'incubation (**Basson et al., 1970**). Les kystes tissulaires en fin d'évolution mesurent jusqu'à 390-410 µm de diamètre 4 semaines après infection (**Langenmayer et al., 2015a**). À ce moment, les kystes tissulaires sont complètement développés (**Bigalke, 1968 ; Basson et al., 1970 ; Langenmayer et al., 2015a**). Une infiltration granulomateuse péricystique d'intensité variable, composée de macrophages activés, de lymphocytes T, de quelques lymphocytes B, d'éosinophiles, de cellules géantes multinucléées et de fibroblastes peut entourer les kystes tissulaires (**Frey et al., 2013b ; Langenmayer et al., 2015a, b**). Ensuite, la rupture du kyste tissulaire peut être observée à partir de 30 jours *post* infection (**Basson et al., 1970**), avec une inflammation péricystique rompant la couche hyaline (**Frey et al., 2013b ; Gollnick et al., 2015**).

Les lésions cutanées comprennent l'hyperkératose, la caractéristique typique de la sclérodermie (connu sous le nom de peau d'éléphant), et l'alopecie. Les zones préférentielles de ces lésions sont les paupières, le cou, les trayons, les extrémités distales des membres antérieurs et postérieurs (**Figure 15**) (**Gollnick et al., 2015 ; Schares et al., 2016**).

Le diagnostic différentiel clinique inclut les gales sarcoptique et psoroptique, les mycoses, le lymphosarcome cutané, l'hyperkératose, la dermatose nodulaire et la dermatophilose (**Rostaher et al., 2010**). La stérilité (aspermato-genèse) chez les mâles est causée par l'orchite nécrosante qui entraîne l'atrophie et l'induration des testicules. En revanche, la spermatogenèse peut rester normale chez les taureaux infectés sans signe clinique (**Esteban-Gil et al., 2016**). **Gutiérrez-Expósito et al. (2017b)** ont publié un cas de parasitémie chez une vache infectée de façon chronique. Cependant, cette observation est peu fréquente, car seule une vache sur 194 séropositives a montré un résultat positif à la PCR sur le sang. De même, en France, dans un troupeau de bovins Aubrac d'une zone d'émergence (Aude), six bovins sur 58 séropositifs ont présenté un résultat positif en qPCR sur le sang (**Jacquet et al., données personnelles non**

publiés). Certains de ces animaux, chez qui l'ADN du parasite a pu être détecté dans le sang, étaient pourtant déjà en phase de sclérodermie.



Figure 15: phase chronique : sclérodermie avec kystes sur la sclère et le vestibule vaginal. (Photos : Jean-Pierre Alzieu et Philippe Jacquet).

3-9-Diagnostic

3-9-1- Diagnostic direct

La détection des parasites par des techniques de diagnostic direct confirme l'infection à *Besnoitia* spp. Elle est plus aisée en phase de sclérodermie que pendant la phase fébrile. En effet, il est exceptionnel de mettre en évidence le parasite dans les frottis sanguins en début de phase aiguë. Les kystes tissulaires peuvent être visualisés dans des coupes de peau colorées en hématoxylline-éosine (H & E) ou par immunohistochimie (IHC), par des raclages de la sclère conjonctivale et de la muqueuse vestibulaire, ou encore par compression de biopsies cutanées entre des plaques de verre suivant une méthode similaire à la trichinelloscopie (**Bigalke, 1968 ; Rostaher et al., 2010 ; Frey et al., 2013a,b**). Plus récemment, des techniques de PCR conventionnelle ou de PCR en temps réel ont également été développées pour détecter l'ADN parasitaire (**Ellis et al., 2000 ; Cortes et al., 2007 ; Schares et al., 2011**) dans différents tissus (sang, biopsie cutanée etc...). En définitive, le choix de la technique de diagnostic direct la plus appropriée dépend du stade de la maladie (**Figure 16**).

3-9-1-1-Techniques d'histopathologie

Les tachyzoïtes sont rarement détectés par les techniques histologiques, et ceux qui sont occasionnellement trouvés, le sont dans les frottis sanguins et les biopsies cutanées (**Bigalke, 1968 ; Gollnick et al., 2015**). Ils peuvent être détectés quelques jours après séroconversion à l'intérieur des cellules endothéliales dans la couche papillaire du derme. Durant cette phase précoce, la détection du parasite est très difficile sans l'utilisation d'un anticorps spécifique sur les lames. Les techniques d'histopathologie détectent les lésions associées à l'infection parasitaire (**Langenmayer et al., 2015a**).

En revanche, plusieurs méthodes rapides et peu coûteuses peuvent être utilisées dans un diagnostic de routine pour confirmer la maladie chez des animaux infectés de façon chronique

en détectant des kystes à bradyzoïtes. Ainsi, **Sannusi (1991)** a proposé un test de diagnostic simple des frottis de biopsie cutanée et / ou des raclages de la sclère conjonctivale fixés et colorés avec le colorant de Giemsa. De même, **Rostaher et al. (2010)** a réalisé des frottis vaginaux et a mis en évidence des kystes et des bradyzoïtes isolés. **Fernández-García et al. (2009b)** ont décrit une autre méthode qui consistait à réaliser des biopsies cutanées puis à écraser de petits morceaux de tissu cutané recueillis entre deux plaques de verre pour un examen microscopique direct afin de visualiser les kystes. La sensibilité de ces méthodes est très faible chez les bovins atteints de formes subcliniques et le parasite peut ne pas être détecté chez les bovins infectés chroniquement du fait de la distribution non uniforme des kystes cutanés (**Basso et al., 2013 ; Dubey et al., 2013 ; Schares et al., 2016**).

Récemment, **Schares et al. (2016)** ont signalé les sites dans lesquels la probabilité de détecter de l'ADN du parasite par PCR est la plus grande chez des animaux en phase chronique : il s'agit de l'extrémité des pattes antérieures et postérieures et du mufler. Ces zones cibles pourraient être les mêmes que celles utilisées pour détecter des kystes tissulaires par examen histologique.

3-9-1-2- Techniques moléculaires

Les techniques moléculaires offrent une plus grande sensibilité par rapport aux techniques histopathologiques et ont été utilisées sur les tissus ainsi que sur du sang total (**Schares et al., 2011 ; Frey et al., 2013a,b ; Schares et al., 2016 ; Gutiérrez-Expósito et al., 2017b**). Les PCR conventionnelles et quantitatives utilisées sont basées sur l'amplification de la région ITS1 du gène de l'ADN ribosomique de *B. besnoiti*. Elles offrent une grande sensibilité et une bonne spécificité (**Cortés et al., 2007 ; Schares et al., 2011**). **Ellis et al. (2000)** ont développé une PCR conventionnelle basée sur l'amplification de l'ADN ribosomique 18S pour l'analyse phylogénétique (**Nieto-Rodríguez et al., 2016**). En outre, plusieurs kits de PCR ont déjà été commercialisés (par exemple, ADIAVET® *Besnoitia* Real-Time et VetPCR™ *Besnoitia*

Detection Kit, distribué par Biomerieux et Bioingentech, respectivement). Par conséquent, ces tests pourraient détecter de l'ADN du parasite dans les biopsies cutanées ou dans le sang de bovins infectés en phase aiguë avant la séroconversion. Lorsque les animaux meurent pendant le stade aigu de la maladie, ils sont encore séronégatifs, l'ADN du parasite peut être retrouvé dans l'appareil reproducteur (**Dubey et al., 2013**). En revanche, l'utilité de ces tests chez les bovins infectés subcliniquement est limitée, car le nombre de kystes tissulaires devrait être faible (**Frey et al., 2013a**) et la parasitémie est peu susceptible d'être détectée. Au stade chronique de la maladie, la charge parasitaire est plus élevée en raison de l'augmentation de la taille et du nombre de kystes tissulaires. Ainsi, **Schares et al. (2016)** ont défini les zones les plus parasitées, comme mentionné ci-dessus (techniques histologiques).

Ces techniques sont particulièrement utiles pour l'étude de la distribution intraorganique du parasite (**Frey et al., 2013a ; Liénard et al., 2015**) ; ils sont également utiles dans les études épidémiologiques pour rechercher le parasite chez d'autres hôtes mammifères (**Basso et al., 2011 ; Gutiérrez-Expósito et al., 2016**) et chez des arthropodes hématophages, vecteurs potentiels (**Liénard et al., 2013 ; Gollnick et al., 2015**). Cependant, ils ne sont pas en mesure de faire la distinction entre les différentes espèces de *Besnoitia* spp. qui infectent les ongulés ou ne peuvent discerner des parasites viables (et potentiellement infectants) de parasites morts. Même si la région ITS1 était considérée comme un bon marqueur phylogénétique (**Tenter et al., 2002**), c'est une région conservée parmi les différentes espèces du genre *Besnoitia* (**Ellis et al., 2000**). D'autres domaines moléculaires devraient être étudiés, comme les microsatellites qui se sont révélés particulièrement efficaces pour l'étude des variations géographiques de *B. besnoiti* (**Madubata et al., 2012**)

3-9-2- Diagnostic indirect (tests sérologiques)

Les techniques sérologiques développées jusqu'à présent reposent sur la détection d'anticorps spécifiques contre *B. besnoiti* et sont celles utilisées dans le diagnostic de routine de la besnoitiose bovine. Parmi les techniques utilisées aujourd'hui, on peut citer l'immunofluorescence indirecte (IFI), le Western Blot et l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), cette dernière méthode immuno-enzymatique de détection étant la plus utilisée pour le diagnostic de routine et les études épidémiologiques (**Cortes et al., 2006a ; Fernandez-Garcia et al., 2009a, 2010 ; Schares et al., 2010, 2013 ; Waap et al., 2014**). L'IFI a été la première technique sérologique développée dans les années 80 (**Goldman et Pipano, 1983**), puis a servi pendant quelques années comme technique de référence pour le développement d'autres techniques (**Shkap et al., 2002**). En ce qui concerne le Western blot (WB), des tests basés sur des extraits de tachyzoïte et de bradyzoïte ont été développés et ont été utilisés. Actuellement, la méthode de Western Blot est considérée comme la technique de référence au niveau européen (**Garcia-Lunar et al., 2017 ; Alzieu et al., 2017b**). En particulier, le western blot développé par **Cortes et al. (2006c)** dont dérivent toutes les autres versions actuelles (**Fernández-García et al., 2009a ; Schares et al., 2010**), est basé sur des antigènes totaux de tachyzoïtes ou de bradyzoïtes. Il convient de noter que ce test n'est pas systématiquement utilisé pour le diagnostic de l'infection en raison de son coût élevé (20 à 40 euros par échantillon selon les pays). Le Western Blot permettrait une détection légèrement plus précoce (environ 15 jours après le début de la phase fébrile) que la sérologie ELISA, usuellement positive à partir de 22 jours (**Figure 16**) (**Alzieu et al., 2017b**).

L'immunofluorescence indirecte est une méthode semi-quantitative, concordante avec d'autres méthodes diagnostiques, bien développée et documentée : elle n'est pas utilisée en routine, restant plutôt du domaine de la recherche (**Lenfant et al., 2014**). La sérologie ELISA, plus facile d'utilisation, lui est préférée. Plusieurs tests ELISA ont été développés et deux sont

disponibles en France actuellement : un test monocupule : Priocheck® *Besnoitia* Indirect 2.0 (Prionics AG, Schlieren-Zürich, Suisse) et un test bicupule : ID Screen® *Besnoitia* indirect 2.0 (IDVet, Grabels, France), utilisables sur sérums. Le Kit (ID Screen® *Besnoitia* indirect 2.0 a été évalué par rapport au western blot, il a montré une grande sensibilité et une grande spécificité (Alzieu et al., 2015 ; Alzieu et al., 2017b).

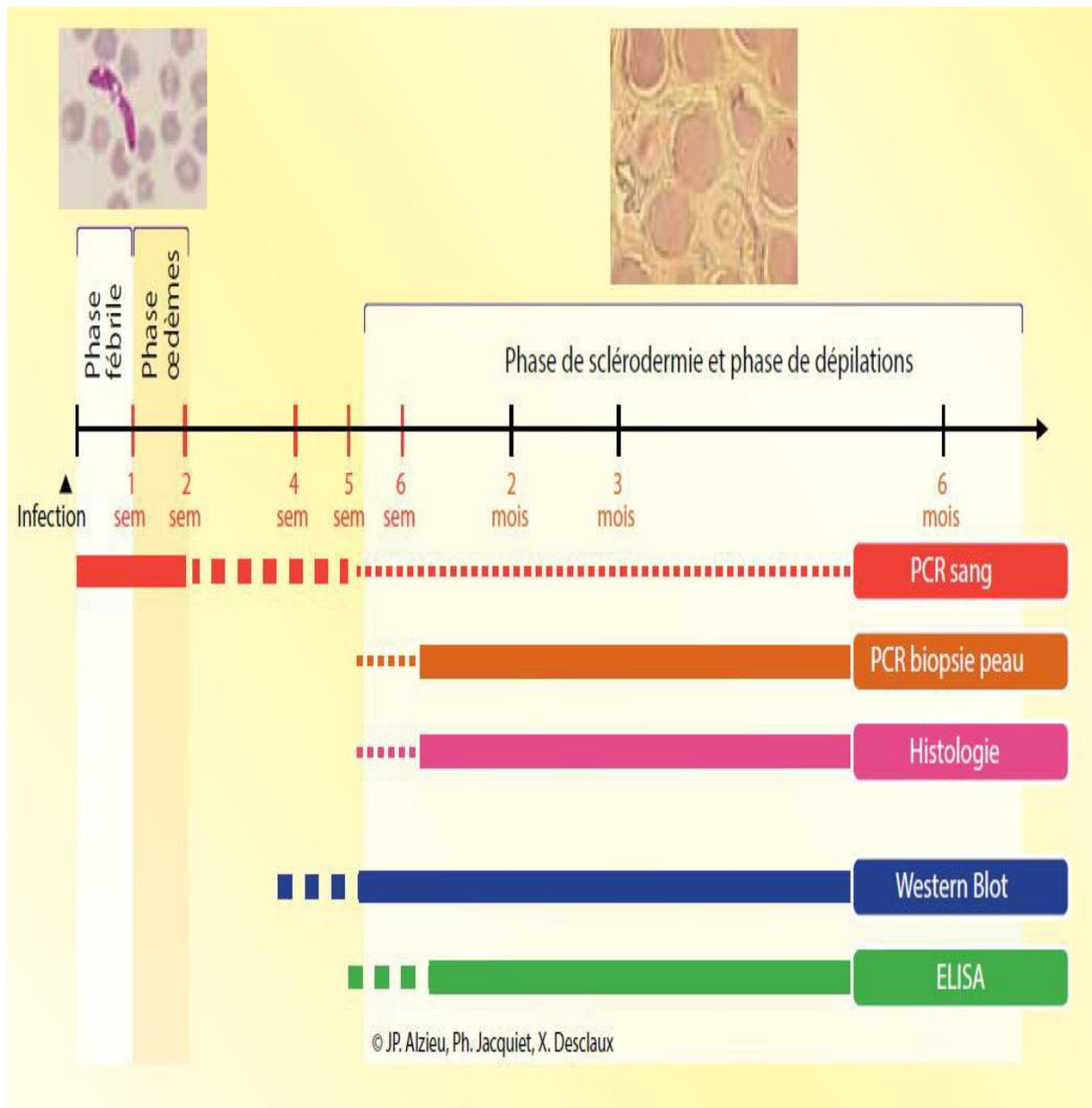


Figure 16: possibilités de diagnostic expérimental en cas de besnoitiose (Alzieu et al., 2017b).

3-10- Moyens de lutte

Le contrôle de la besnoitiose bovine reste un défi pour les vétérinaires, le traitement de la besnoitiose bovine se fait essentiellement par sulfamidothérapie, le plus précocement possible en phase aiguë, mais les résultats ne sont pas complètement satisfaisants, parce que les animaux restent porteurs à vie de nombreux kystes dans leur peau même s'ils sont apparemment

cliniquement guéris. Un traitement symptomatique est souvent associé pour le bien-être des animaux : anti-inflammatoires et diurétiques. La sulfadimérazine s'utilise à la posologie de 150 à 200 mg/kg PV et la sulfadiméthoxine à 80 mg/ kg PV en première intention. La sulfamidothérapie injectable initie un traitement dont la durée ne doit pas être inférieure à 7 jours. La voie orale doit avantageusement prolonger les 2 à 3 jours de traitement injectable **(Alzieu et al., 2017a,b)**.

Les chercheurs et les éleveurs de bovins étant donné que le contrôle repose entièrement sur des mesures de détection et de gestion de troupeau. Un protocole de diagnostic réalisable comprend une inspection clinique couplé à au moins un test sérologique. À cet égard, la détection des bovins infectés subcliniquement est le principal défi diagnostique à aborder. Un diagnostic précoce (dans la mesure du possible) et précis est essentiel pour le développement des programmes de lutte spécifiquement adaptés au contexte rencontré, en distinguant le caractère épizootique ou enzootique de l'infection sévissant au sein de l'exploitation. Les mesures sanitaires pour contrôler la besnoitiose peuvent se résumer en trois points **(Alzieu et al., 2017b)**

1. L'élimination des bovins malades et des bovins porteurs de kystes,
2. L'évaluation de la séroprévalence et l'élimination sélective des bovins séropositifs,
3. Le contrôle systématique à l'achat.

Les mesures de biosécurité sont essentielles pour le contrôle, de sorte que les troupeaux sans introduction régulières ou de transhumances collectives ont plus de chances de rester sains ou bien en cas de contamination de réussir un assainissement rapide. Les nouveaux animaux, avant d'entrer dans un troupeau sain, devraient être systématiquement testés en sérologie pour maintenir un troupeau indemne de l'infection et de la maladie. Une attention particulière devrait être accordée aux taureaux reproducteurs, car ils sont habituellement utilisés deux ou trois années dans une exploitation puis sont revendus à une autre. En outre, idéalement, tous les

animaux doivent être examinés cliniquement et sérologiquement pour détecter une infection à *B. besnoiti* à la fin de la période de pâturage et de la saison d'activité des insectes hématophages. Cela est particulièrement important lorsqu'un troupeau se trouve dans une zone où le parasite circule, car l'incidence est très importante après l'activité maximale des arthropodes hématophages (**Gollnick et al., 2015**).

Les animaux infectés doivent être progressivement retirés du troupeau pour éviter la propagation de la maladie en réduisant la prévalence de l'infection dans le troupeau. Les animaux les plus gravement atteints avec des signes cliniques systémiques ou des lésions cutanées devraient être réformés le plus rapidement possible, car ils sont porteurs de charges parasitaires élevées dans la peau. De plus, les taureaux stériles ou subfertiles et les vaches présentant des problèmes de fertilité doivent être réformés (**Esteban-Gil et al., 2016**). Bien qu'**Esteban-Gil et al. (2016)** aient observé plus d'anomalies génitales chez les taureaux cliniquement infectés, des altérations modérées à sévères peuvent également apparaître chez les taureaux infectés subcliniquement, sans que cela nuise à la qualité du sperme. Ainsi, les taureaux devraient être inspectés avant la saison de reproduction par un examen sérologique et clinique en incluant simultanément l'évaluation de la qualité du sperme. Toutefois, cette pratique est très lourde à mettre en œuvre sur le terrain.

La lutte contre les stomoxes est difficile car certaines populations se montrent désormais résistantes aux pyréthroïdes de synthèse, insecticides utilisés habituellement pour traiter les bovins au pâturage (**Salem et al., 2012**). Il existe un manque considérable de données expérimentales sur l'utilité de la lutte anti vectorielle dans la besnoitiose bovine (**Alzieu et al., 2017b**). Il est possible que l'utilisation d'insecticides (pyréthroides), de pièges intérieurs et de régulateurs de croissance des insectes (cyromazine appliquée sur les fumiers) contribueront à réduire la transmission mécanique associée à l'activité des stomoxes (**Liénard et al., 2011 ;**

Taylor et al., 2012 ; Baldacchino et al., 2013 ; Hogsette et Kline, 2017a,b). De plus, afin de réduire le nombre de vecteurs à l'extérieur, les pulvérisations d'insecticides doivent être appliquées mensuellement pendant la période d'activité maximale (**Baldacchino et al., 2013**). Deux vaccins vivants atténués sont actuellement disponibles dans le monde. Le premier, utilisé en Afrique du Sud, est préparé à partir d'une souche de *B. besnoiti* isolée d'un gnou, qui confère une immunité d'environ quatre ans. Ce vaccin limite les signes cliniques, mais les animaux restent porteurs asymptomatiques (**Duvallet et Boireau., 2015**) Le second, utilisé en Israël, est préparé à partir d'une souche de *B. besnoiti* isolée sur bovins et entretenue sur cultures cellulaires (**Varda Shkap., communication personnelle dans Alzieu et al., 2017b**). Dans les deux pays, il n'est rapporté aucun cas clinique grave, mais la vaccination n'a pas empêché l'apparition de kystes dans le derme lors d'essais en fermes en Afrique du Sud (**Bigalke et al., 1974**). Aucun vaccin besnoitiose n'est enregistré en Europe à ce jour. Avec la mise au point d'un modèle lapin, les premières phases d'essais vaccinaux sont maintenant envisageables, car il est possible de reproduire la maladie sur les lapins au lieu des bovins ce qui réduit considérablement les coûts de ces expérimentations (**Pols, 1954 ; Bigalke, 1968 ; Liénard et al., 2015**).

OBJECTIFS ET PRESENTATION DU TRAVAIL

La plupart des espèces du genre *Stomoxys* (Diptera : Muscidae) se trouvent en Afrique et en Asie. En revanche *S. calcitrans* est répandue mondialement (**Showler et Osbrink., 2015**). Comme cela a été développé plus haut, cette espèce a un impact économique majeur sur le bétail, par son rôle pathogène direct (hématophagie) et son rôle vecteur (**Baldacchino et al., 2013**). Peu d'études, publiées à ce jour, se sont consacrées à l'évaluation de la compétence vectorielle des stomoxes dans la transmission des pathogènes (bactéries, virus et parasites) d'une part, et aux moyens de lutte contre ces ectoparasites hématophages, d'autre part. Cela justifie ainsi notre projet de thèse dans ce contexte très particulier de la réémergence de la besnoitiose bovine. Basé sur des études précédentes menées au laboratoire de Parasitologie de l'ENVT et par l'équipe « Besnoitiose et ses vecteurs » de l'UMR IHAP 1225 (**Salem, 2012 ; Liénard et al., 2010 ; Liénard et al., 2013**) et ailleurs (**Bigalke., 1968 ; Alzieu et al., 2007**), il est devenu évident que le rôle des stomoxes dans la transmission mécanique de la besnoitiose nécessitait d'être mieux évalué.

Notre travail s'articule suivant **trois axes** :

1. **La première partie** est une contribution à l'évaluation de la persistance de *B. besnoiti* sous chacune de ces deux formes (bradyzoïtes ou tachyzoïte) chez *S. calcitrans* en utilisant une approche moléculaire (qPCR).
2. Dans la **deuxième partie** de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation, *in vivo*, de la transmission des bradyzoïtes et tachyzoïtes de *B. besnoiti* par les stomoxes au lapin, *Oryctolagus cuniculus*, hôte expérimentalement réceptif et sensible. Différentes techniques ont été employées (qPCR, Western-Blot, immunofluorescence indirecte, formule de numérisation sanguine, immunohistochimie) pour suivre le

devenir du parasite dans ce modèle hétérologue et les conséquences cliniques et lésionnelles de cette infection.

3. La **troisième partie** est consacrée à l'étude du contrôle de populations de stomoxes adultes. Nous avons évalué l'efficacité de différents écrans bleus et écrans imprégnés d'insecticide (deltaméthrine) dans le contrôle des stomoxes sur le campus de l'ENVT à Toulouse et dans une exploitation bovine en Ariège.

PARTIE EXPERIMENTALE

1-Chapitre 1 : Persistance de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans*

1-1- Évaluation de la persistance des bradyzoïtes de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans*

Un essai préliminaire effectué dans notre laboratoire a montré que les mouches d'étables pouvaient acquérir **les bradyzoïtes** de *B. besnoiti* suivant un repas interrompu ou complet sur un bovin en phase de sclérodermie (**Liénard et al., 2013**). Elles pouvaient ensuite transmettre l'ADN tout du moins de ce parasite à du sang de bovin sain contenu dans un nourrisseur artificiel lors de la complétion immédiate de leur repas de sang, le parasite entier lui en revanche n'ayant jamais été observé dans le sang receveur (**Liénard et al., 2013**). La persistance des bradyzoïtes chez le stomoxe n'a cependant pas été évaluée dans cette étude au-delà de 24 heures. Pour faire suite à ce travail et évaluer à plus long terme la persistance des bradyzoïtes de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans*, nous avons repris ce modèle expérimental d'infection des stomoxes par des bradyzoïtes.

1-1-1-Présentation de l'élevage de *S. calcitrans*

Nous avons utilisé l'élevage de stomoxes mis à notre disposition à l'insectarium de l'animalerie du service de parasitologie de l'ENVT, initié par **Salem et al. (2012)** et maintenu par Sonia Gounaud et Martine Roques, techniciennes à l'animalerie de Parasitologie. Nous avons entretenu l'élevage de *S. calcitrans* à partir de 2014 jusqu'à la fin de nos travaux de thèse suivant les conditions décrites par **Salem et al. (2012)**. Brièvement, entre 500 et 800 adultes *S. calcitrans* sont placés dans des cages d'élevage en polypropylène de 30×30×30 cm (BugDorm-1 - DP1000, BioQuip, Compton, États-Unis) (**Figure 17**) à 24 ± 2 ° C, $40 \pm 10\%$ d'humidité relative, avec un cycle de lumière/obscurité de 12h/12h. Ces paramètres d'élevage sont évalués

et ajustés quotidiennement y compris le week-end. Cette contrainte est une condition *sine qua none* pour avoir une colonie active et productrice. L'eau et le miel sont fournis *ad libitum*. À partir de 24h d'âge, les stomoxes reçoivent quotidiennement un à deux repas de sang de bovin prélevé sur une vache de l'ENVV jamais traitée par des insecticides, acaricides ou endectocides. Le sang est recueilli dans une poche à sang de 450 ml avec comme anticoagulant le Citrate-Phosphate-Dextrose adénine (CPDA-1) (Terumo BCT Europe N.V., Zaventem, Belgique). Entre 8 et 10 ml de sang sont versés dans la chambre centrale d'un nourrisseur artificiel en verre. De l'eau à 38,4°C circule dans la chambre externe périphérique et permet de maintenir le sang à cette température. La chambre centrale est close sur sa face inférieure par un film plastique translucide (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, États-Unis). Cette face est posée sur le côté supérieur de la cage d'élevage des adultes (**Salem et al., 2012**). Les imagos absorbent le sang en perçant le film avec leur proboscis. Les cages des adultes sont posées sur un bac en plastique tapissé d'un mélange de vermiculite et de compost et d'herbe stérilisée au four (**Salem et al., 2012**). Un tissu est inséré entre la cage et le mélange afin de récupérer les œufs pondus. La ponte débute 4 à 5 jours après le premier repas sanguin. Les œufs sont collectés quotidiennement et mis dans des bacs inclinés contenant un mélange de vermiculite et de compost additionné de nourriture pour larves et d'eau (**figure 18**). L'angle d'inclinaison permet de créer un gradient d'humidité (**Salem et al., 2012**). Les œufs éclosent 24 à 48h après leur ponte. Le cycle depuis la ponte jusqu'à l'émergence des adultes dure entre 15 à 21 jours.



Figure 17: cages BugDorm-1 d'élevage et de reproduction des *S. calcitrans* adultes (photo originale).



Figure 18: bacs d'élevage des œufs et larves de *S. calcitrans* (photo originale).

Pour l'évaluation de la persistance des bradyzoïtes chez le stomoxe, nous avons utilisé deux vaches hospitalisées à la clinique de pathologie du bétail de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse pour besnoitiose chronique avant leur euthanasie. Ces deux vaches allaitantes de race Limousine et Blonde d'Aquitaine âgées de 16 mois et 6 ans provenaient d'élevages commerciaux du Tarn et de la Haute-Garonne où sévit la besnoitiose bovine. Elles présentaient des symptômes de sclérodermie avancée (**figure 19**) compatible avec une infection par *B. besnoiti*, hypothèse confirmée par examen sérologique positif (western blot) et génétiquement par PCR quantitative à partir d'échantillons cutanés prélevés par biopsie (Biopsy Punch 8, mm®, Kruuse, Langeskov, Danemark



Figure 19: vaches infectées naturellement en phase chronique de la besnoitiose. (Photos Originale).

1-1-2-Protocole expérimental

Quinze lots de 200 mouches adultes âgées de 4 jours environ ont été utilisés selon le protocole exposé brièvement ci-dessous :

- ❖ Groupe contrôle

Afin de vérifier l'absence de contamination par *B. besnoiti* dans l'élevage de stomoxes, trois lots de 200 mouches ont effectué un repas de sang contenu dans un nourrisseur artificiel et issu d'un bovin indemne d'infection par ce parasite pendant 1 heure. L'ADN de *B. besnoiti* a été recherché par PCR quantitative (kit AdiaVet™ Besnoitia (BioX-Diagnostics®, Jemelle, Belgium)) après dissection des mouches dans les pièces buccales, le contenu abdominal et le sang receveur.

❖ Transfert immédiat des stomoxes du bovin au nourrisseur artificiel

Le but de cet essai était d'évaluer la capacité de transfert immédiat de bradyzoïtes par *S. calcitrans* suivant un repas de sang interrompu sur une vache infectée chroniquement à du sang de bovin indemne de besnoitiose contenu dans un nourrisseur artificiel.

Trois lots de 200 mouches contenu dans 3 cages de 15 × 15 × 15 cm entourées d'un fin treillis ont été placés sur l'épaule droite, la ligne du dos et la hanche droite pendant 5 min (**figure 20**). Toutes les mouches n'ont pas le temps d'effectuer un repas de sang complet. Pour accéder aux vaisseaux sanguins, les pièces buccales percent la peau, déchirant les kystes à bradyzoïtes cutanés. Les stomoxes souillent ainsi leurs pièces buccales avec le parasite et ingèrent également des bradyzoïtes (**Bigalke, 1968**). Dès ce délai écoulé, du sang indemne est proposé à ces mouches pendant 1 h dans un nourrisseur artificiel. Elles sont ensuite tuées par le froid négatif (-21°C), disséquées comme pour les lots de contrôle et examinées par PCR quantitative par pool de 50 mouches (soit 8 pools par lot, 4 pools pour le contenu abdominal, 4 pools pour les pièces buccales). Deux millilitres du sang du receveur sont collectés et traités par PCRq (1 ml) et par examen microscopique (1 ml) pour la recherche de parasites entiers mobiles à l'aide d'un microscope inversé (Zeiss Telaval 31®, Carl Zeiss, Le Pecq, France).

❖ Transfert retardé : persistance de bradyzoïtes de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans*

L'objectif est ici d'évaluer la persistance de l'infection par *B. besnoiti* chez *S. calcitrans* après un repas de sang complet sur des vaches infectées chroniquement. Les emplacements de la peau décrits précédemment dans le paragraphe précédent ont été utilisés. Neuf lots de 300 mouches ont effectué un repas de sang complet pendant 15 min sur l'une des deux vaches et l'une des trois zones de la peau. Pour chaque emplacement de peau et pour le lot correspondant de mouches, le deuxième repas de sang (sang non infecté) a ensuite été présenté soit 48 h, 96 h ou 144 h plus tard. Les mouches ont eu de l'eau et du miel immédiatement à la fin de l'exposition aux kystes cutanés à bradyzoïtes jusqu'au deuxième repas de sang. Les lots de *S. calcitrans* et le reliquat de sang du nourrisseur artificiel en verre ont été analysés comme défini dans l'expérience précédente après le second repas de sang.



Figure 20: Positionnement des cages de stomoxes sur les vaches infectées par *Besnoitia besnoiti* (A), traces de piqûre des stomoxes après le repas de sang sur la vache (B) (Photos originale).

Lors de cet essai, nous avons réussi à observer en microscopie un à deux parasites mobiles jusqu'à 48 h dans le sang receveur. Ces parasites observés peuvent provenir de la souillure parasitaire des pièces buccales et/ou de régurgitation (**Butler et al., 1977**). Au-delà de deux jours, seules des traces d'ADN parasite ont été trouvées dans le contenu abdominal des mouches. La destruction rapide des bradyzoïtes avait déjà été mise en évidence par **Bigalke (1968)**. Pour cet auteur, les bradyzoïtes ne persistent pas plus de 3 heures dans le tube digestif

des stomoxes. En effet, le contenu du tube digestif des mouches inoculé à des lapins perd son pouvoir infectieux après ces 3 heures. Nos observations de parasites mobiles à 48 h requièrent en conséquence de nouvelles expérimentations afin d'évaluer si ces parasites observés dans le sang receveur sont encore virulents c'est-à-dire pouvant induire *a minima* une séroconversion d'hôtes sensibles et demeurer capable de se multiplier *in vitro* en cultures cellulaires.

L'ensemble de ces résultats ont été publiés dans l'article ci-dessous dans la Revue de Médecine Vétérinaire en 2017 sous le titre « Assessment of persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) » par Sharif et al, 168, 7-9, 197-203).

1-1-3 –Article: Assessment of persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae)

Assessment of persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae)

S. SHARIF^{1,2}, P. JACQUIET^{1,2}, F. PRÉVOT^{1,2}, C. GRISEZ^{1,2}, E. BOUHSIRA^{1,2}, M. FRANC², E. LIÉNARD^{1,2*}

¹Université de Toulouse, École Nationale Vétérinaire, Institut National de Recherche Agronomique, Unité 1225 IHAP Interaction Hôtes Agents Pathogènes, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex 3, France

²Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires, Université de Toulouse, École Nationale Vétérinaire, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex 3, France

*Corresponding author: e.lienard@envt.fr

SUMMARY

The Stable fly, *Stomoxys calcitrans*, is a common and worldwide distributed blood-feeding fly. It is the vector of numerous pathogens including *Besnoitia besnoiti*, a cyst-forming coccidian parasite of cattle. Infection of stable flies occurs either following the dissection of cutaneous *B. besnoiti* bradyzoites cysts or consumption of tachyzoite-infected blood. Determinants governing the vector competence of *S. calcitrans* for *B. besnoiti* remain poorly known. We addressed here the persistence of *B. besnoiti* bradyzoites on mouthparts and in digestive tract of *S. calcitrans*. Twelve batches of 200 laboratory reared *S. calcitrans* were fed on *B. besnoiti* chronically infected cows either 5 min (three batches, interrupted blood meal) or 15 min (nine batches, complete blood meal). After this infective exposure, flies completed their meal with *B. besnoiti*-free blood during one hour, either immediately (short exposure) or 48, 96, 144h later. Quantitative PCR was used for *B. besnoiti* DNA detection in the recipient blood, the mouthparts and the abdominal content. Recipient blood was microscopically examined to find entire parasites. Very few motile parasites were observed until 48 h in the recipient blood. Beyond this point, only parasite DNA traces were recovered in some abdominal content of stable flies. The fast destruction of bradyzoites in 48 h suggests that mechanical transmission could occur only in brief time periods between feeds. New experimental infections are required to assess if these observed parasites could induce seroconversion in susceptible hosts or are infective for cell cultures.

Keywords: Cattle besnoitiosis, bradyzoites, stable fly, mechanical vector

RÉSUMÉ

Évaluation de la persistance des bradyzoïtes de *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) chez *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae)

Le Stomoxe, *Stomoxys calcitrans*, est une mouche piqueuse banale et cosmopolite vectrice de nombreux agents pathogènes, dont *Besnoitia besnoiti*, protozoaire parasite des bovins. Les mouches se contaminent soit en perceant des kystes à bradyzoïtes cutanés soit en ingérant des tachyzoïtes sanguins. La compétence vectorielle de *S. calcitrans* pour *B. besnoiti* demeurent mal connus. Nous avons évalué la persistance des bradyzoïtes de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans* (proboscis et tube digestif). Douze lots de 200 *S. calcitrans* élevés en laboratoire ont été nourris sur des vaches chroniquement infectées par *B. besnoiti* pendant 5 min (trois lots, repas interrompu) ou pendant 15 min (neuf lots, repas complet). Les mouches ont ensuite été exposées pendant une heure à du sang indemne de *B. besnoiti* soit immédiatement (exposition courte) soit 48, 96, 144h plus tard. La PCR quantitative a été utilisée pour la détection d'ADN de *B. besnoiti* dans le sang receveur, les parties buccales et le contenu abdominal. Le sang receveur a été examiné au microscope pour rechercher des parasites entiers. Quelques parasites mobiles ont été observés jusqu'à 48 h dans le sang receveur. Au-delà de ce point, seules des traces d'ADN parasitaire ont été trouvées dans le contenu abdominal des mouches. La destruction rapide des bradyzoïtes en 48 h suggère que la transmission mécanique ne peut se produire que peu de temps après le repas infectant. D'autres infections expérimentales sont nécessaires pour évaluer si ces parasites peuvent induire une séroconversion des hôtes sensibles ou demeurent infectieux pour des cultures cellulaires.

Mots-clés : Besnoitiose bovine, bradyzoïtes, mouche charbonneuse, vecteur mécanique

Introduction

The cosmopolitan Stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) is one of the major arthropod pests of livestock and occasionally a biting nuisance of humans [14, 28]. Both sexes of adult imagoes are obligate blood feeders. Their economic impact may exceed annually US\$2 billion in the United States alone for the cattle industry [29] inducing milk production reduction and weight losses [5, 7, 22]. They are persistent feeders, inflicting painful bites resulting in interruption of blood meal by host defensive behaviour [26]. The blood meal completion is then performed on the same host or on nearby animals [11]. Besides the animal harassment and blood losses, they are vectors of more than 20 arthropod-borne infectious agents including viruses, bacteria, rickettsia, protozoa, and helminths of veterinary

and zoonotic importance [3]. The frequent interrupted blood feeding is known to dramatically increase the risk of mechanical pathogen transmission by regurgitation of part of a previous blood meal or passive transfer of contaminated blood on mouthparts [8]. This jeopardy is moreover enhanced by the survival ability of the implied pathogens inside or on the vector. For instance, *Trypanosoma evansi* remains infective up to 480 min in *Stomoxys niger niger* in the digestive tract but less than 7 minutes in or on the proboscis [27].

Among this wide panel of pathogens, the protozoan *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913), a cyst-forming Apicomplexa, has received more attention since 2010 when it has been considered as a re-emerging parasite by the European Food Safety Authority [12]. It is the causative agent of cattle besnoitiosis which has spread for about 20

years from its European historic enzootic areas (Portugal, Spain, and southern France) [16] towards various European countries: Italy [1], Germany [18], Switzerland [4], Hungary [15], Croatia [9], Greece [20], Belgium [30] and Ireland [23]. Intensification of international cattle trading could probably contribute largely to this parasite importation in new countries [19]. In recently infected cattle herds, the seroprevalence increases quickly and up to 20% of newly contaminated cattle could exhibit clinical signs with fever and oedemas, sometimes mortality and abortion, male transient or definitive sterility and, later, for the chronic phase of the disease, numerous scleroderma cysts containing thousands of bradyzoites [16, 21]). Blood-sucking flies including *S. calcitrans*, could participate to the rapid and local spread of the disease within herds by piercing skin bradyzoite cysts or ingesting tachyzoites in blood [6, 17]. Among the various factors affecting the vector transmission of cattle besnoitiosis, the survival of *B. besnoiti* in *S. calcitrans* between two successive blood meals remains poorly studied [6]. However, this important feature could be implied in dissemination of the parasites between herds, taking account that stable flies could feed at least once a day [24] and are able to fly up to 7.1 km per day when searching for a host [2]. Estimation of persistence has been based mainly on the inoculation to susceptible rabbits of triturated abdominal contents of infected *S. calcitrans* at different intervals of time after an infective blood meal [6]. No clinical signs have been observed on rabbits which were inoculated with triturated abdominal contents of *S. calcitrans* 3 hours after the infective blood meal [6]. The same study performed on tabanids has showed that parasite could remain viable and infective to rabbits up to 24 h post feeding [6]. Nevertheless, inoculation of triturated abdominal contents is insufficient to assess the suspected natural route of contamination which involves parasite passage via the mouthparts. Moreover, presence of *B. besnoiti* DNA in or on stable fly proboscis and in recipient blood (where flies were allowed to achieve their blood meal) has been recorded until 24 h after the exposure to skin of cow in scleroderma stage of the disease [17]. Founded on these previous results, the aim of this study was to investigate the persistence of *B. besnoiti* within and on the mouthparts of stable flies and within their digestive tract beyond 24 h following an initial blood meal on *B. besnoiti* chronically infected cows.

Material and methods

SOURCE AND MAINTENANCE OF INSECTS

Stable flies were obtained from a colony established and maintained in the laboratory of the École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT, France) since 2009 as previously described [24].

A total of three thousand newly emerged stable fly adults aged 4 ± 2 days old was used with a 1: 1 sex ratio for this study.

SOURCE OF BESNOITIA BESNOITI BRADYZOITES

Two cows (Limousine breed, number 1330, Blonde d'Aquitaine breed, number 1575) suffering from severe chronic besnoitiosis were used as a source of *B. besnoiti* bradyzoites. They came from commercial herds in Tarn and Haute-Garonne French departments respectively. They were 16 months old (1330) and 6 years old (1575). They were referred to the large animal hospital of the ENVT for necropsy examination. Serological confirmation of cattle besnoitiosis was performed by in-house Western blot analysis (see below). For the following experiments (experiments 2 and 3, see below), three selected skin areas (right shoulder, back line and right hip of 90 cm²) were shaved the day before the trials. The skin parasite burden per 500 mg of skin sample was assessed with quantitative PCR (see below) from biopsies of three skin locations described above (Biopsy Punch 8 mm[®], Kruuse, Langeskov, Denmark).

SOURCE OF BESNOITIA BESNOITI FREE BLOOD

A seven year-old cow maintained at the ENVT provided uninfected *Besnoitia besnoiti* blood for experimental transmission trials. This cow had not received any insecticide treatment for seven years. It was serologically negative for *B. besnoiti* during this period as regularly confirmed by in-house Western blot analysis. The blood was collected for all experiments the day before the experiment in 4-ml tubes containing 6.3 mg EDTA-K3 (Terumo Europe N.V. [®], Leuven, Belgium) and stored at 4°C for 24 hours.

EXPERIMENTAL DESIGN

Batches of two hundred stable fly imagoes per cage were starved 48 hours for blood and 24 hours for bee honey before the trials. Tap water was available *ad libitum*.

EXPERIMENT 1 – CONTROL GROUP

To assess the absence of a *B. besnoiti* contamination of the laboratory-bred stable flies, a batch of 200 *S. calcitrans* was fed on 8 ml uninfected blood from the *B. besnoiti*-free cow contained in a double-chambered glass feeder placed in contact with the upper side of the cage during 1 h. The flies were maintained in mesh cages (30 × 30 × 30 cm). The glass feeder containing the uninfected blood was warmed up to 38.4°C and was closed with two Parafilm membranes (Parafilm 3 M[®], Pechiney Plastic Packaging, Chigago, IL, USA) for fly bites. The stable flies were maintained in a room at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with 12:12 hours light:dark photoperiod and $40 \pm 10\%$ relative humidity (RH). After the exposure, two ml of the recipient blood were collected, one ml used for qPCR analysis and one ml diluted in 5 ml of sterile PBS for extemporaneous microscopic examination of *B. besnoiti* presence (Zeiss Telaval 31[®], Carl Zeiss, Le Pecq, France). All the flies were killed at -20°C for 1 h and dissected [17]. The proportions of engorged flies were evaluated in each

assay. Mouthparts were manually removed and pooled into a grinding tube containing 1.4 ml of PBS (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France). Abdominal contents were collected and pooled into the same sterile 4-ml tube containing 60 USP U Lithium Heparin (Terumo Europe N.V.®, Leuven, Belgium) and 2 ml of PBS. Presence of *B. besnoiti* DNA was assessed by quantitative PCR (see below) in mouthpart, abdominal content and recipient blood samples. This trial was then repeated twice again.

EXPERIMENT 2 – IMMEDIATE TRANSFER OF *B. BESNOITI* BRADYZOITES BY *S. CALCITRANS* AFTER THE INFECTED BLOOD MEAL

The aim of this trial was to assess the undelayed transfer of bradyzoites by stable flies following an interrupted blood meal on a chronically infected cow to a *B. besnoiti*-free bovine blood contained in an artificial glass feeder.

A cage of 15 × 15 × 15 cm enclosed by thin wire mesh containing 200 *S. calcitrans* was put on each of the three skin locations. Stable flies were allowed to ingest blood for 5 minutes [10] on cow number 1330 (blood meal 1). Immediately after, *B. besnoiti*-free blood (*ie* recipient blood) was given to these flies to achieve their blood meal during 1 h in the same laboratory conditions as for experiment 1 (blood meal 2). After one hour, all stable flies were killed and dissected as previously described for the control group for qPCR analyses. Two milliliters of the recipient blood were collected and processed by qPCR and microscopic examination

EXPERIMENT 3 – DELAYED TRANSFER AND PERSISTENCE OF *B. BESNOITI* BRADYZOITES WITHIN *S. CALCITRANS*

The aim of this trial was to assess the persistence of *B. besnoiti* infection within stable flies after a complete blood meal on chronically infected cows. The skin locations described previously in experiment 2 were used. Different batches of 300 stable flies maintained in a cage, as previously described, performed a complete blood meal during 15 min on one of the two cows and one of the three skin areas (blood meal 1). For each skin location (and for the corresponding batch of flies), the second blood meal, consisting of uninfected blood (blood meal 2), was then presented either 48 h (cow 1330), 96 h or 144 h (cow 1575) later. Flies were provided with water and honey bee immediately at the end of the cow skin exposure until the second blood meal. The batches of stable flies and the remaining blood in the glass feeder were analyzed as defined in experiment 2 after the second blood meal.

LABORATORY PROCEDURES

Serological analysis

The sera from the uninfected and the two chronically infected cows were analyzed by an in-house Western-Blot as previously described [17].

Detection of *B. besnoiti* DNA

Quantitative PCR was used to detect *B. besnoiti* DNA from infected bovine skin samples (after their necropsies) in the three skin areas used for infection of stable flies, from mouthparts and abdominal contents of *S. calcitrans* and from blood of glass feeders (before and after transmission trials). Mouthparts of stable flies were ground with the TeSeE™ Purification Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's recommendation. DNA extraction was achieved with the commercial kit QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen®, Courtabœuf, France). *B. besnoiti* ITS-1 amplification was performed with the commercial PCR kit AdiaVet™ Besnoitia (BioX-Diagnostics®, Jemelle, Belgium) and with the Stratagene MX3005P thermal cycler (Agilent Technologies®, La Jolla, CA). Positive and negative controls were provided by the manufacturer. Results were analyzed using the MxPro QPCR version 4.10 software (Agilent Technologies®, La Jolla, CA). A threshold cycle (Ct) value, equal or superior to 40 corresponded to any parasite DNA detection.

Standard curve and reproducibility of the detection of *B. besnoiti* ITS-1

Purified *B. besnoiti* tachyzoites were isolated from the skin of chronically infected heifer coming from the French Dordogne department. They have been maintained on Vero Cells at the laboratory since 2015. They were at the weekly passage 124. They were used to generate a standard curve assessing the detection limit of the qPCR of the commercial PCR kit AdiaVet™ Besnoitia. DNA extraction of a suspension of 10⁵ *B. besnoiti* culture tachyzoites was performed as described above and serially diluted 10-fold in PBS ranging from 10⁵ to 1 parasite equivalents per milliliter of PBS (par. eq./mL). The standard curve was generated with Ct values (*y*-axis) plotted against the log of the number of par. eq. (*x*-axis). The amplification efficiency (E) of the qPCR was calculated with the formula $E = (10^{-(1/S)}) - 1$ where S was the slope of the standard curve. To determine the inter-assay reproducibility, three replicates of 10-fold serial dilutions of *B. besnoiti* DNA (between 1 and 10⁵ tachyzoites) were performed. The intra-assay reproducibility was assessed on three replicates using one range of the previous DNA dilutions used in the inter-assay reproducibility.

DATA ANALYSIS

The obtained CT values were transformed into the number of parasites according to the equation of the linear

regression of the standard curve estimated with Microsoft™ Excel 2013 software (Microsoft Corporation™, Redmond, Washington, USA). The arithmetic means, standard deviations, and coefficients of variation of the dilution ranges were computed with Microsoft™ Excel 2013 software. Parasite burden between the two cows considering all skin locations together were compared with the permutation test (exact procedure) implemented in the software package StatXact® release 10.0 (Cytel Software Corporation, Cambridge, Massachusetts, USA) with a significant threshold of 0.05.

Results

The efficiency (E) of the qPCR by combination of the intra- and inter-assays was 92%, with a strong linear correlation ($R^2 = 0.9996$), a y-intercept value of 40.405, and a slope of -3.5318 (Figure 1). The detection limit was found to be 10 parasite equivalents, corresponding to a mean Ct value of 36.82 ± 0.87 . Amplifications of lower numbers of parasite equivalents (< 10) provided inconstant and non-reproducible Ct values even when after increase of the number of amplification cycles (data not shown). The coefficients of variation were low, ranged from 0.34% for 10^4 par. eq./ml to 2.36% for 10 par. eq./ml showing strong reproducibility.

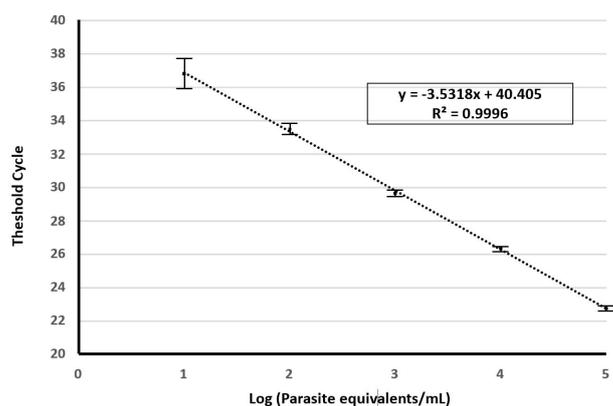


FIGURE 1: Reportable range (\pm standard deviation) for *B. besnoiti* detection and quantification by qPCR. qPCR was carried out with serial diluted DNA extracted from parasite cultivated samples, ranging from 10^5 to 10 par. eq./mL, tested in six replicates each (combination of 3 intra- and 3 inter-assays). The equation obtained by linear regression is indicated in the chart.

Neither batches of *S. calcitrans* nor the cattle recipient blood were found positive for *B. besnoiti*-specific qPCR among the three replicates of experiment 1.

The skin parasite loads, determined by qPCR, varied from 5,866,678 to 13,253,057 parasite equivalents per 500 mg of skin sample, whatever the skin location and the cow (Table I). The mean numbers of parasite equivalents, considering all the three skin locations together, were $11,745,994 \pm 2,610,311$ for the cow 1330 and $10,790,931 \pm 4,264,528$ for the cow 1575 and were not significantly different ($p > 0.05$).

Mortality rates of stable flies maintained for 48, 96 and 144 hours after the infectious blood meal intervals ranged from 5

to 10 %. The proportions of engorged flies, assessed visually by the same operator during the whole study, reached 65 – 70% for experiment 2 (5 min of exposure) and varied from 85 to 90% for experiments 1 and 3 (15 min of exposure).

For the experiment 2 (immediate transfer), the number of parasite equivalents was low (less than 100 parasite DNA equivalents) in mouthparts and recipient blood compartments and highest in the abdominal contents, more than 150,000 parasite equivalents (Tables I and II). One or two *B. besnoiti* bradyzoites were observed motile in the recipient blood (Table III).

Parasite DNA continued to be detectable 48h after feeding (experiment 3) but the number of parasite equivalents has dramatically decreased in *S. calcitrans* (less than 20, Table I). No parasite DNA was found in one out three mouthpart samples and two out three abdominal contents (Table I). Some rare motile parasites (one or two) were observed in the recipient blood (Table III). In parallel, no parasite DNA could be detected in the recipient blood because this number was below the detection limit of the qPCR (Figure 1, Table II). Beyond 48h interval between blood meals, no parasite DNA was recovered on *S. calcitrans* mouthparts whereas parasite DNA traces were still found in abdominal contents corresponding to less than 10 parasite equivalents (Table I). At 144h, no evidence of parasite DNA was recovered. In the recipient blood, neither motile parasites nor parasite DNA were detected at 96 and 144h intervals (Tables II and III).

Discussion

This study investigated the persistence of *B. besnoiti* in *S. calcitrans*, using a quantitative molecular approach after exposure to infected cattle during 5 or 15 min. The parasite burden in cows and stable flies was assessed with the standard curve which showed good reproducibility and sensitivity. These parasite equivalent data were not provided in previous studies [17, 25].

Following the results of the experiment 1, the laboratory colony of stable flies established for eight years was thus considered *B. besnoiti* free. It was not possible to use the same cow for all persistence trials because infected cattle should be quickly culled for ethical reasons. Both cows were considered suitable and equivalent sources of *B. besnoiti* bradyzoites for stable flies, no significant difference of parasite burden was found between them. However, parasite cyst distribution was subjected to parasite burden variations as reported before [6, 13, 25].

The conditions of experiment 2 were close to field conditions, where interrupted blood meals are the rule [26]. As previously demonstrated [6, 17], stable flies were able to contaminate their mouthparts and to ingest *B. besnoiti* bradyzoites by piercing cysts in cow skin. This verification was crucial for the exploration of the long-term parasite persistence (experiment 3).

		Time interval between blood meals 1 and 2 (h)			
		0 ^a	48 ^b	96 ^b	144 ^b
Mouthparts	Shoulder	65	18	ND	ND
	Back line	65	ND	ND	ND
	Hip	< 10	< 10	ND	ND
Abdominal content	Shoulder	162,603	< 10	ND	ND
	Back line	598,971	ND	< 10	ND
	Hip	162,603	ND	< 10	ND

^a interrupted blood feeding on cow number 1330 with skin Ct values: 15 (shoulder and back line), 16 (hip) corresponding to 13,253,057 and 8,731,866 *B. besnoiti* bradyzoite equivalents respectively in 500 mg of skin sample

^b complete blood feeding on cow number 1575 with skin Ct values: 17 (shoulder), 15 (back line and hip) corresponding to 5,866,678 and 13,253,057 *B. besnoiti* bradyzoite equivalents respectively in 500 mg of skin sample

ND: *B. besnoiti* DNA not detected

TABLE I: Number of *B. besnoiti* bradyzoite equivalents in *S. calcitrans* mouthparts and abdominal contents at the end of the blood meal 2

		Time interval between blood meals 1 and 2 (h)			
		0 ^a	48 ^b	96 ^b	144 ^b
Cow skin location for blood meal 1	Shoulder	240	ND	ND	ND
	Back line	34	ND	ND	ND
	Hip	240	ND	ND	ND

^a interrupted blood feeding on cow number 1330 with skin Ct values: 15 (shoulder and back line), 16 (hip) corresponding to 13,253,057 and 8,731,866 *B. besnoiti* bradyzoite equivalents respectively in 500 mg of skin sample

^b complete blood feeding on cow number 1575 with skin Ct values: 17 (shoulder), 15 (back line and hip) corresponding to 5,866,678 and 13,253,057 *B. besnoiti* bradyzoite equivalents respectively in 500 mg of skin sample

ND: *B. besnoiti* DNA not detected

TABLE II: Number of *B. besnoiti* bradyzoite equivalents in the recipient blood at the end of the blood meal 2

		Time interval between blood meals 1 and 2 (h)			
		0 ^a	48 ^b	96 ^b	144 ^b
Cow skin location for blood meal 1	Shoulder	+	+	-	-
	Back line	+	+	-	-
	Hip	+	+	-	-

^a interrupted blood feeding on cow number 1330 with skin Ct values: 15 (shoulder and back line), 16 (hip) corresponding to 13,253,057 and 8,731,866 *B. besnoiti* bradyzoite equivalents respectively in 500 mg of skin sample

^b complete blood feeding on cow number 1575 with skin Ct values: 17 (shoulder), 15 (back line and hip) corresponding to 5,866,678 and 13,253,057 *B. besnoiti* bradyzoite equivalents respectively in 500 mg of skin sample

+: one or two parasites seen

-: no detected parasite

TABLE III: Visual examination of parasites in recipient blood at the end of the blood meal 2

No difference concerning mortality rates was found between batches of *S. calcitrans* exposed to bradyzoites and control batches suggesting that ingested bradyzoites do not interfere with the longevity of stable flies at least during the interval of time considered in this study. As expected, the longest exposure time has led to highest engorgement rates and probably (but not assessed here) an increase of parasite burden within stable flies.

A complete destruction and evacuation of bradyzoites has occurred 144h after the blood meal 1. The parasites can be

retained viable in the mouthparts but probably for a very short time between feeds because they did not provide conducive conditions for *B. besnoiti* persistence. Indeed, no transmission of parasites to rabbits has been observed one hour after an infective blood meal [6]. Moreover, all along these trials, the stable flies had the opportunity to clean their mouthparts through different ways: grooming behavior, washing in water and bee honey, but also by transfer to the newly presented blood. Feeding regurgitation of viable parasites from the digestive tract is an alternative to mouthparts contamination [8]. However, the hostile environmental conditions of the fly

gut did not probably allow the parasite survival due to the presence of numerous proteases and lysins which can destroy quickly pathogens, such as shown for *Trypanosoma* sp. [27].

To conclude, the observation of some motile *B. besnoiti* bradyzoites 48h after an infective blood meal in the recipient blood could be considered as anecdotic, and the motility does not mean that these parasites are viable and virulent. The protocol used here was not addressed to assess these both pivotal features for transmission. As noticed by Bigalke (1968), if mechanical *B. besnoiti* transmission by *S. calcitrans* is of significance in the epidemiology of cattle besnoitiosis, the conditions under it may occur are very restrictive and probably limited between cattle belonging to the same herd. No definitive conclusion can be drawn concerning the maintenance of virulence of these parasites at 48h and this point required further investigations by inoculation to susceptible hosts and cell cultures. Aged parasites may have probably loss their infectious potential. Moreover, it remains unknown if these extremely low parasite burden could induce a host immunological response. Indeed, the minimal dose of parasite required to induce host seroconversion has never been clearly elucidated to the authors' knowledge and should be determined.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank gratefully Martine Roques and Sonia Gounaud for their technical assistance.

References

1. - AGOSTI M., BELLOLI A., MORINI M., VACIRCA G.: Segnalazione di un focolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. *Praxis*, 1994, **15**, 5–6.
2. - BAILEY D.L., WHITFIELD T.L., SMITTLE B.J.: Flight dispersal of stable fly. *J. Econ. Entomol.*, 1973, **66**, 410–411.
3. - BALDACCHINO F., MUENWORN V., DESQUESNES M., DESOLI F., CHAROENVIRIYAPHAP T., DUVALLET G.: Transmission of pathogens by *Stomoxys flies* (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, 2013, **20**, 26.
4. - BASSO W., LESSER M., GRIMM F., HILBE M., SYDLER T., TROESCH L., OCHS H., BRAUN U., DEPLAZES P.: Bovine besnoitiosis in Switzerland: imported cases and local transmission. *Vet. Parasitol.*, 2013, **198**, 265–273.
5. - BERRY I.L., STAGE D.A., CAMPBELL J.B.: Populations and economic impacts of stable flies on cattle. *Trans. ASAE.*, 1983, **26**, 873–877.
6. - BIGALKE R.D.: New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort. J. Vet. Res.*, 1968, **35**, 3–137.
7. - BRUCE W.N., DECKER G.C.: The relationship of stable fly abundance to milk “production in dairy cattle. *J. Econ. Entomol.*, 1958, **52**, 269–274.
8. - BUTLER J.F., KLOFT W.J., DUBOSE L.A., KLOFF E.S.: Recontamination of food after feeding a ³²P food source to biting Muscidae. *J. Med. Entomol.*, 1977, **27**, 874–877.
9. - CORTES H., LEITÃO A., GOTTSTEIN B., HEMPHILL A.: A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916). *Parasitol.*, 2014, **141**, 1406–1417.
10. - DOUGHERTY C.T., KNAPP F.W., BURRUS P.B., WILLIS D.C., CORNELIUS P.L.: Behaviour of grazing cattle exposed to small population of stable flies (*Stomoxys calcitrans* L.). *App. Anim. Behav. Sci.*, 1995, **42**, 231–248.
11. - DOYLE M.S., SWOPE B.N., HOGSETTE J.A., BURKHALTER K.L., SAVAGE H.M., NASCI R.S.: Vector competence of the stable fly (Diptera: Muscidae) for West Nile Virus. *J. Med. Entomol.*, 2011, **48**, 656–668.
12. - EFSA: Bovine besnoitiosis: an emerging disease in Europe. *EFSA J.*, 2010, **8**, 1499–1514
13. - FREY C.F., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., ORTEGA-MORA L.M., BENAVIDES J., MARCÉN J.M., CASTILLO J.A., CASASÚS I., SANZ A., GARCÍA-LUNAR P., ESTEBAN-GIL A., ÁLVAREZ-GARCÍA G.: Chronic bovine besnoitiosis: Intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases. *Vet. Parasitol.*, 2013, **197**, 95–103.
14. - HOGSETTE J.A., RUFF J.P., JONES C.J.: Stable fly biology and control in northwest Florida. *J. Agr. Entomol.*, 1987, **4**, 1–11.
15. - HORNOK S., FEDAK A., BASKA F., HOFMANN-LEHMANN R., BASSO W.: Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary. *Parasit. Vectors*, 2014, **7**, 20.
16. - JACQUIET P., LIÉNARD E., FRANC M.: Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Vet. Parasitol.*, 2010, **174**, 30–36.
17. - LIÉNARD E., SALEM A., JACQUIET P., GRISEZ C., PRÉVOT F., BLANCHARD B., BOUHSIRA E., FRANC M.: Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitol. Res.*, 2013, **112**, 479–486.
18. - MEHLHORN H., KLIMPEL S., SCHEIN E., HEYDORN A.O., AL-QURAIHY S., SELMAIR J.: Another African disease in Central Europe: besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. *Parasitol. Res.*, 2009, **104**, 861–868.
19. - OLIAS P., SCHADE B., MEHLHORN H.: Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia*

- species (Protozoa: Sarcocystidae). *Infect. Genet. Evol.*, 2011, **11**, 1564-1576.
20. - PAPADOPOULOS E., ARSENOS G., PTOCHOS S., KATSOULOS P., OIKONOMOU G., KARATZIA M.A., KARATZIAS H.: First report of *Besnoitia besnoiti* seropositive cattle in Greece. *J. Hell. Vet. Med. Soc.*, 2014, **65**, 115-120.
 21. - POLS J.W.: Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort. J. Vet. Res.*, 1960, **28**, 265-356.
 22. - RODRÍGUEZ-BATISTA B.Z., LEITE R.C., OLIVEIRA P.R., LOPES C.M.L., BORGES L.M.F.: Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2005, **130**, 343-346.
 23. - RYAN E.G., LEE A., CARTY C., O'SHAUGHNESSY J., KELLY P., CASSIDY J.P., SHEEHAN M., JOHNSON A., DE WAAL T.: Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd. *Vet. Rec.*, 2016, **178**, 608.
 24. - SALEM A., FRANC M., JACQUIET P., BOUHSIRA E., LIÉNARD E.: Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. *Parasite*, 2012, **19**, 309-317.
 25. - SCHARES G., LANGENMAYER M.C., MAJZOUB-ALTWECK M., SCHARR J.C., GENTILE A., MAKSIMOV A., SCHARES S., CONRATHS F.J., GOLLNICK N.S.: Naturally acquired bovine besnoitiosis: Differential distribution of parasites in the skin of chronically infected cattle. *Vet. Parasitol.*, 2016, **216**, 101-107.
 26. - SCHOFIELD S., TORR S.J.: A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Med. Vet. Entomol.*, 2002, **16**, 177-185.
 27. - SUMBA A.L., MIHOK S., OYIEKE F.A.: Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. *Med. Vet. Entomol.*, 1998, **12**, 417-422.
 28. - TAYLOR D.B., BERKEBILE D.R.: Comparative efficiency of six stable fly traps. *J. Econ. Entomol.*, 2006, **99**, 1415-1419.
 29. - TAYLOR D.B., MOON R.G., MARK D.R.: Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy and beef cattle production. *J. Med. Entomol.*, 2012, **49**, 198-209.
 30. - VANHOUDT A., PARDON B., DE SCHUTTER P., BOSSELER L., SARRE C., VERCRUYSSSE J., DEPREZ P.: First confirmed case of bovine besnoitiosis in an imported bull in Belgium. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 2015, **84**, 205-211.

1-2 - Évaluation de la persistance des tachyzoïtes de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans*

En phase aiguë de besnoitiose bovine, des tachyzoïtes circulent dans le sang, c'est la phase de parasitémie (**Bigalke, 1968**). Ces derniers sont susceptibles d'être prélevés par les arthropodes piqueurs dont les stomoxes. L'essai préliminaire effectué par **Liénard et al. (2013)** dans notre laboratoire a montré aussi que les mouches d'étables pouvaient acquérir les **tachyzoïtes** de *B. besnoiti* et les transmettre à du sang de bovin non infecté. Mais dans cette étude, la persistance des tachyzoïtes chez les stomoxes n'a pas été évaluée. Faisant suite à ce travail et à nos résultats sur les bradyzoïtes, nous avons suivi la persistance des tachyzoïtes chez *S. calcitrans* à la suite d'un repas de sang de bovin dans lequel il a été additionné artificiellement une quantité connue de tachyzoïtes de culture.

1-2-1 Source et préparation des tachyzoïtes

Les tachyzoïtes de *B. besnoiti* utilisés dans cette expérience sont issus d'un isolat provenant d'une vache Limousine en phase chronique de besnoitiose et provenant d'un élevage commercial dans le département de la Dordogne (Nouvelle-Aquitaine). Cet isolat est maintenu *in vitro* sur cellules Vero depuis 2015 (**figure 21**). Les étapes critiques de l'obtention de la solution de tachyzoïtes pour l'étude de la persistance sont présentées ici succinctement. Le surnageant des flacons de culture contenant des tachyzoïtes est récupéré puis centrifugé à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec 35 ml de PBS et centrifugé à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est suspendu à nouveau dans un ml de PBS pour comptage des tachyzoïtes sur lame de Malassez. En fonction du nombre de tachyzoïtes comptés, la suspension est réajustée avec le volume de sang de bovin indemne prélevé le jour précédent dans de l'EDTA nécessaire pour obtenir une solution à la concentration de 10^8 tachyzoïtes/ml.



Figure 21: étuve contenant les flasques de culture de tachyzoïtes de *B. besnoiti* sur cellules Vero et préparation de solutions de tachyzoïtes pour l'étude de la persistance. (Photos originales)

1-2-2- Modèle expérimental

Trente lots de 200 stomoxes de 4 jours (± 2 jours) ont été utilisées. Ces mouches sont à jeun de sang 48h avant les essais et d'eau et miel 24 h auparavant.

❖ Transfert immédiat de tachyzoïtes de sang infecté expérimentalement à du sang sain

Trois lots de 200 mouches ont pris un premier repas de sang contenant 10^8 tachyzoïtes/ml pendant 5 min présenté sous forme de 48 gouttes de $20 \mu\text{l}$ (**Figure 22**). Il s'est avéré nécessaire de proposer le sang contenu dans des puits de lames d'immunofluorescence car des mises au point préalables ont montré que le nombre de mouches gorgées était plus important avec ce système qu'avec le nourrisseur artificiel compte tenu de cette durée d'exposition aussi brève (**Figure 22**). De plus, la totalité du sang est ingéré par les 200 mouches avec ce dispositif sans qu'il ne se dessèche du fait de la faible quantité proposée ($960 \mu\text{l}$). Un second repas de sang indemne a ensuite été présenté immédiatement pendant une heure dans le nourrisseur artificiel.

❖ Transfert retardé de tachyzoïtes de sang infecté expérimentalement à du sang sain

Pour cette étude, 24 lots de 200 mouches ont effectué un premier repas de sang infecté par 10^8 tachyzoïtes/ml pendant 5 min. Le second repas de sang sain d'une durée d'1 h a été proposé 1h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h ou 120 h plus tard dans le nourrisseur en verre. Pour chacun des 8 intervalles de temps testés, il y a eu 3 répliques de 200 mouches. Au-delà de 24 h d'intervalle entre les deux repas de sang, de l'eau et du miel a été proposé *ad libitum*.

❖ Groupes contrôle

Trois lots de 200 mouches ont été utilisés comme groupes contrôle : le premier repas proposé pendant 5 min était du sang de bovin indemne de contamination par *B. besnoiti*. À la fin de ces 5 min, un second repas de sang sain a été proposé pendant 1 h.

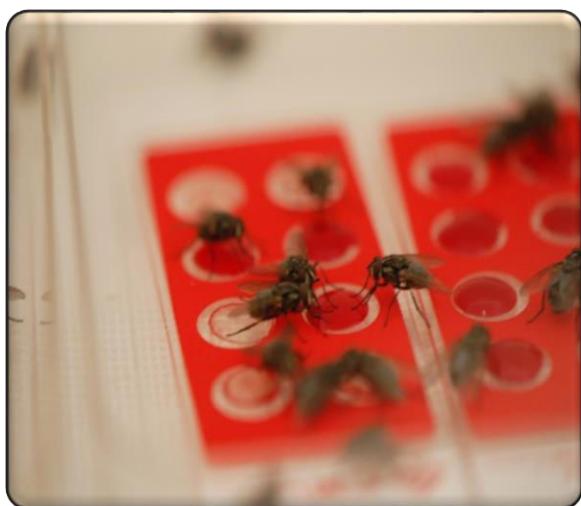
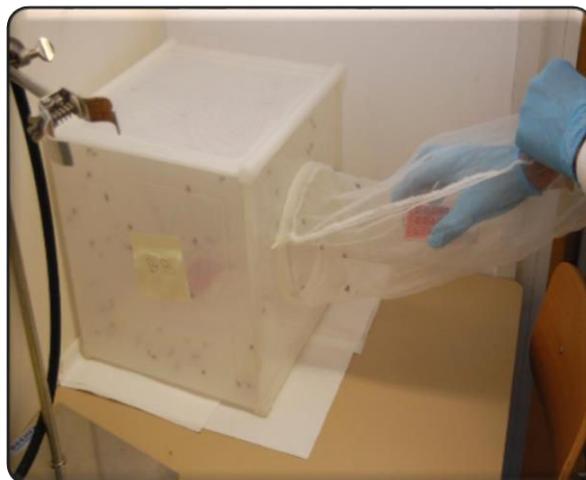


Figure 22: exposition des stomoxes au sang infecté aux tachyzoïtes. (Photos originales)

Une fois la seconde exposition au sang receveur terminée, les stomoxes sont sacrifiés et les analyses sont réalisées suivant le même protocole que pour l'étude sur la persistance des bradyzoïtes.

Les valeurs de Ct (cycle threshold) sont converties en nombre d'équivalents de parasites selon l'équation suivante de la courbe standard décrite dans (Sharif et al., 2017).

1-2-3-Résultats

La quantité d'ADN parasitaire détectée diminue dans les pièces buccales et le contenu abdominal des stomoxes au fur et à mesure du temps (**tableau 2**). Au-delà de 96 h après le repas de sang artificiellement infecté, il n'y a plus de mise en évidence d'ADN parasitaire ni dans les pièces buccales ni dans le contenu abdominal de chacun des réplicas. La présence de parasite dans le sang receveur est observée par PCR quantitative jusqu'à 48h et pour un seul réplica (**tableau 3**). Quelques tachyzoïtes mobiles (entre 1 et 3) ont été observés jusqu'à 96 h par microscopie inversée dans un réplica sur trois (**tableau 4**).

Tableau 2: nombre d'équivalents de parasite détectés par qPCR dans les pièces buccales et contenus abdominaux des stomoxes

		Intervalle de temps en h entre les repas de sang 1 et 2							
		Réplica	0	3	6	24	48	72	96
Pièces buccales	1	65	240	240	18	<10	<10	<10	N.D.
	2	34	65	125	<10	<10	<10	<10	N.D.
	3	34	65	18	<10	N.D.	<10	<10	N.D.
Contenu abdominal	1	$8,12 \cdot 10^6$	$8,12 \cdot 10^6$	$4,23 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^4$	65	65	N.D.
	2	$4,23 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^3$	<10	18	N.D.
	3	$4,23 \cdot 10^6$	$4,23 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^4$	<10	<10	<10	N.D.

N.D. : non détecté

Tableau 3: nombre d'équivalents de parasite détectés par qPCR dans le sang receveur.

	Intervalle de temps en h entre les repas de sang 1 et 2							
Réplica	0	3	6	24	48	72	96	120
1	125	125	<10	N.D.	<10.	N.D.	N.D.	N.D.
2	< 10	34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	< 10	< 10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : non détecté

Tableau 4: observation microscopique de tachyzoïtes mobiles dans le sang receveur.

	Intervalle de temps en h entre les repas de sang 1 et 2							
Réplica	0	3	6	24	48	72	96	120
1	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Non
2	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non
3	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non

1-2-4-Discussion et conclusion

Comme cela a été observé avec les bradyzoïtes, il n'y a pas d'augmentation du nombre de parasites au fur et à mesure du temps chez les stomoxes à la suite d'un repas de sang infectant. Bien au contraire, il y a une disparition progressive des tachyzoïtes chez le stomoxe (**Bigalke, 1968 ; Liénard et al., 2013 ; Sharif et al., 2017**). Il est remarquable de noter que 96 h après le repas contaminé, l'ADN du parasite est encore détecté en faible quantité à la fois sur les pièces buccales et dans le contenu abdominal pour les trois répliques alors que pour la forme bradyzoïte, l'ADN de *B. besnoiti* n'a été mis en évidence que dans le contenu abdominal pour deux répliques sur trois à cette même période. De plus, 1 à 3 tachyzoïtes ont été observés jusqu'à 96 h dans le sang receveur alors que cela n'a pas été le cas pour les essais avec les bradyzoïtes à cette même

date. Une explication possible est une différence de charge parasitaire prélevée par les stomoxes : elle est supérieure avec les tachyzoïtes par rapport aux bradyzoïtes. En effet, il y a eu en moyenne sur les trois réplicas plus de tachyzoïtes ingérés que de bradyzoïtes alors même que le nombre de parasites sur les pièces buccales a été sensiblement le même entre les deux formes. En supposant que les tachyzoïtes et les bradyzoïtes sont soumises aux mêmes conditions adverses (effets de la salive et des enzymes digestives) chez le stomoxe (**Liénard et al., 2013 ; Sharif et al., 2017**), la facilité d'accès aux tachyzoïtes (sous forme de goutte de sang, sans tégument à traverser) et la concentration importante proposée ont pu favoriser une cette ingestion plus importante de tachyzoïtes entraînant une durée de détection plus longue. Alternativement, il est possible qu'il y ait une différence de résistance entre les deux formes du parasite chez *S. calcitrans*. Cette résistance différente existerait entre les tachyzoïtes et les bradyzoïtes de *T. gondii* en milieu acide mais elle demeure encore controversée (**Dubey, 1998**). Enfin, comme pour les bradyzoïtes, il n'a pas été étudié dans notre protocole le maintien de la virulence pour un hôte sensible ou pour des cultures cellulaires de ces tachyzoïtes observés jusqu'à 96 h.

Ces résultats ont été en partie communiqués au 25^{ème} congrès international de la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology à Liverpool en 2015 (**Sharif et al., 2015**).

2- Chapitre 2 : Transmission vectorielle de *B. besnoiti*

2-1- Contexte et objectifs de l'étude

Depuis les travaux de **Bigalke (1968)**, aucun travail de recherche n'a été mené à notre connaissance concernant la transmission de *B. besnoiti* par des arthropodes hématophages. Bigalke a montré que *S. calcitrans* était probablement impliqué dans la transmission de *B. besnoiti* mais de façon peu efficace voire anecdotique par rapport aux Tabanidés. En effet il a estimé qu'il fallait entre 52 000 et 292 000 piqûres de *S. calcitrans* pour que la transmission soit effective (développement du cortège de symptômes chez l'animal receveur) quant seulement trois piqûres de *Tabanus denticornis* étaient suffisantes pour atteindre ce résultat (**Bigalke, 1968**). Or, des séroconversions dans un élevage bovin laitier du Sud-Ouest de la France ont été observées en présence d'imagos de *S. calcitrans* et en dehors de la période d'activité des taons (**Liénard et al., 2011**). Nous avons décidé, à partir de ces différentes constatations, de réévaluer le rôle vecteur de *S. calcitrans* dans la transmission mécanique de *B. besnoiti*. Pour cela, nous avons utilisé un modèle expérimental hétérologue déjà développé dans notre laboratoire (**Liénard et al., 2015**). Toutefois, au lieu d'inoculer directement par voie sous-cutanée le parasite sous chacune de ces formes (bradyzoïtes ou tachyzoïtes) aux lapins receveurs, nous avons utilisé *S. calcitrans* comme vecteur.

Nous insistons dès à présent sur un point méthodologique important. En effet, du fait des résultats du chapitre précédent et des observations de **Bigalke (1968)**, le transfert entre le repas interrompu infectant des stomoxes (soit sur des vaches en phase chronique de besnoitiose, sources de bradyzoïtes soit sur du sang mélangé avec des tachyzoïtes de culture) aux lapins a été immédiat afin d'augmenter la probabilité du succès de la transmission de parasites virulents. Nous présentons séparément les résultats pour les essais de transmission de bradyzoïtes (article soumis ci-dessous le 6 avril 2018 à *Medical and Veterinary Entomology*) et de tachyzoïtes (en

tant que données supplémentaires) bien qu'ils aient été menés conjointement. Cette scission a été nécessaire car les données de numération-formule sanguine n'ont pas été disponibles suite à des problèmes techniques pour un des trois lapins exposés aux tachyzoïtes de culture.

2-2- Transmission des bradyzoïtes de *B. besnoiti* aux lapins par *S. calcitrans*

Article 2

30 **Abstract**

31

32 Cattle besnoitiosis, due to *Besnoitia besnoiti*, is a re-emerging disease in Europe. Its mechanical
33 transmission by biting flies has never been reinvestigated since the 60's. The aim of this study was to
34 re-examine the ability of *Stomoxys calcitrans* to transmit virulent *B. besnoiti* bradyzoites from
35 chronically infected cows to susceptible rabbits. Three batches of 300 stable flies were allowed to take
36 an interrupted blood meal on chronically infected cows followed by immediate blood meal completion
37 on three rabbits (group "B"). A control group of rabbits and a group exposed to the bites of non-
38 infected *S. calcitrans* were included in the study. Blood qPCR analyses, clinical, serological and
39 haematological monitorings were performed in the three groups during 152 days until euthanasia.
40 Quantitative PCR analyses and histological examinations were performed on 24 tissue samples per
41 rabbit. Only one rabbit in group "B" exhibited clinical signs of the acute phase of besnoitiosis
42 (hyperthermia, weight loss, regenerative anaemia and leukopenia and transient positive qPCR in
43 blood) and seroconverted. Parasite DNA was detected in four tissue samples on this rabbit, however
44 no cyst was observed at histological examination. Therefore, *S. calcitrans* could act as a mechanical
45 vector of *B. besnoiti* more efficiently than previously assessed.

46

47

48

49 Introduction

50 Cattle besnoitiosis due to the cyst-forming parasite *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913)
51 (Apicomplexa, Sarcocystidae) has focussed more attention in the two past decades since recent
52 outbreaks in various European countries as reviewed by Álvarez-García *et al.* (2014). To date, new
53 clinical cases have been also reported in Croatia (Cortes *et al.*, 2014), Greece (Papadopoulos *et al.*,
54 2014), Belgium (Vanhoudt *et al.*, 2015) and Ireland (Ryan *et al.*, 2016). Then, the European Food Safety
55 Authority has categorized this disease as re-emerging (EFSA, 2010). During the early and acute stage
56 of the disease, a rapid proliferation of tachyzoites occurs within endothelial cells of blood vessels
57 causing vascular lesions (Pols, 1960; Basson *et al.*, 1970). Main clinical signs associated to this parasite
58 multiplication are fever, nasal and ocular discharges and later subcutaneous oedema (anasarca stage).
59 Sporadically but economically important abortion, male (reversible or not) sterility and death can
60 happen (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Jacquiet *et al.*, 2010). The final and chronic stage of the cattle
61 infection includes scleroderma, hyperkeratosis, hair loss, folding, hardening and thickening of the skin
62 with oozing sero-sanguineous exudate (Bigalke & Prozesky, 2004). Characteristic sub-spherical
63 pinhead-sized thick-walled cysts in various organs and tissue but mainly in the skin and scleral
64 conjunctiva arise around 11 days post infection (Bigalke, 1968) and could contain approximately up to
65 200 000 bradyzoites (Bigalke, 1981).

66 The definitive host as source of oocysts has not yet been identified despite many efforts
67 (Diesing *et al.*, 1988; Basso *et al.*, 2011). Spreading of the infection within and between cattle herds
68 remain poorly understood (Olias *et al.*, 2011). One of the possible routes of contamination was deeply
69 investigated by Bigalke (1968) collecting evidences that blood-sucking arthropods could mechanically
70 transmit cattle besnoitiosis from chronically infected cattle to susceptible ones. His results suggested
71 that tabanids could be probably dramatically most efficient vectors than the worldwide common pest
72 *Stomoxys calcitrans* L., 1758 (Diptera: Muscidae) (Bigalke, 1968). However, some seroconversions
73 were observed in housed dairy cattle at the end of winter, *i.e.* outside the horsefly activity period,

74 concomitantly with high activity of *S. calcitrans* indoors (Liénard *et al.*, 2011). This is in favour of a
75 vector competence of stable flies to transmit *B. besnoiti*. The rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, has been
76 found to be a susceptible host to *B. besnoiti* (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Basson *et al.*, 1970; Liénard *et*
77 *al.*, 2015) and was used in this study as an experimental heterologous model.

78 Then, the aim of this study was to reassess the vector competence of stable fly to transmit
79 virulent *B. besnoiti* bradyzoites from chronically infected cattle to susceptible rabbits under laboratory
80 conditions.

81

82 **Material and methods**

83 **Rearing of *Stomoxys calcitrans* colony**

84 A laboratory colony of *Stomoxys calcitrans* has been reared under laboratory conditions at the École
85 Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT, France), according to Salem *et al.* (2012) since 2009. A total
86 of about 3,000 newly emerged stable fly males and females (sex ratio 1:1) aged 4 ± 2 days old was used
87 in this study.

88 **Source of *Besnoitia besnoiti* bradyzoites**

89 Two naturally chronically *B. besnoiti* infected Blonde d'Aquitaine cows (cow 1 and cow 2) in
90 scleroderma stage of the disease were referred to the large animal hospital of the ENVT for necropsy.
91 They were provided by commercial herds in Aude and Cantal French departments. They were used as
92 sources of *B. besnoiti* bradyzoites. *Besnoitia besnoiti* infection was confirmed by serology with the in-
93 house Western Blot (WB) and by real-time PCR (qPCR) performed on neck skin biopsy (see below).

94 **Rabbits as receiver hosts**

95 Seven, 12-week old New Zealand White rabbit females with a weight of 2.3 – 2.8 kg were obtained
96 from the experimental unit Pôle Expérimental Cunicole de Toulouse of Institut National de la
97 Recherche Agronomique (Castanet-Tolosan, Toulouse). Rabbits were individually housed in cages in a

98 room with controlled relative humidity (65% – 70%) and temperature (20 – 22°C). The animals were
99 fed with vegetable pellets daily and fresh tap water was available *ad libitum*. Animals were allowed to
100 acclimatize for 2 weeks prior experiments and were handled daily. These experiments were approved
101 by the ethics committee of the ENVT (Science et Santé Animale, SSA, agreement number: 115) under
102 the reference APAFIS#7628-2016111717356142v4. Before the experiments, all rabbits were
103 confirmed as negative for anti-*B. besnoiti* specific antibodies by in-house WB and by indirect
104 fluorescent antibody test IFAT (see below) and were negative for *B. besnoiti* DNA in blood by qPCR (see
105 below).

106 **Experimental design**

107 All stable flies used were fed with cattle blood and honey 48h and 24 h before experiments
108 respectively. The right side of the neck of the two cows was shaved and disinfected with solution of
109 iodopovidone (Vetedine Solution Externe 120 ml, Laboratoire Vétérinaire) and alcohol 70% three hours
110 before experiment.

111 *Assessment of engorgement rate of S. calcitrans on cows*

112 Three batches of 300 stable flies were isolated in 3 mesh cages (15 × 15 × 15 cm). Each batch was
113 exposed on the neck skin of one cow during 5 min: two batches on cow 1, one batch on cow 2. Flies
114 were immediately killed at -20°C after blood meal. For each batch, the engorgement rate was assessed
115 by abdominal dissection with needle. Proboscis was then removed and pooled per batch into a grinding
116 tube containing 1.4 ml of PBS (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France). Collected abdominal contents
117 were pooled per batch into a sterile 4-ml tube containing 60 USP U Lithium Heparin (Terumo Europe
118 N.V.®, Leuven, Belgium) and 2 ml of PBS. Quantitative PCR for *B. besnoiti* DNA was performed on
119 abdominal content and mouthparts for each fly batches (see below).

120 *Experimental infection*

121 The rabbits were divided randomly into the following three groups: group “Bradyzoites” (group B)
122 where three rabbits (B1, B2, B3) received bites from stable flies previously fed on *B. besnoiti* chronically
123 infected cows, group “*Stomoxys*” (group S) consisting in two rabbits (S1, S2) bitten only by free-
124 *B. besnoiti* *S. calcitrans* and group “control” (group C) with two rabbits (C1, C2). The day of experiment,
125 all rabbits were anaesthetized by intramuscular injection of ketamine hydrochloride (15 mg/kg,
126 Imalgene 1000®, Merial, Lyon, France) and medetomidine hydrochloride (0.25 mg/kg, Domitor®,
127 Laboratoire Vétérinaire S.A., Lure, France) and their right flank was sheared on a surface of 15 ×15 cm.

128 **Experiment 1: transfer of *B. besnoiti* bradyzoites from chronically infected cows to rabbits (group B)**
129 using stable flies

130 Three batches of 300 stable flies were allowed to take blood meal on two chronically infected cows for
131 5 minutes as an interrupted blood meal (Liénard *et al.*, 2013) with batches 1 and 2 on the cow 1 and
132 batch 3 on the cow 2. The batches of flies were contained in the same cages as described for the
133 assessment of engorgement rate of *S. calcitrans* on cows. Batches 1, 2 and 3 were immediately
134 transferred and allowed to complete their blood meal on rabbits B1, B2 and B3 respectively during 30
135 min.

136 To avoid passive parasite transfer by mesh cages, different faces of the same cage were presented to
137 donor cattle and rabbit. At the end of the second blood meal, stable flies were killed at -20 °C for later
138 procedures as described for engorgement assessment.

139 **Experiment 2: effects of free-*B. besnoiti* stable fly bites on rabbits (group S)**

140 Two batches of 300 stable were prepared as described in experiment 1 and were allowed to feed on
141 960µl of free *B. besnoiti* cattle blood meal during 5 minutes divided in 48 drops of 20 µl distributed on
142 6 8-well slides (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) heated at 38°C. These batches were
143 immediately transferred to rabbits S1 and S2 to complete their blood meal for 30 minutes. Then, they
144 were knocked out at -20 °C for later dissection and qPCR examination.

145 **Clinical examination**

146 All rabbits were clinically monitored including records of rectal temperature and body weight at days
147 4 and 2 before the exposure to stable fly bites and every day from day 0 to day 28 and weekly from
148 the 22nd to the 152th day post exposure (pe) to *S. calcitrans*. All the rabbits were euthanized at day 152
149 pe by injection into the marginal ear vein of 0.12 ml/kg BW of T-61[®] containing embutramide 200
150 mg/mL, mebezone iodure 26.92 mg/mL and tetracaine chloridrate 4.39 mg/mL (Intervet, Beaucouzé,
151 France).

152 **Laboratory procedures**

153 *Serological and complete blood count examinations*

154 Blood was taken from the cephalic vein by venipuncture (Surflo[®] Winged Infusion Set, Terumo Europe
155 N.V., Leuven, Belgium) on days -2, 2, 7, 9, 14, 16, 21, 23, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 77, 91, 105, 119, 133
156 and 147. The blood was collected in 3-ml tubes containing EDTA (Terumo Europe N.V., Leuven,
157 Belgium) to assess the parasite load by qPCR and in 1-ml tubes containing EDTA (Greiner Bio-One
158 GmbH, Kermismünster, Austria) for hematological analysis. Sera collected in 3.5-ml tubes containing
159 silicone (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) were tested for *B. besnoiti* antibodies by in-house WB
160 using total *B. besnoiti* tachyzoite antigens and IFAT.

161 The in-house WB and IFAT procedures were performed as previously detailed by Liénard *et al.*, (2015)
162 for rabbit blood samples. WB was also used for both cattle blood samples. For both immunological
163 tests in rabbits, a serum from one previously bradyzoïte-infected rabbit was used as positive control
164 (Liénard *et al.*, 2015) and negative controls were obtained from uninfected control rabbits. For cattle
165 blood sample, a chronically infected cow was the positive control and an uninfected *B. besnoiti* cow
166 was the negative control. For WB, a serum was considered positive when at least four of ten bands of
167 tachyzoite antigens (45, 40, 37, 34, 30, 27, 22, 17, 16, and 15 kDa) were recognized according to Schares
168 *et al.* (2010). For IFAT, the 1:200 dilution was considered the positive cut-off (Shkap *et al.*, 2002;

169 Lenfant *et al.*, 2014) with unbroken, peripheral bright fluorescence of the tachyzoite membrane. For
170 hematologic analyses, the labeled tubes were mixed gently, and stored at 4 °C until analysis within 3 h
171 of blood collection. Hematologic analyses were performed with an automated analyzer (XT-2000iV,
172 Sysmex, Kobe, Japan) by using the settings for rabbit blood (software version 10; Sysmex).

173 *Rabbit necropsy and qPCR on rabbit blood and tissues and on mouthparts and abdominal contents of*
174 *stable flies*

175 At day 152, all rabbits were necropsied. For each animal, 24 skin and tissue samples were collected for
176 PCR, histology and immunohistochemistry analysis. Skin samples of 4 cm² were taken from 10 sites:
177 right fore and hind limbs, right inner thigh, backline, right flank (*i.e.* stable fly bite site), umbilicus area,
178 udder, right neck, right shoulder and right eyelid. For tissues and organs, 14 samples of about 1 cm³
179 were taken from the pancreas, liver, spleen, right kidney, gallbladder, diaphragm, heart, lung, nasal
180 and tracheal mucosa, right eye, right ovary, vulvar and vaginal mucosa. Each sample weight was
181 homogenized to 500 mg for quantitative PCR (qPCR).

182 Detection of *B. besnoiti* DNA was performed with qPCR from blood (1 mL), skin, tissue and organs
183 samples of rabbits, mouthparts and abdominal contents of *S. calcitrans* and cattle neck skin samples
184 (after the necropsies of cows 1 and 2). Mouthparts of stable flies were ground with the TeSeE™
185 Purification Kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's
186 recommendation. Total genomic DNA was extracted with the QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen,
187 Courtabœuf, France) commercial kit. *B. besnoiti* ITS-1 amplification was performed with the
188 commercial PCR kit AdiaVet™ Besnoitia (BioX-Diagnostics®, Jemelle, Belgium) and with the Stratagene
189 MX3005P thermal cycler (Agilent Technologies®, La Jolla, CA). Positive and negative template control
190 was also included alongside in all experiments. Results were computed using the MxPro QPCR version
191 4.10 software (Agilent Technologies®, La Jolla, CA). Threshold cycle (Ct) and baseline were
192 automatically determined by the software and verified by visual examination of the threshold line in
193 amplification plots. A Ct value, equal or superior to 40 corresponded to any parasite DNA detection.

194 Assessment of parasite equivalent (par. eq.) numbers in the rabbit samples, mouthparts and
195 abdominal contents of stable flies and in cattle blood samples was performed under conditions
196 described in Sharif *et al.*(2017). The obtained Ct values were transformed into the number of parasite
197 equivalents according to the following equation of the linear regression of the standard curve
198 $\text{par. eq.} = 10^{\left(\frac{\text{ct}-40.405}{-1.534}\right)}$ estimated with Microsoft™ Excel 2013 software (Microsoft Corporation,
199 Redmond, Washington, USA).

200 *Histology and Immunohistochemistry of rabbit skin and tissue samples*

201 Following qPCR results and to evaluate the presence of *B. besnoiti* cysts in rabbit, 10 % buffered
202 formalin was used for fixation of mirror samples. These samples were dehydrated and then embedded
203 in paraffin wax, and 4 µm sections were stained with haematoxylin and eosin. Full thickness serial
204 sections of the paraffin blocks were performed on PCR positive mirror samples to assess the
205 development of bradyzoite cysts or inflammatory conditions. Additionally, immunohistochemistry was
206 performed on these samples by a peroxidase-based staining method using polyclonal antibodies
207 provided by a naturally *B. besnoiti* infected cow (serum characterized by WB and IFAT). These
208 polyclonal antibodies were used at a dilution rate of 1:25 during 1-h. Slides were then incubated 25
209 min with antibovine peroxydase solution (dilution 1:1000, antibovine IgG (whole
210 molecule)-peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).
211 Diaminobenzidine was used as chromogen (DAB+, Dako France SAS., Les Ulis Cedex, France) to reveal
212 peroxidase activity. Slides were counterstained with Harris haematoxylin.

213

214 **Results**

215 The percentages of engorgement were very low on the cow 1 for the batches 1 and 2 (Table 1). Then,
216 no *B. besnoiti* DNA was recovered neither in the mouthparts nor in the abdominal contents of stables
217 flies. For the cow 2, the engorgement rate was higher, reaching 70.5% and parasite DNA was found in

218 mouthparts and abdominal content however, the number of parasite equivalent burden was low (9
219 and 41 parasite equivalent respectively, Table 1).

220 *Clinical follow-up*

221 No clinical abnormality was reported in the rabbits belonging to the control group, the group S and for
222 the two rabbits of the group B infected from the cow 1 (rabbits B1 & B2). No increase of rectal or
223 sudden weight variation were found at any time-point during the 152-day experiment concerning
224 these six rabbits. Only one rabbit, (B3), of the group B (bitten by stable flies fed on the cow 2) exhibited
225 a peak of rectal temperature at Day 2 after the exposition to stable flies (40.5°C) and a plateau for six
226 days (from D7 to D12) reaching 40.3°C during 5 days (Fig. 1). No photophobia, oedema or nasal and
227 ocular discharges were observed in any rabbits. At D2, the rabbit B3 lost 180 g which was the most
228 critical weight loss in comparison to other rabbits (Fig. 2). After this date, the weight growth curve of
229 this rabbit showed similar pattern of evolution of the other rabbits and at D28 pe, it became even the
230 heaviest rabbit of the experimentation (Fig. 2).

231 *Serological, haematological, and qPCR on blood chronology*

232 A positive seroconversion determined by WB and IFAT was observed for the rabbit B3 only, 14 dpe
233 onwards. From this date, this rabbit remained seropositive until the end of the experiment with
234 antibody titre in IFAT equal or higher to 1:800.

235 Hematologic variations were observed in rabbit B3 only (Fig. 3 & 4): the red blood cell count (RBC)
236 decreased at D14 pe (Fig. 3A) with transient and marked anaemia at this date, as demonstrated by low
237 hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) values (Fig. 3B & 3C). Thereafter, these values increased to reach
238 the ranges of the other rabbits at D35 and remained within the range of values recorded in other
239 animals until the end of the experiment (Fig. 3A, 3B & 3C). A peak of reticulocytes was noted at D14
240 for the rabbit B3 and the percentages of reticulocytes fell in the ranges of the other rabbits at D23 pe

241 until the end of the experiment (Fig. 3D). A transient and patent thrombocytopenia was observed at
242 D14 pe. At D23 pe, these values were similar to those recorded in the other rabbits (Fig. 3E).

243 A reduced white blood cell (WBC) count was observed at D2 pe for the rabbit B3 (Fig. 4A). The WBC
244 count increased at D9 and then fluctuated inside the mean values of WBC counts of all other rabbits
245 from D28 to D91 (Fig. 4A). After D91 pe, the WBC count values were slightly lower than the other
246 rabbits. The decreased of WBC at D2 consisted of a reduction of lymphocytes and monocytes (Fig. 4B
247 & 4C). A decline of neutrophils was found at D7 pe (Fig. 4D). Beyond this date, all these values showed
248 fluctuations within level ranges of all other rabbits until euthanasia (Fig. 4B, 4C & 4D).

249 *B. besnoiti* DNA was detected in rabbit B3 blood at D7, D9 and D14 only, corresponding respectively to
250 3, 9 and 6 parasite equivalents/mL of blood. The detection of this parasitaemia was concomitant with
251 the onset of the rectal temperature peak, the weight loss and the major haematological changes
252 described above. No detection of parasite DNA in the blood of this rabbit occurred beyond D14 until
253 the end of the experiment.

254 *qPCR, histology and immunochemistry examination of tissue and organ samples*

255 Parasite DNA was recovered in four locations of the rabbit B3 out of 24 only, displaying less than 10
256 parasite equivalents per location. Tissues and organs yielded positive DNA amplifications were the
257 tracheal mucosa with 9 par. eq., the vaginal mucosa with 7 par. eq., the heart apex with 9 par. eq. and
258 the gallbladder with 7 par. eq. No skin sample was positive. No cyst nor inflammatory condition were
259 recovered by histology or immunochemistry in these positive samples.

260 **Discussion**

261 Since the work of Bigalke (1968), no new trials corroborating or reversing the mechanical
262 transmission of *B. besnoiti* by arthropod biting flies have never been performed to the authors'
263 knowledge. Our data demonstrated that *B. besnoiti* can be mechanically transmitted from chronically
264 infected cow to susceptible rabbit by stable flies. These results support prior recovery of *B. besnoiti*

265 parasites and/or DNA in stable flies naturally infected (Gollnick *et al.*, 2015) or under experimental
266 conditions (Bigalke, 1968; Liénard *et al.*, 2013; Sharif *et al.*, 2017) without evidence of parasite
267 multiplication within the vectors.

268 The mechanical transmission requires at least two important parameters to be successful: the
269 persistence of the virulence of pathogen in/on the vector and the quantity of pathogens transferred
270 by the vector. The persistence of *B. besnoiti* in *S. calcitrans* has been previously investigated (Bigalke,
271 1968; Liénard *et al.*, 2013; Sharif *et al.*, 2017). Parasite DNA traces were recovered in the abdominal
272 content of stable flies until 96 hours after the infective blood meal (Sharif *et al.*, 2017). Some live
273 parasites were also found in the recipient uninfected blood 48 h after the transfer from a chronically
274 infected cow by stable flies (Sharif *et al.*, 2017). However, the persistence of *B. besnoiti* virulence in
275 *S. calcitrans* was short: no clinical evidence of successful infection has been found in rabbits inoculated
276 with abdominal content of stable flies collected beyond one hour after the infective meal on *B. besnoiti*
277 infected cows (Bigalke, 1968). Then, based on these previous results, the trials were performed by
278 immediate transfer between donor cows and recipient rabbits to increase success probability. Infective
279 dose, relied on virulence and survival of the strain, is expected as a second major constraint in the
280 severity of symptoms (Álvarez-García *et al.*, 2014). Low (but undefined) infection dose is deemed in
281 cattle and rabbits to lead to mild clinical signs or clinically unapparent infection, especially with
282 *S. calcitrans* used as vector (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Basson *et al.*, 1970). In the present experiment,
283 one rabbit (rabbit B3) out of three developed clinical signs of acute besnoitiosis and seroconverted 14
284 days after one exposure to potentially contaminated stable flies. Only 300 flies were presented once
285 to the rabbit B3 meanwhile Bigalke (1968) has estimated that 52.200 to 292.500 bites (corresponding
286 to 6 to 13 daily transfer sessions of 870 to 2.250 flies, from cows to rabbits) were required. The
287 estimations of the number of parasite equivalents in and on mouthparts and in abdominal contents of
288 300 *S. calcitrans* corresponded to less than 50 parasite equivalents potentially transferable by
289 regurgitation and/or “dirty needle” type of transfer but this dose was sufficient to trigger acute clinical
290 signs of besnoitiosis in the rabbit B3. This parasite burden was dramatically lower than the previous

291 experimental trials by direct injection to rabbits with 5.10^5 to 10^7 parasites (Shkap *et al.*, 1987; Basso
292 *et al.*, 2011; Liénard *et al.*, 2015). All things being equal, in comparison to the group S (rabbits exposed
293 to stable fly bites) where no clinical abnormality was observed, the development of clinical signs (fever,
294 weight loss and anaemia) of the rabbit B3 was probably due to the transferred *B. besnoiti* only and not
295 to the adverse effects of the stable fly saliva (Swist *et al.*, 2002).

296 Besnoitiosis clinical signs in rabbits are very inconstant following experimental infection, from
297 no or mild symptoms to acute course of the disease (Basso *et al.*, 2011; Bigalke, 1960, 1967, 1968;
298 Basson *et al.*, 1970; Cortes *et al.*, 2006; Neuman & Nobel 1981). A first peak of temperature with weight
299 loss was noticed two days after the exposure and could be due to the handling and the first contact
300 with the parasites leading to reduction of lymphocytes and monocytes. Contrary to Pols (1954) and
301 Neuman & Nobel (1981), leukopenia and monocytopenia were found. Possible explanations of this
302 discrepancy could be difference in doses used and a virulence attenuation by 11 serial passages on
303 rabbit of the isolate used by Pols (1954) before observation of these variations of white blood cells. At
304 D7, the decrease of neutrophils was concomitant with the febrile reaction. Taking together, these
305 observations are congruent with hematologic alterations in naturally infected cattle in the acute stage
306 of besnoitiosis where reduction of lymphocyte and monocyte concentrations were found
307 (Langenmayer *et al.*, 2015). A second febrile onset up to more than 40°C started at D7 and lasting six
308 days falling in the incubation range described by Pols (1960) with an average of seven days. Neither
309 oedema nor ocular and nasal discharge was noticed. The peak of hyperthermia occurred concurrently
310 with detection of DNA parasite in blood as also reported by Basso *et al.* (2011) and Liénard *et al.* (2015).
311 Moreover during this parasitaemia stage, regenerative anaemia with consumption of platelets at D14
312 pe arose probably due to the invasion of the endothelial cells by the tachyzoites leading to vascular
313 lesions with haemorrhages and congestion (Pols 1960; Basson *et al.*, 1970). After this acute stage, the
314 rabbit B3 recovered and appeared clinically healthy at the end of the experiment. Scleroderma stage
315 seemed not to occur in rabbit (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Basson *et al.*, 1970; Liénard *et al.*, 2015).

316 Seroconversion was detected at D14 pe by both IFAT and immunoblot. The WB pattern was
317 identical to the one observed in the study of Liénard *et al.* (2015) with high antibody titre ($\geq 1:800$)
318 determined by IFAT. The delay of seroconversion and antibody titres were consistent with previous
319 trials in rabbits using however considerably higher inoculation doses of parasites (Basso *et al.*, 2011;
320 Liénard *et al.*, 2015). None of the rabbits used here were previously exposed to stable flies before the
321 experiments. This result may suggest either possible adjuvant effect of stable fly saliva on
322 immunogenicity of *B. besnoiti* or better immunological stimulation by direct inoculation of parasites in
323 blood by vector bites in comparison to subcutaneous injection, both propositions evoked in the vector-
324 borne rodent malaria model (Kebaier *et al.*, 2010). Otherwise, apart the dose variation and
325 hypothetical role of the vector saliva, it could not be formally discarded that different *B. besnoiti*
326 isolates elicit heterogeneous immune responses qualitatively and quantitatively (Basson *et al.*, 1970;
327 Álvarez-García *et al.*, 2014).

328 At the necropsy examination, no *B. besnoiti* DNA was retrieved in any skin samples but was
329 detected in four tissues and organs of rabbit B3: heart, gallbladder, tracheal and vaginal mucosae
330 corresponding to less than 10 parasite equivalents in 500 mg of tissue. Except gallbladder sample, the
331 three remaining positive locations were already reported in experimentally infected rabbits (Pols,
332 1960; Liénard *et al.*, 2015) or common voles *Microtus arvalis* (Basso *et al.*, 2011) or in naturally infected
333 cattle (Frey *et al.*, 2013). The histological examination failed to detect patchy cysts in all samples. This
334 discrepancy with molecular analysis results could be due to a lack of sensitivity of the histological
335 methods when parasite burden was very low as observed here (Schaes *et al.*, 2011; Frey *et al.*, 2013).
336 Moreover, cyst formation occurred erratically in rabbits, their number remained very limited even
337 when high infective *B. besnoiti* doses were used (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Basson *et al.*, 1970; Shkap
338 *et al.*, 1987; Cortes *et al.*, 2006; Basso *et al.*, 2011; Liénard *et al.*, 2015). Alternatively, the ability to cyst
339 formation could be relied on the differences between parasite isolates (Basson *et al.*, 1970; Álvarez-
340 García *et al.*, 2014).

341 Transmission was effective for one rabbit out of three in group B. This result is congruent with
342 previous trials suggesting a weak vector competence of *S. calcitrans* in comparison with tabanids
343 (Bigalke, 1968). The voluntary reduced number of flies used here – but consistent with the possible
344 total number of stable flies counted on cattle during the peak of activity during summer (Todd, 1964)
345 - could have contributed to this outcome as well as the small number of recipient animals for ethical
346 reasons. The transmission failure in two recipient rabbits was not due to difference in skin parasite
347 burdens between the two cows but to the very low engorgement rates on the cow 1 with no DNA
348 detection of *B. besnoiti*. Naturally infected cows, sources of bradyzoites, came from commercial cattle
349 farms which could control hematophagous flies by using insecticides. The reluctance of the two
350 batches of 300 *S. calcitrans* to feed on the cow 1 may be explained by the remanence of previous
351 pesticide treatments before their hospitalizations and then preventing the infective blood meal.
352 Unfortunately, it was not possible to use the same donor for all the experiments because the two
353 infected cattle should be quickly culled for welfare and clinical reasons.

354 **Conclusion**

355 The success of virulent parasite transmission with 300 stable flies only suggests that this common pest
356 could contribute more effectively to *B. besnoiti* horizontal transmission than previously claimed by
357 Bigalke (1968). This result encourages to a better consideration of the epidemiological role played by
358 *S. calcitrans* in local spread of cattle besnoitiosis which should be more accurately investigated.
359 (Bigalke, 1968; Liénard *et al.*, 2011; Olias *et al.*, 2011; Álvarez-García *et al.*, 2014). Additionally, routes
360 involved in this mechanical transmission need to be more precisely defined also: inoculation by
361 flushing of mouthparts and/or regurgitation).

362

363 **Acknowledgments**

364 The authors wish to thank Martine Roques and Sonia Gounaud for their technical assistance for the
365 maintenance of *S. calcitrans* colony and of rabbits, Isabelle Pardo and Céline Bleuart for technical
366 assistance in histology and immunohistochemistry.

367

368 **References**

369 Álvarez-García, G., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L.M. (2014)
370 Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, **141**, 1419-1435.

371 Basso, W., Schares, G., Gollnick, N.S., Rütten, M. & Deplazes, P. (2011) Exploring the life cycle of
372 *Besnoitia besnoiti* - experimental infection of putative definitive and intermediate host species.
373 *Veterinary Parasitology*, **178**, 223-234.

374 Basson, P.A., McCully, R.M. & Bigalke, R.D. (1970) Observations on the pathogenesis of bovine and
375 antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits. *Onderstepoort*
376 *Journal of Veterinary Research*, **37**, 105-126.

377 Bigalke, R. D. & Prozesky, L. (2004) Besnoitiosis. *Infectious diseases of livestock*, pp.351-359. Oxford

378 Bigalke, R.D. (1960) Preliminary observations of the mechanical transmission of cyst organisms of
379 *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from a chronically infected bull to rabbits by *Glossina brevipalpis*
380 Newstead, 1910. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **31**, 37-44.

381 Bigalke, R.D. (1967) The artificial transmission of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from chronically
382 infected to susceptible cattle and rabbits. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **34**, 303-316.

383 Bigalke, R.D. (1968) New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as
384 determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **35**,
385 3-137.

386 Bigalke, R.D. (1981) Besnoitiosis and globidiosis. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal*
387 *Science*, **6**, 429–442.

388 Cortes, H.C.E., Nunes, S., Reis, Y., Staubli, D., Vidal, R., Sager, H., Leitão, A. & Gottstein, B. (2006)
389 Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Veterinary Parasitology*,
390 **141**, 216-225.

391 Cortes, H., Leitão, A., Gottstein, B. & Hemphill, A. (2014) A review on bovine besnoitiosis: a disease
392 with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges,
393 1916). *Parasitology*, **141**, 1406-1417.

394 Diesing, L., Heydorn, A.O., Matuschka, F.R., Bauer, C., Pipano, E., Dewaal, D.T. & Potgieter, F.T. (1988)
395 *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. *Parasitology*
396 *Research*, **75**, 114–117.

397 EFSA (2010) Bovine besnoitiosis: an emerging disease in Europe. *The European Food Safety Authority*
398 *Journal*, **8**, 1499–1514.

399 Frey, C.F., Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Mora, L.M., Benavides, J., Marcén, J.M., Castillo, J.A., Casasús,
400 I., Sanz, A., García-Lunar, P., Esteban-Gil, A. & Álvarez-García, G. (2013) Chronic bovine besnoitiosis:
401 Intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases.
402 *Veterinary Parasitology*, **197**, 95-103.

403 Gollnick, N.S., Scharr, J.C., Schares, G. & Langenmayer, M.C. (2015) Natural *Besnoitia besnoiti* infections
404 in cattle: chronology of disease progression. *BMC Veterinary Research*, **11**, 35.

405 Jacquiet, P., Liénard, E. & Franc, M. (2010) Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects.
406 *Veterinary Parasitology*, **174**, 30-36.

407 Kebaier, C., Voza, T. & Vanderberg, J. (2010) Neither mosquito saliva nor immunity to saliva has a
408 detectable effect on the infectivity of *Plasmodium* sporozoites injected into mice. *Infection and*
409 *Immunity*, **78**, 545-551.

410 Langenmayer, M.C., Scharr, J.C., Sauter-Louis, C., Schares, G. & Gollnick, N.S. (2015). Natural *Besnoitia*
411 *besnoiti* infections in cattle: hematological alterations and changes in serum chemistry and enzyme
412 activities. *BMC Veterinary Research*, **11**, 32.

413 Lenfant, F., Franc, M., Jacquet, P., Grisez, C., Prevot, F., Alzieu, J.P., Bouhsira, E. & Liénard, E. (2014)
414 Mise au point d'une technique de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte de la
415 Besnoitiose bovine. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **165**, 327-333.

416 Liénard, E., Salem, A., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Franc, M., Gottstein, B., Alzieu, J.P.,
417 Lagalisse, Y. & Jacquet, P. (2011) Longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal
418 abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. *Veterinary Parasitology*,
419 **177**, 20-27.

420 Liénard, E., Salem, A., Jacquet, P., Grisez, C., Prevot, F., Blanchard, B., Bouhsira, É. & Franc, M. (2013)
421 Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera:
422 Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitology*
423 *Research*, **112**, 479–486.

424 Liénard, E., Pop, L., Prevot, F., Grisez, C., Mallet, V., Raymond-Letron, I., Bouhsira, É., Franc, M. &
425 Jacquet, P. (2015) Experimental infections of rabbits with proliferative and latent stages of *Besnoitia*
426 *besnoiti*. *Parasitology Research*, **114**, 3815-2826.

427 Neuman, M. & Nobel, T.A. (1981) Observations on the pathology of besnoitiosis in experimental
428 animals. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, **28**, 345-354.

429 Olias, P., Schade, B. & Mehlhorn, H. (2011) Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of
430 *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 1564-1576.

431 Papadopoulos, E., Arsenos, G., Ptochos, S., Katsoulos, P., Oikonomou, G., Karatzia, M.A. & Karatzias, H.
432 (2014) First report of *Besnoitia besnoiti* seropositive cattle in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary*
433 *Medical Society*, **65**, 115–120.

434 Pols, J.W. (1954) Preliminary notes on the behavior of *Globidium besnoiti* Marotel, 1912, in the rabbits.
435 *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **25**, 45-48.

436 Pols, J.W. (1960) Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort*
437 *Journal of Veterinary Research*, **28**, 265-356.

438 Ryan, E.G., Lee, A., Carty, C., O'Shaughnessy, J., Kelly, P., Cassidy, J.P., Sheehan, M., Johnson, A. & de
439 Waal, T. (2016) Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd. *Veterinary Record*, **178**,
440 608

441 Salem, A., Franc, M., Jacquet, P., Bouhsira, E. & Liénard, E. (2012) Feeding and breeding aspects of
442 *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. *Parasite*, **19**, 309-317.

443 Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J.C., Langenmayer, M.C., Selmair, J., Dubey,
444 J.P., Cortes H.C., Conraths F.J. & Gollnick N.S (2010) Comparative evaluation of immunofluorescent
445 antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*
446 tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Veterinary Parasitology*, **171**, 32-40.

447 Schares, G., Maksimov, A., Basso, W., Moré, G., Dubey, J.P., Rosenthal, B., Majzoub, M., Rostaher, A.,
448 Selmair, J., Langenmayer, M.C., Scharr, J.C., Conraths, F.J. & Gollnick, N.S. (2011) Quantitative real time
449 polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle.
450 *Veterinary Parasitology*, **178**, 208–216.

451 Sharif, S., Jacquet, P., Prevot, F., Grisez, C., Bouhsira, E., Franc, M. & Liénard, E. (2017) Assessment of
452 persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae).
453 *Revue de Médecine Vétérinaire*, **168**, 197-203.

454 Shkap, V., Pipano, E. & Greenblatt, C. (1987) Cultivation of *Besnoitia besnoiti* and evaluation of
455 susceptibility of laboratory animals to cultured parasites. *Veterinary Parasitology*, **23**, 169-178.

456 Shkap, V., Reske, A., Pipano, E., Fish, L. & Baszler, T. (2002) Immunological relationship between
457 *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary Parasitology*, **106**, 35-43.

458 Swist, S.L., Wilkerson, M.J., Wyatt, C.R., Broce, A.B. & Kanost, M.R. (2002) Modulation of bovine
459 lymphocyte response by salivary gland extracts of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera:
460 Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **39**, 900-907.

461 Todd, D.H. (1964) The biting fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in dairy herds in New Zealand. *New Zealand*
462 *Journal of Agricultural Research*, **7**, 60-79.

463 Vanhoudt, A., Pardon, B., De Schutter, P., Bosseler, L., Sarre, C., Vercruyse, J., & Deprez, P. (2015) First
464 confirmed case of bovine besnoitiosis in an imported bull in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig*
465 *Tijdschrift*, **84**, 205–211.

466

467

468

469 Table 1. Engorgement rate and parasite burden in stable flies following 5 min of blood feeding on
 470 chronically *B. besnoiti* infected cows

Control batch number	Source of bradyzoites	Engorgement rate (IC95%)	Number of parasite equivalents	
			In mouthparts	In abdominal content
1	Cow 1	3.33 % (1.3 - 5.4%)	No DNA detected	No DNA detected
2	Cow 1	16.67 % (12.5 - 20.9)	No DNA detected	No DNA detected
3	Cow 2	70.5 % (65.3 - 75.7)	9	41

471

472

473

474 **Figure Legends**

475 **Figure 1.** Variations of mean rabbit rectal temperatures (\pm standard deviation bars) from D-2 to day
476 152 in °C.

477 The seropositive rabbit B3 results were presented apart from the two other seronegative rabbits of
478 the group B (consisting of 3 rabbits exposed to 300 stable flies immediately transferred after an
479 interrupted blood meal on chronically infected cows). The group S was two rabbits exposed only to
480 300 laboratory-reared *S. calcitrans*, and the group C two rabbits only anaesthetised the day of
481 experiment.

482 **Figure 2.** Evolution of mean rabbit weight (\pm standard deviation bars) from D-2 to day 152 in kg,
483 seropositive rabbit B3 results were presented apart from the group B.

484 **Figure 3.** Mean haematological profile variations of the rabbits (\pm standard deviation bars) from D-2 to
485 day 147, results of rabbit B3 were apart from the group B. A: red blood cell count in $10^6/\mu\text{L}$, B:
486 haemoglobin (g/dL), C: haematocrit (%), D: reticulocytes (%), E: coagulogram measured by platelet
487 counts ($10^3/\mu\text{L}$).

488 **Figure 4.** Mean leukogram profile variations of the rabbits (\pm standard deviation bars) from D-2 to day
489 147, results of rabbit B3 were apart from the group B. A: variations in white blood cell counts ($10^3/\mu\text{L}$),
490 B, C, D: variations in lymphocyte, monocyte and neutrophil counts (%).

491

492

493

494

495

Fig. 1

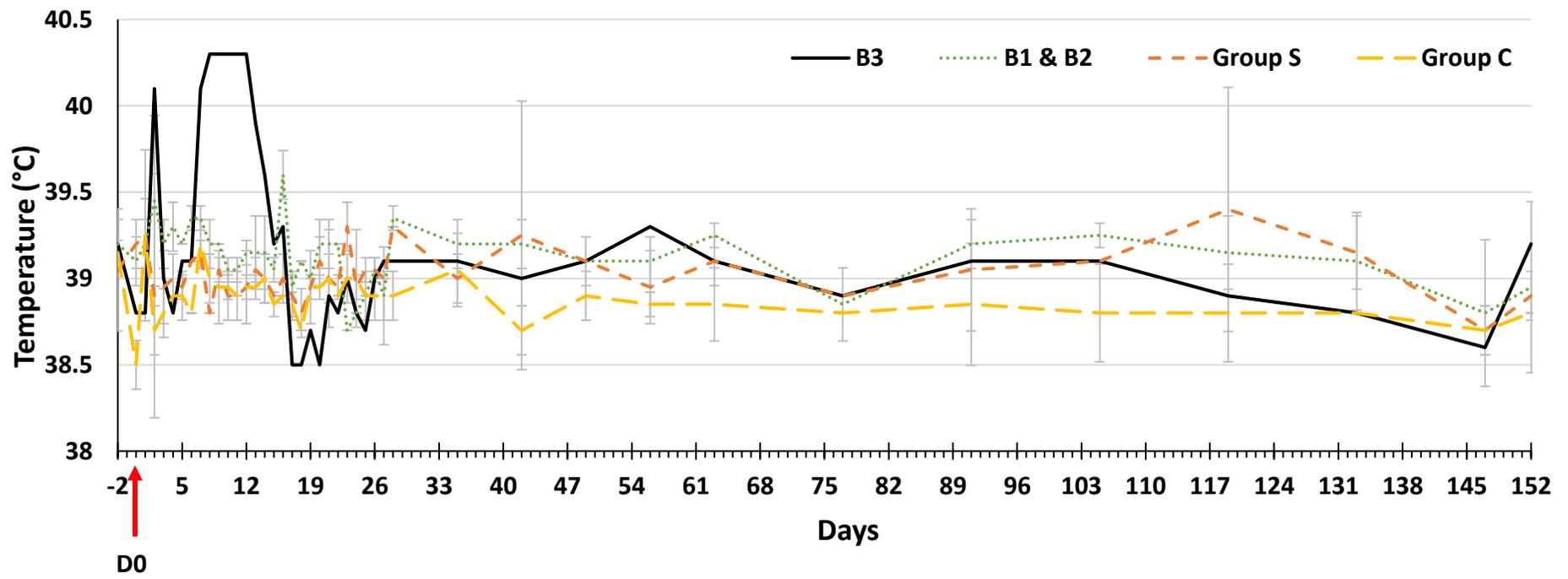


Fig. 2

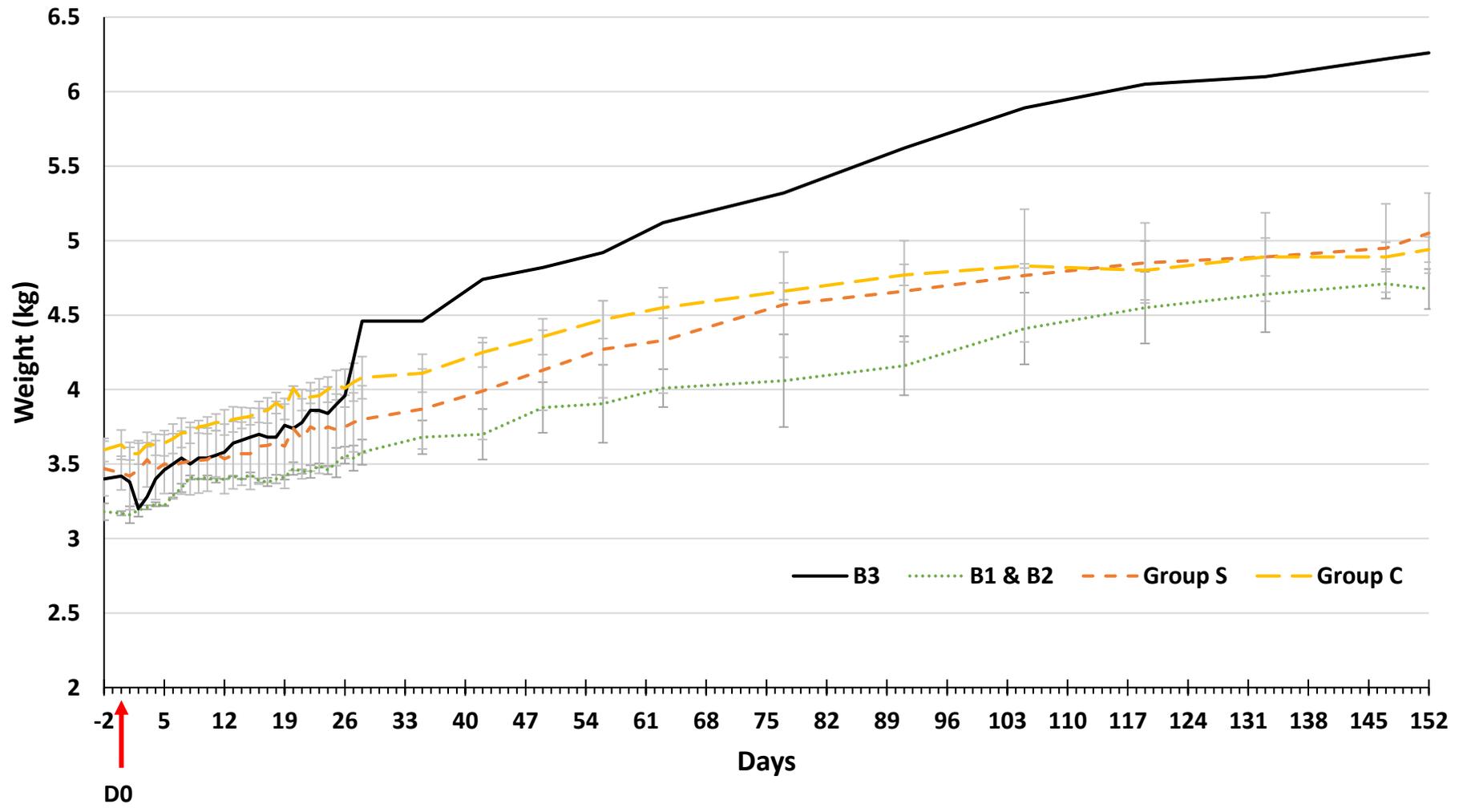
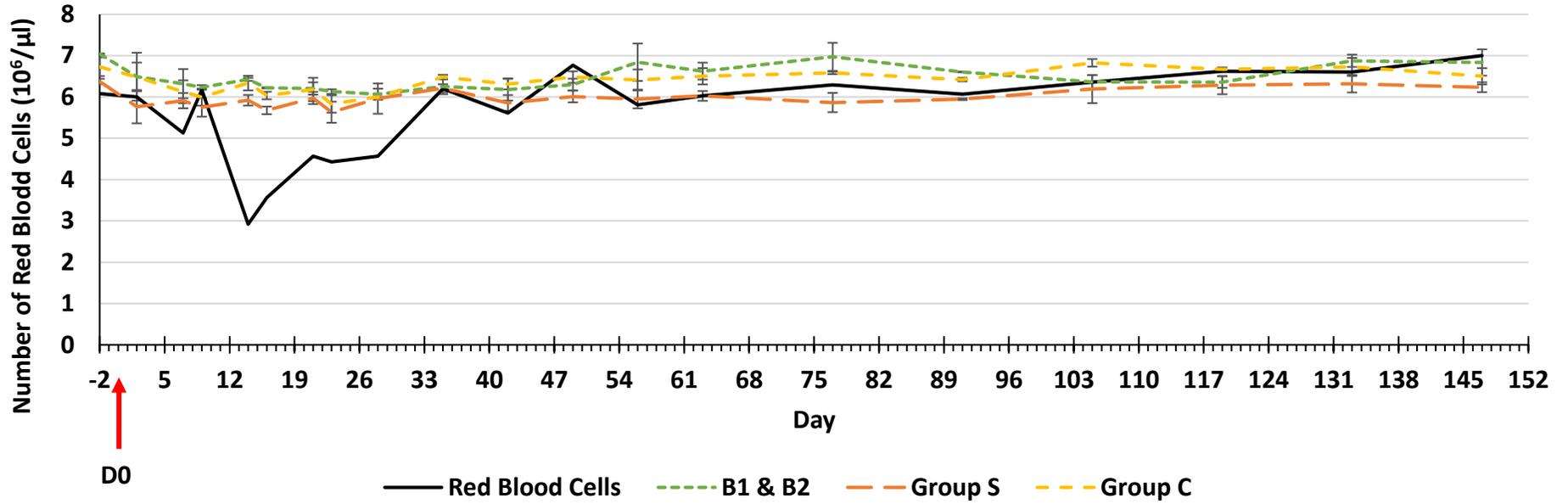
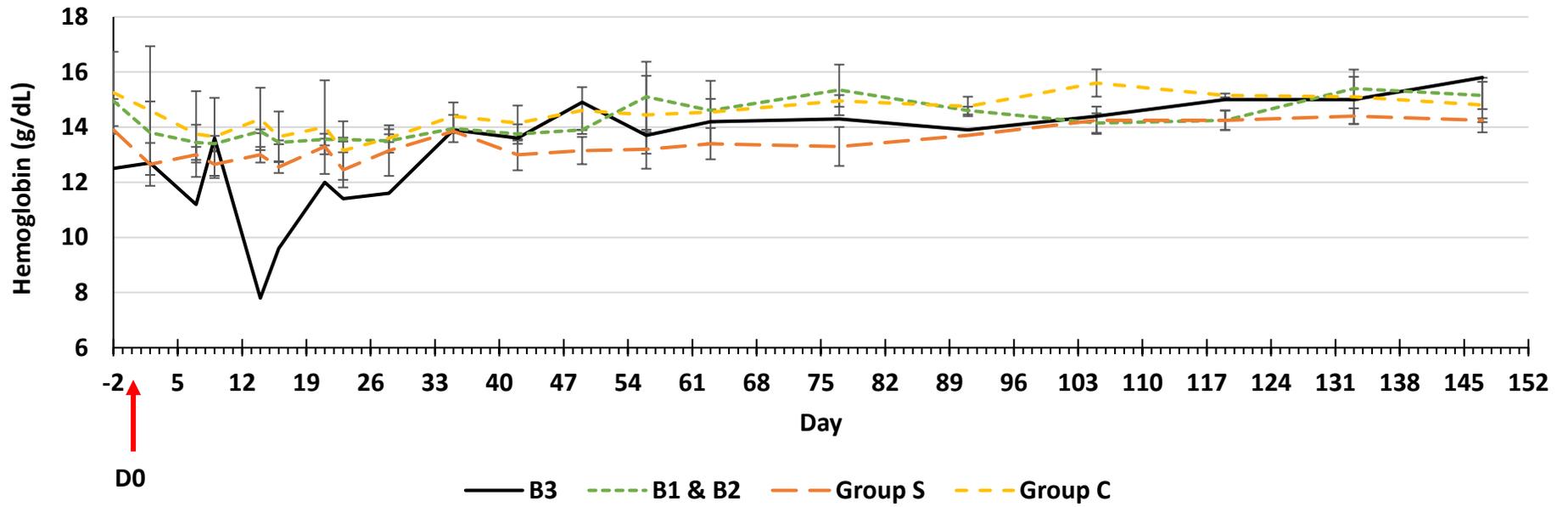


Fig. 3

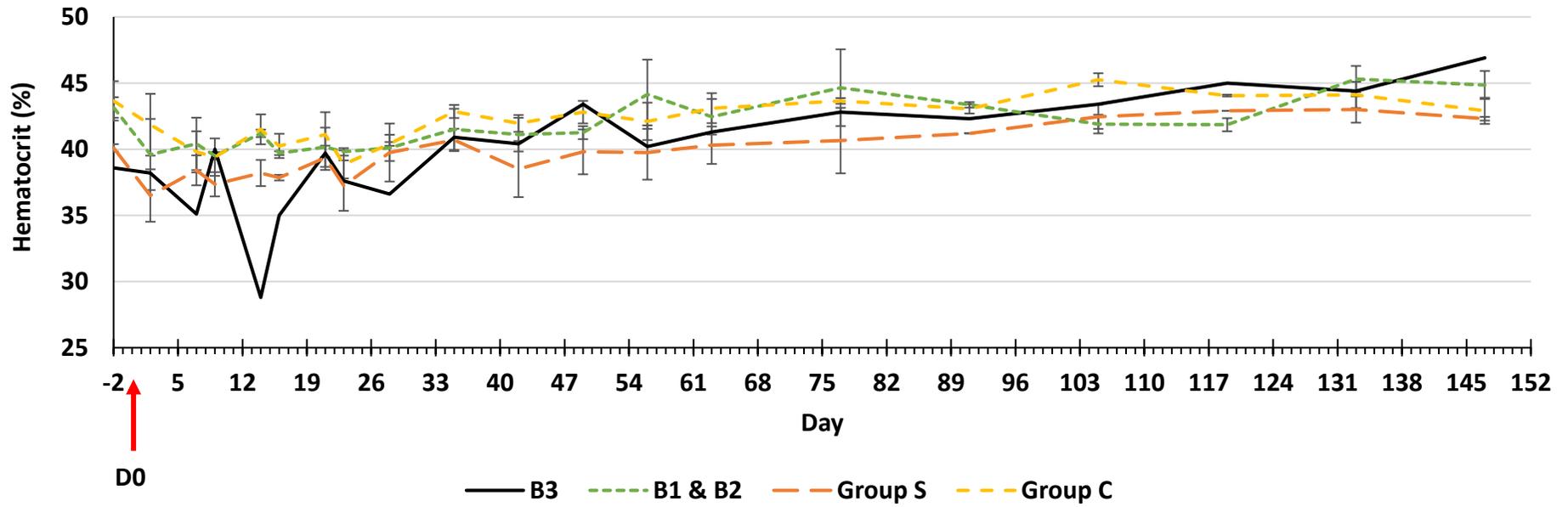
A



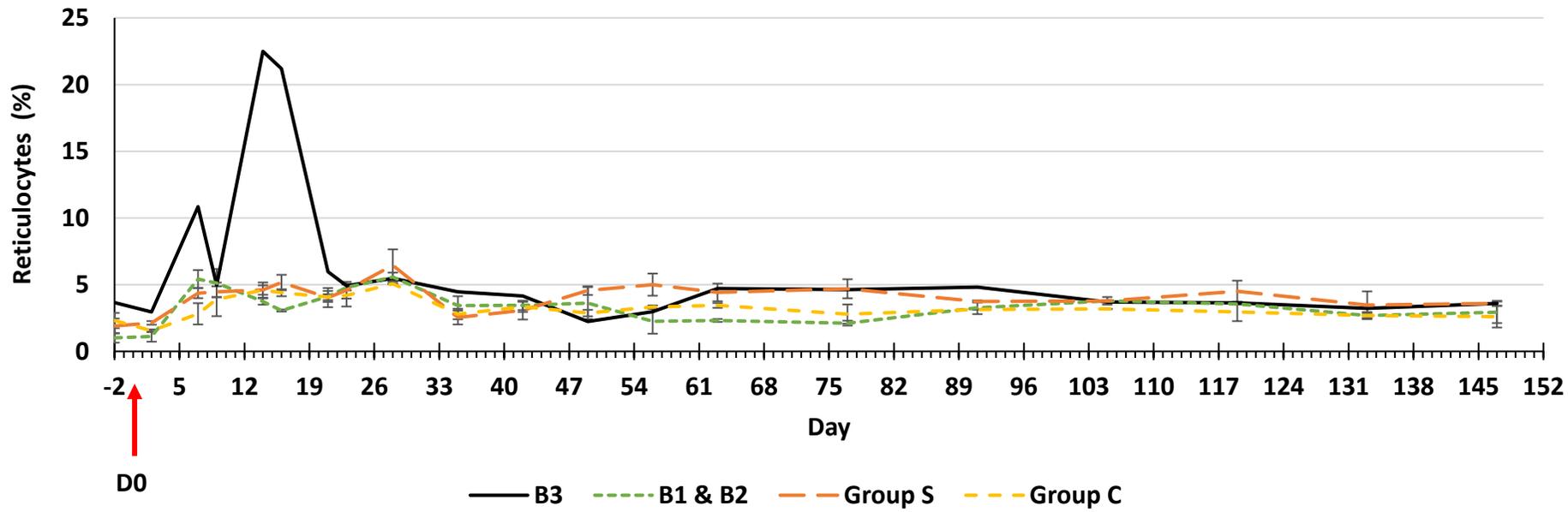
B



C



D



E

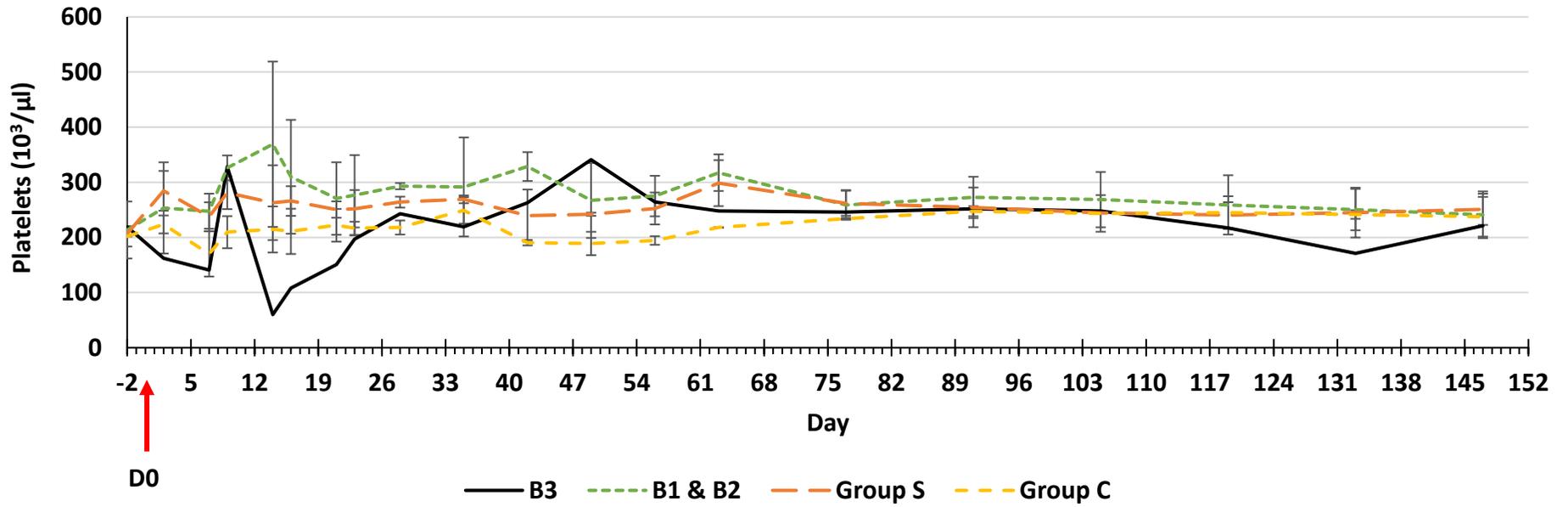
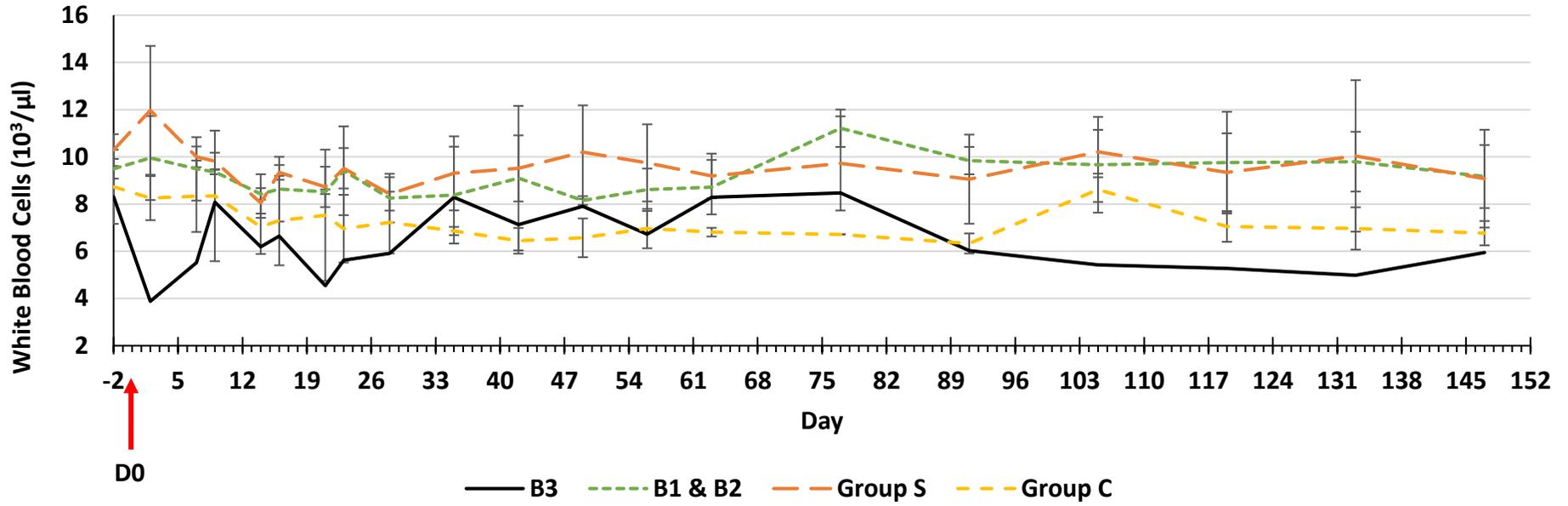
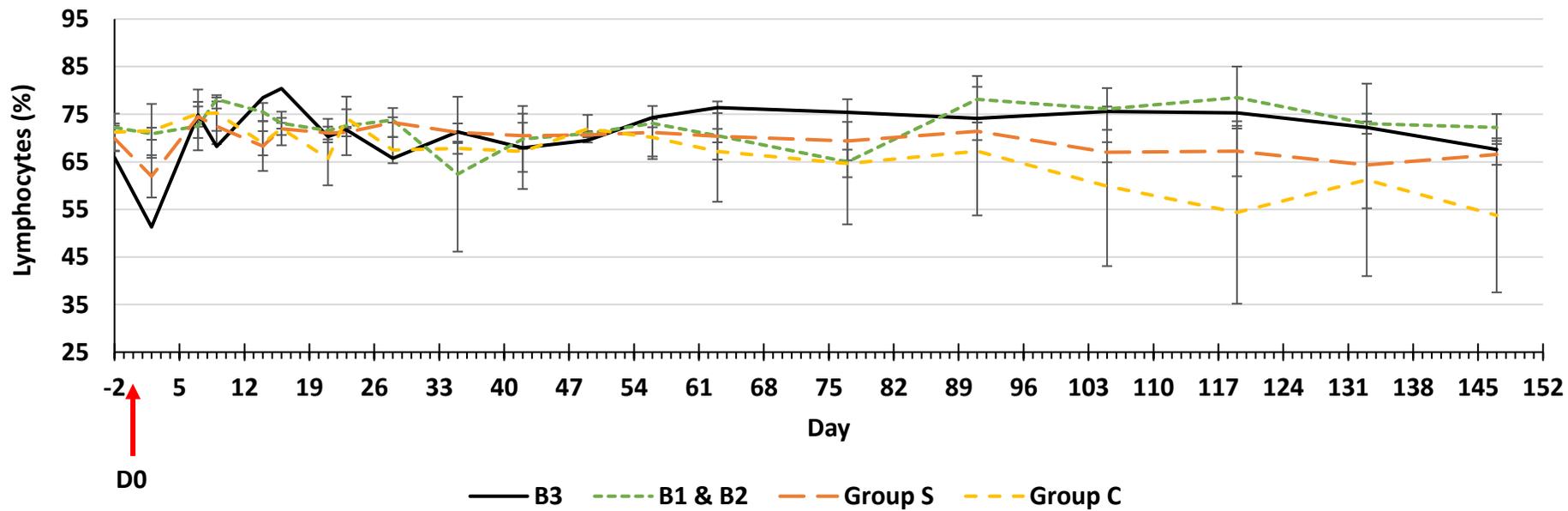


Fig. 4

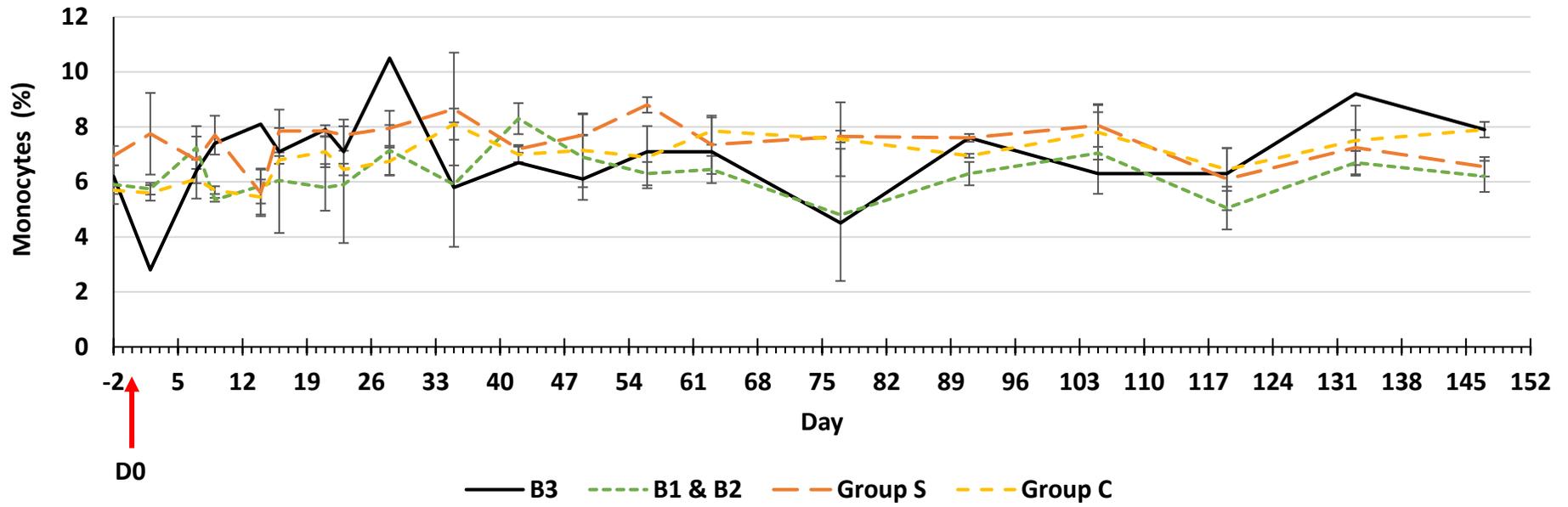
A



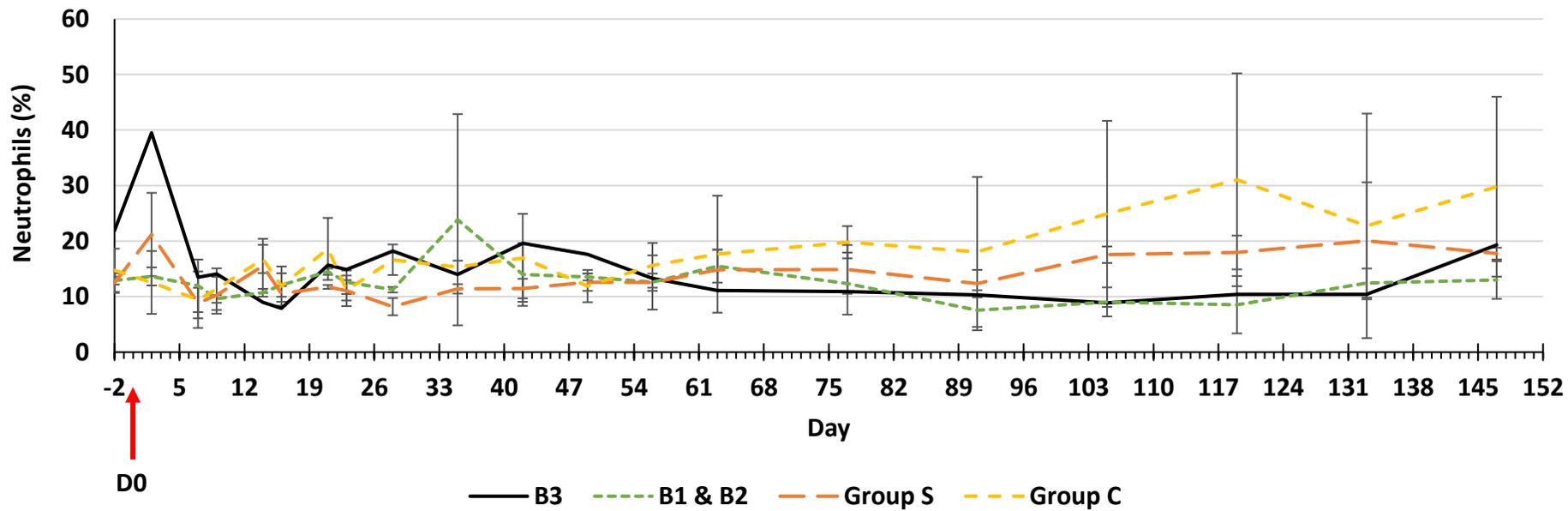
B



C



D



2-3- Résultats supplémentaires : transmission de tachyzoïtes de *B. besnoiti* aux lapins par *S. calcitrans*

Nous avons recruté trois lapins qui ont été exposés chacun à un lot de 300 mouches qui ont effectué un repas de sang interrompu sur du sang de bovin sain dans lequel ont été introduits des tachyzoïtes de culture. Les principaux points méthodologiques différents par rapport aux essais avec des bradyzoïtes sont présentés ci-après.

2-3-1-Matériel et méthodes

2-3-1-1 Origine des tachyzoïtes

Les tachyzoïtes de *B. besnoiti* utilisés dans cette expérience ont été obtenus à partir de la culture sur cellules Vero comme décrit dans la partie précédente. Ils ont été mélangés avec du sang d'un bovin indemne de *B. besnoiti* pour obtenir une concentration finale de 10^8 tachyzoïtes/ml de sang.

2-3-1-2-Lapins

Trois lapines de race Nouvelle-Zélande (« groupe T ») âgées de 12 semaines et pesant de 2,7 à 3,5 kg ont été obtenues auprès de l'unité expérimentale (Pôle Expérimental Cunicole de Toulouse de l'Institut National de Recherche Agronomique (Castanet Tolosan, Toulouse). Les lapines ont été élevées dans les mêmes conditions que décrites dans l'article soumis précédemment. Elles ont été confirmées séronégatives vis-à-vis de *B. besnoiti* par Western Blot et immunofluorescence indirecte et sans détection d'ADN de ce parasite PCR quantitative dans leur sang avant l'exposition aux stomoxes.

2-3-2-Protocole expérimental

Nous avons utilisés six lots de 300 mouches pour évaluer de la transmission des tachyzoïtes aux lapins par les stomoxes. Ils ont été exposés pendant 5 min au sang enrichi avec des

tachyzoïtes à 10^8 tachyzoïtes/ml. Les trois premiers lots de stomoxes ont été immédiatement tués à -21°C et disséqués pour estimer le taux de gorgement sur lame, la présence d'ADN de *B. besnoiti* dans les pièces buccales et le contenu abdominal. Les trois lots suivants ont été transférés immédiatement aux trois lapins T1, T2 et T3, anesthésiés et mis en contact avec la peau du flanc droit pendant 30 min (**Figure 23**). Le suivi clinique, hématologique sérologique et la recherche d'ADN de *B. besnoiti* dans le sang ont été réalisés pendant 21 semaines suivant les mêmes modalités que celles exposées dans l'article ci-dessus. À J152, les trois lapines ont été sacrifiées pour la recherche d'ADN parasitaire et de kystes à bradyzoïtes par histologie et immunohistochimie dans 24 échantillons de tissu (**Figure 24**).



Figure 23: A. Exposition des mouches aux tachyzoïtes pendant 5 min. B. Transfert des mouches sur les lapins anesthésiés pendant 30 min. C. Lésions dues aux piqûres de stomoxes sur le flanc droit des lapins.(photos originales)

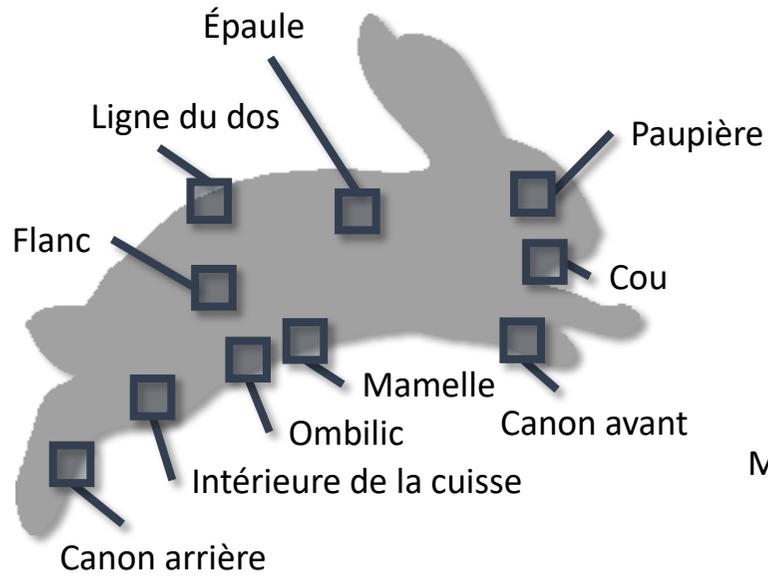
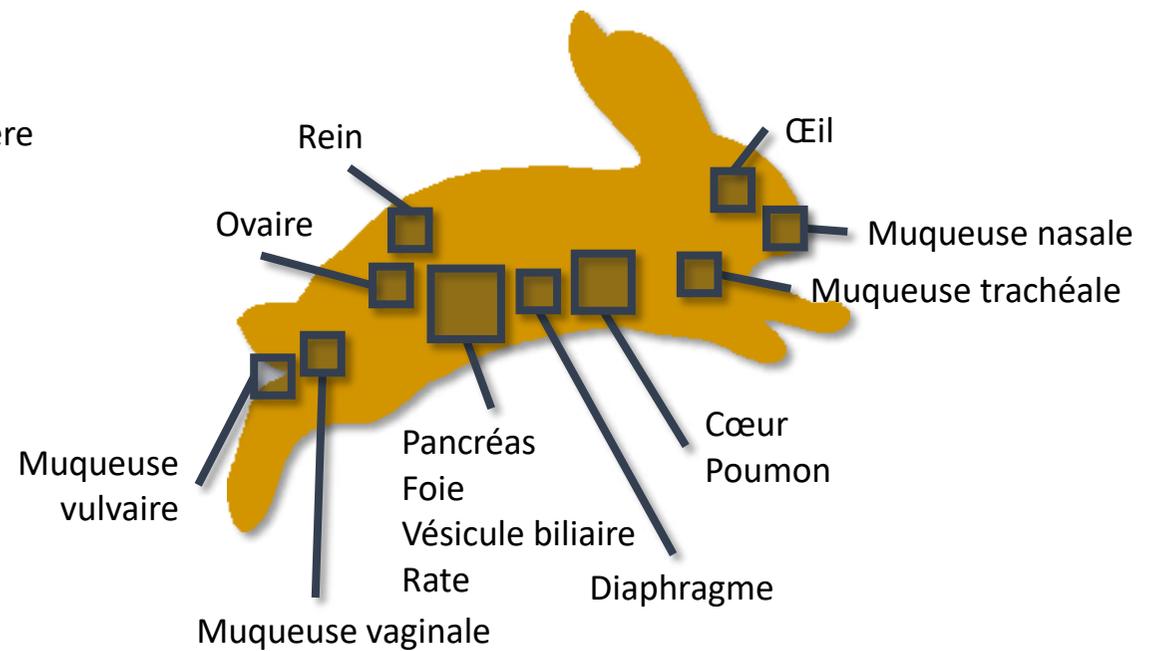
A**B**

Figure 24: Sites de prélèvement des échantillons pour les tests de PCR quantitative et les examens histologiques et immunohistologiques. A. sites cutanés. B. sites de prélèvement des muqueuses et organes

2-3-3-Résultats

Le taux de gorgement est légèrement supérieur à un stomoxe sur deux pour l'ensemble des 3 lots après un seul repas de sang mélangé à des tachyzoïtes (**Tableau 5**). L'ADN parasitaire est mis en évidence pour les trois lots, tant sur les pièces buccales que dans le contenu abdominal (**Tableau 5**). En revanche, si le nombre estimé d'équivalents-parasites est important dans le contenu abdominal (entre $3,9.10^6$ et $8,1.10^6$ équivalents parasites), il demeure très faible dans ou sur les pièces buccales avec au maximum 173 équivalents-parasites pour le lot 3 (**Tableau 5**).

Tableau 5: Taux de gorgement et charge parasitaire des 3 lots de stomoxes exposés 5 min à du sang contenant 10^8 tachyzoïtes/mL.

Numéro du lot de stomoxes	Taux de gorgement (Intervalle de Confiance à 95%)	Nombre d'équivalents parasites	
		Dans les pièces buccales	Dans le contenu abdominal
1	59 % (53,4 – 64,6)	60	$6,8.10^6$
2	61 % (55,5 - 66.5)	110	$3,9.10^6$
3	62 % (56,5 – 67,5)	173	$8,1.10^6$

Suite à l'exposition aux stomoxes potentiellement porteurs de tachyzoïtes de culture, nous n'avons pas observé de signes cliniques de besnoitiose aiguë chez aucun des trois lapins. Aucun pic d'hyperthermie supérieure à 40°C n'a été noté (**Figure 25**) et il n'y a pas eu de décrochage dans les courbes de poids dans les jours suivant l'exposition à *S. calcitrans* (**Figure 26**).

Il n'est pas non plus observé de modification de la numération-formule sanguine des lapines T1 et T2 pour lesquelles ces données ont été disponibles : ni anémie, ni leucopénie ou leucocytose (**Figures 27 A, B, C, D, E et Figures 28 A, B, C, D**).

L'ADN de *B. besnoiti* n'a pas été détecté dans le sang des trois lapins pendant toute la durée de l'expérimentation.

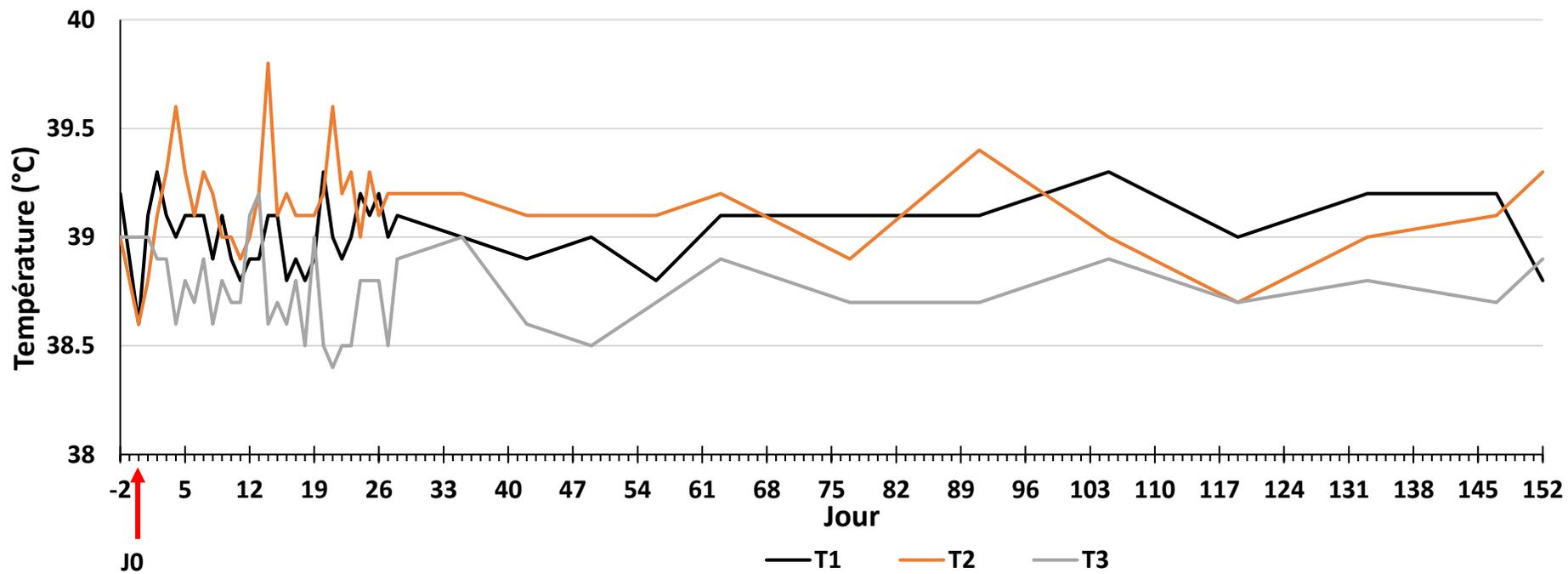


Figure 25: Variations des températures rectales des 3 lapins (T1, T2, T3) exposés aux tachyzoïtes de J-2 à J152 (en °C)

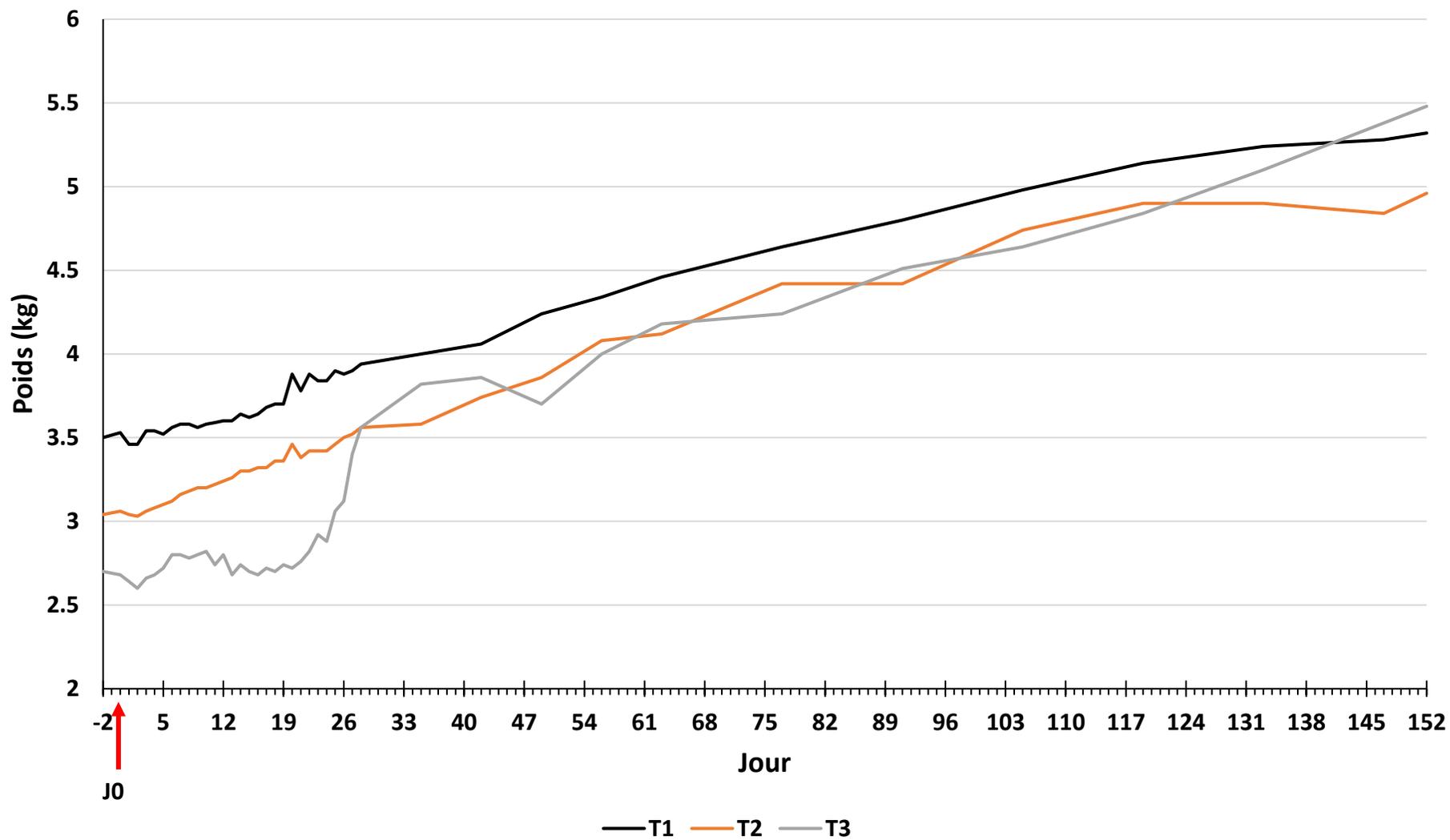
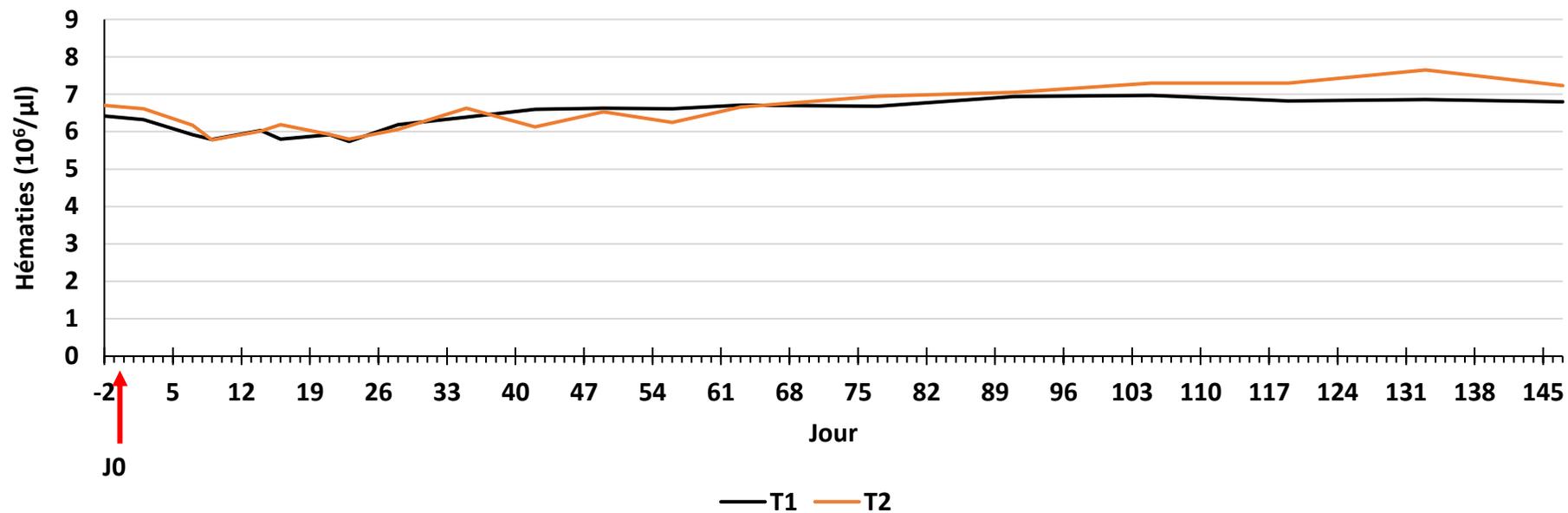
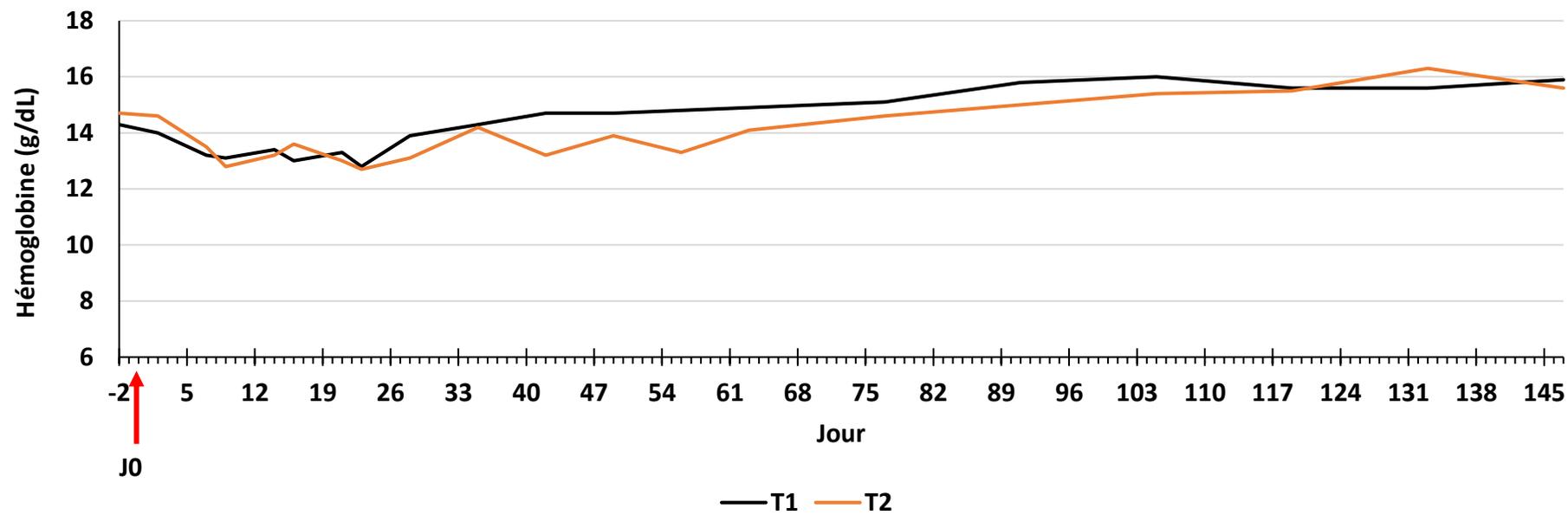


Figure 26 : Évolution des poids des lapins 3 lapins (T1, T2, T3) exposés aux tachyzoïtes de J-2 à J152 (en kg)

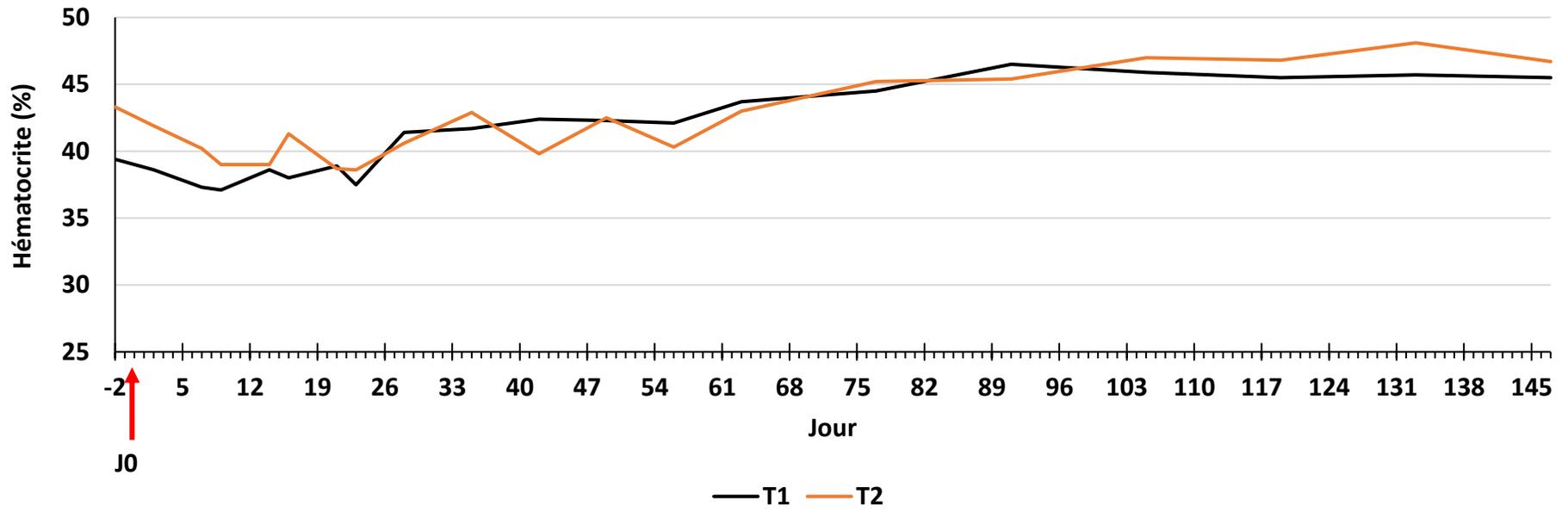
Figure 27: Profils hématologiques de J-2 à J147 des 2 lapins (T1, T2) exposés aux tachyzoïtes pour lesquels les données sont disponibles.



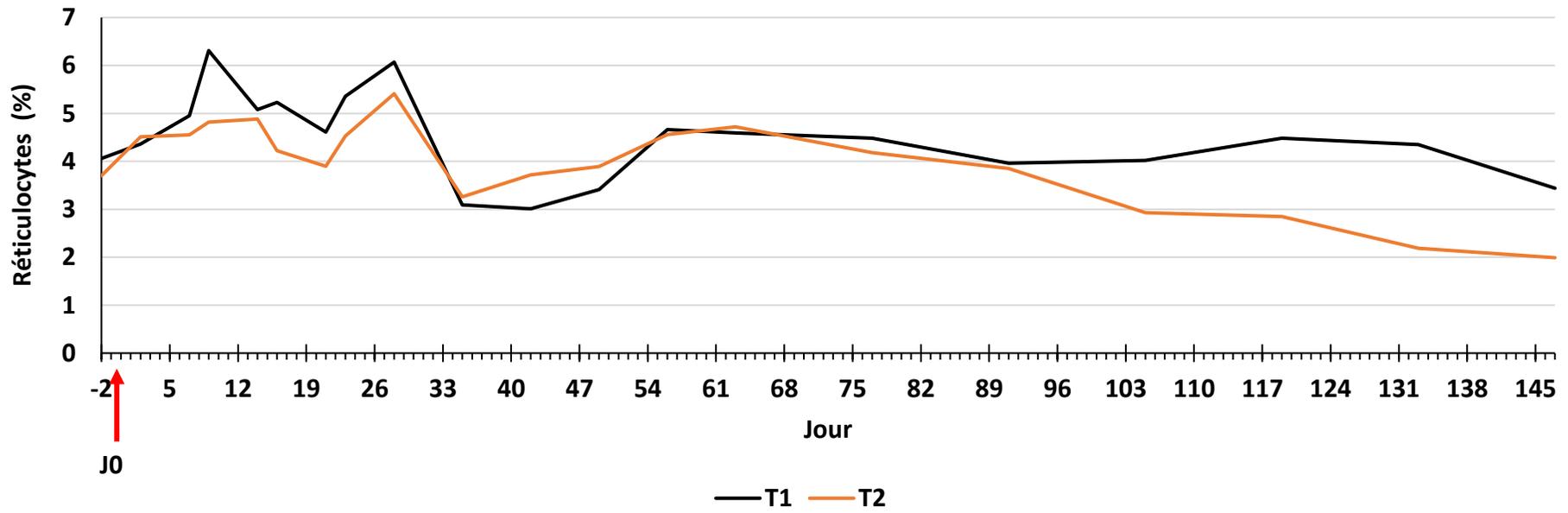
A. Nombre de globules rouges ($10^6/\mu\text{L}$)



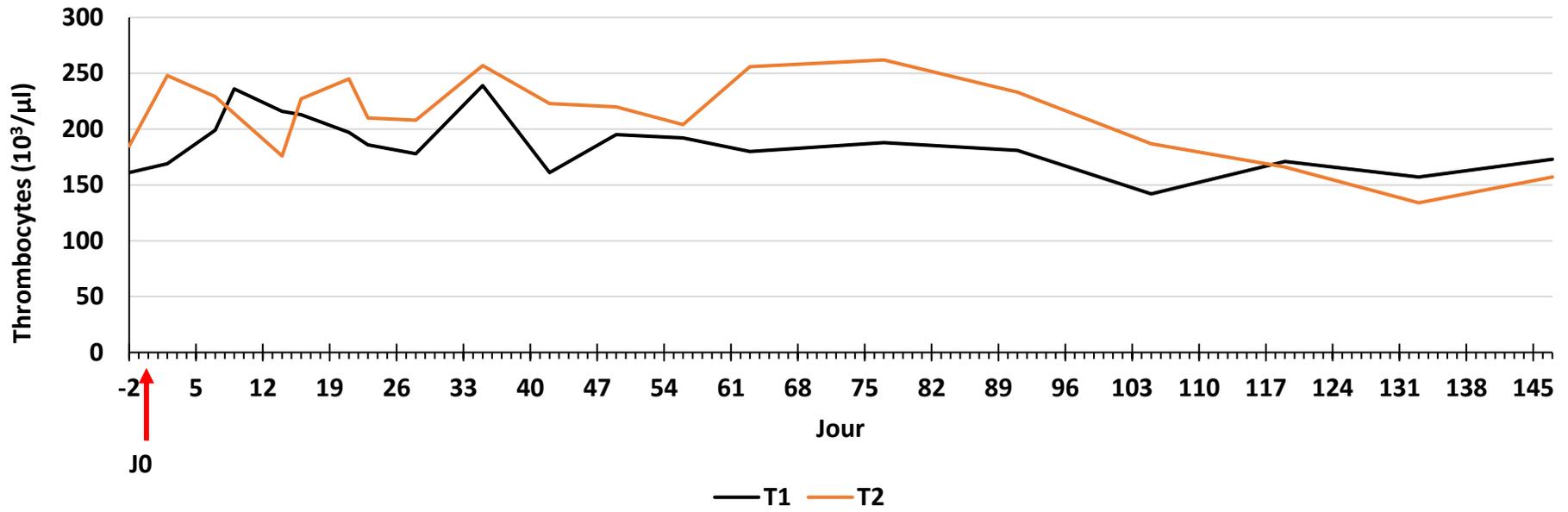
B. Taux d'hémoglobine (g/dL)



C. Hématocrite (en %)

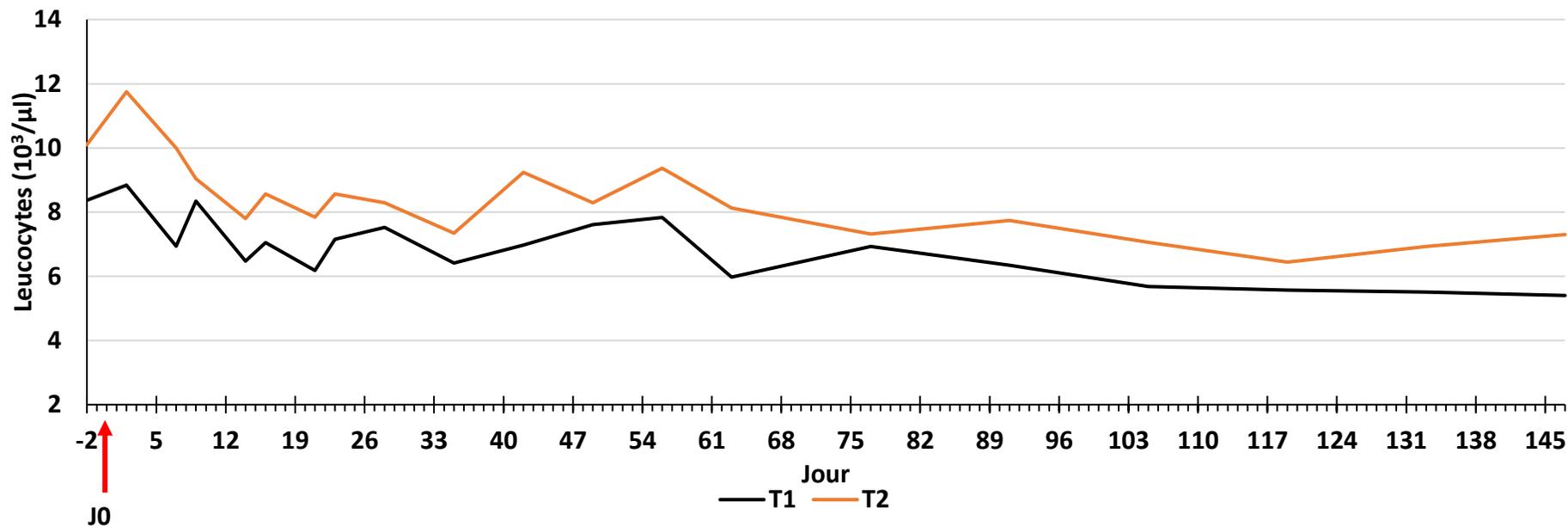


D. Pourcentage de réticulocytes

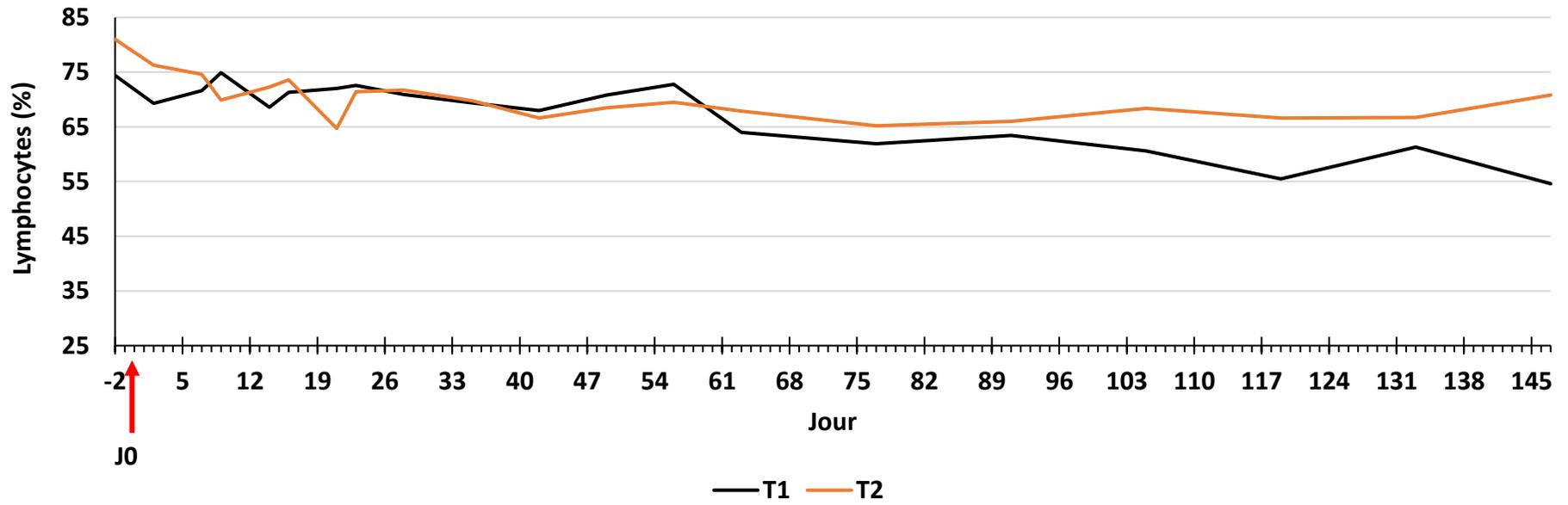


E. Coagulogramme mesuré par le nombre de plaquettes circulantes ($10^3/\mu\text{L}$)

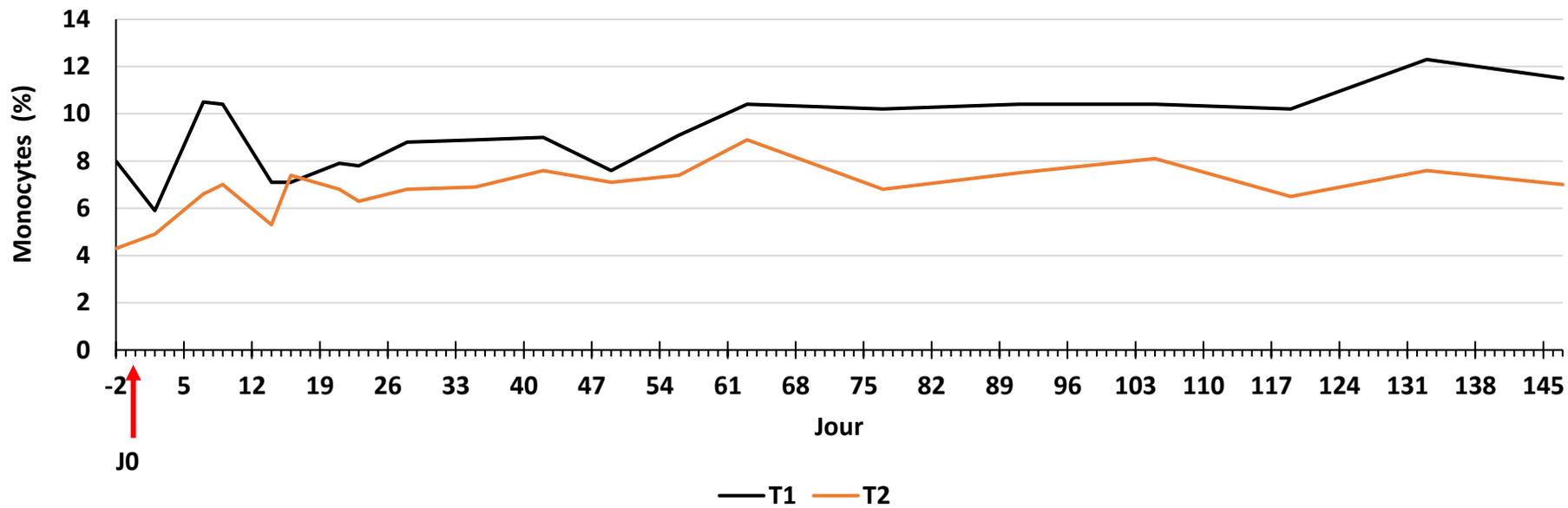
Figure 28 :Cinétique des modifications du leucogramme de J-2 à J147 des 2 lapins (T1, T2) exposés aux tachyzoïtes pour lesquels les données sont disponibles.



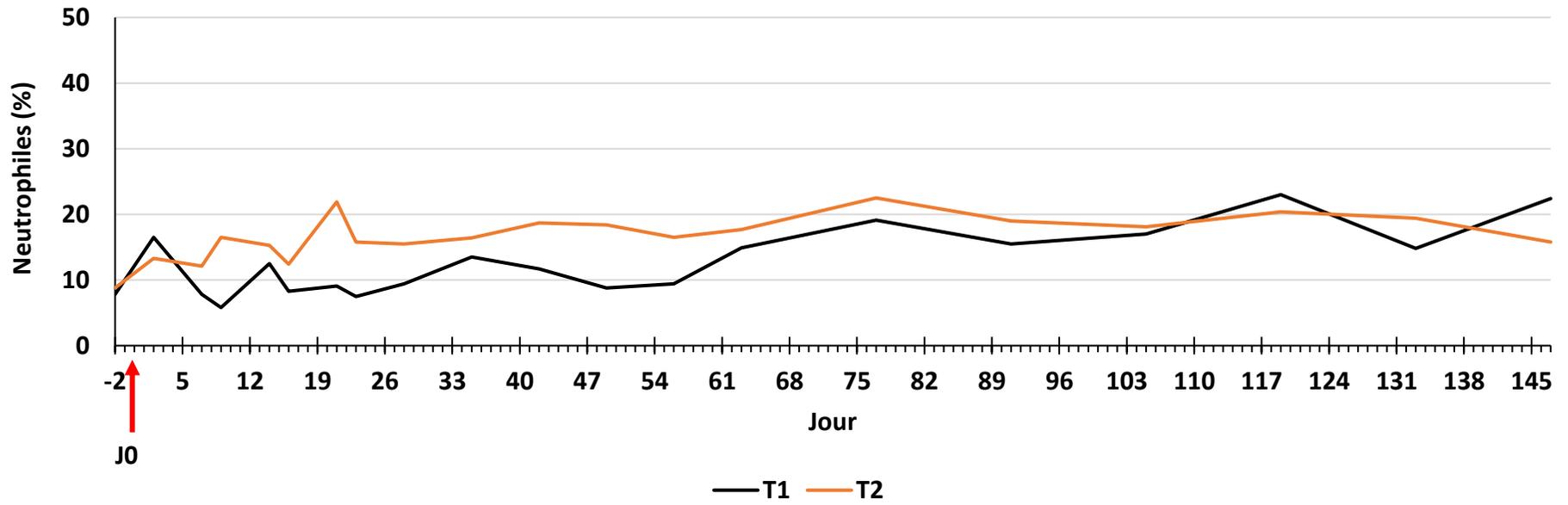
A. Variations du nombre de globules blancs ($10^3/\mu\text{L}$)



B. Variations du pourcentage de lymphocytes



C. Variations du pourcentage de monocytes



D. Variations du pourcentage de neutrophiles

Seule la lapine T3 a présenté une séroconversion à partir de J19 par immunofluorescence indirecte et quelques bandes spécifiques sont apparues dans le profil de l'immunoblot à J14. Le titre anticorps a été de 1:400^{ème} de J19 à J35. Il a augmenté à 1:800^{ème} jusqu'à J77 après exposition aux piqûres de stomoxes avant de revenir à J84 et jusqu'à la fin de l'expérimentation à 1:400^{ème}. Le nombre et l'intensité des bandes du profil western blot ont augmenté entre J14 et J77 (zone comprise entre 20 et 75 kDa) puis ce nombre s'est maintenu au-delà de cette date mais avec une intensité moins marquée (**Figure 29**). Seules les cinq dates clés avec des modifications importantes du pattern sont présentées dans cette **Figure 29**. Il existe deux bandes non spécifiques aux alentours de 75 kDa visibles sur le témoin et à J-2 avant l'exposition.

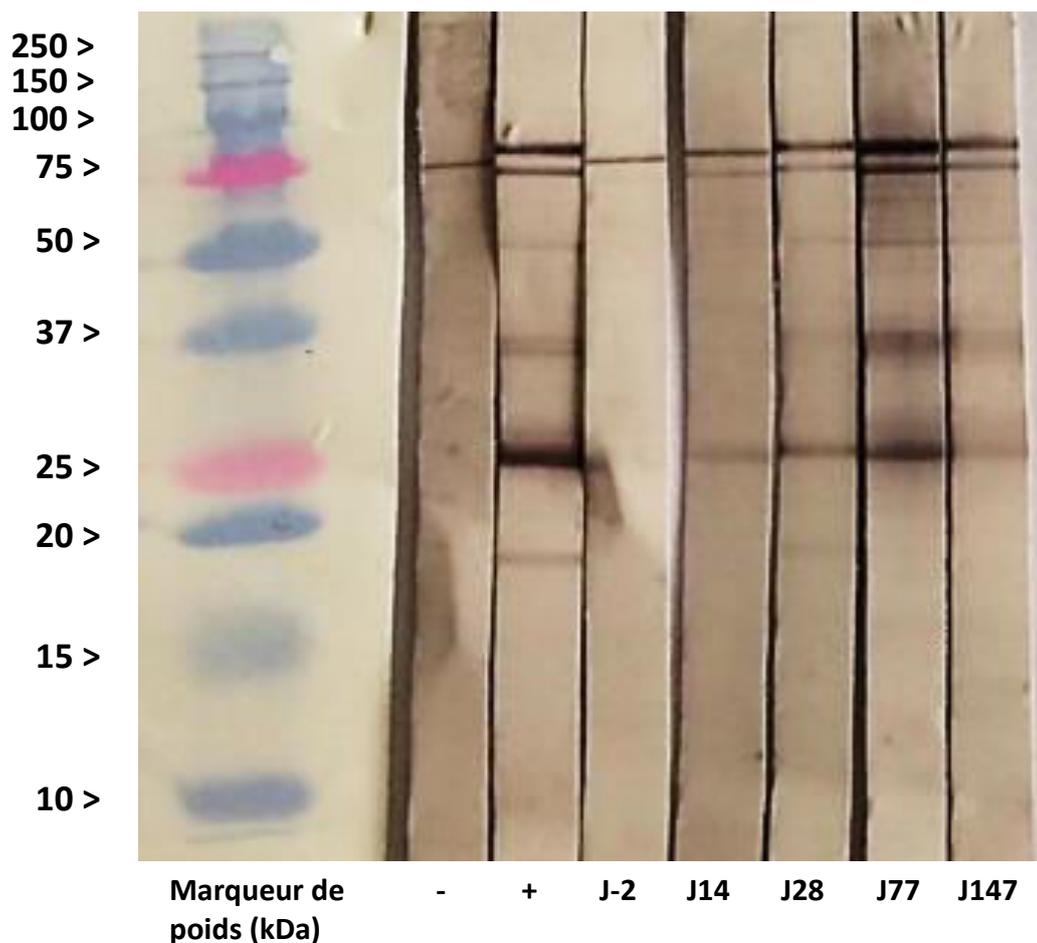


Figure 29: Profil partiel du Western Blot du lapin T3 de J-2 à J147 exposés aux piqûres de 300 stomoxes potentiellement porteurs de tachyzoïtes de *B. besnoiti*.

À l'autopsie, l'ADN de *B. besnoiti* a été détecté uniquement chez le lapin T3 avec six échantillons positifs sur 24 : deux provenant de la peau, deux de muqueuses et deux d'organes (**Tableau 6**). Le nombre calculé d'équivalents-parasites est très faible (< 25). Aucun kyste n'a été observé par l'histologie classique et immunohistochimie dans les échantillons-miroirs de ces prélèvements positifs par PCR quantitative. Il n'a pas été observé non plus d'inflammation dans ces tissus examinés.

Tableau 6: Nombre d'équivalents-parasites pour les échantillons cutanés et d'organes positifs par PCR quantitative pour l'ADN de *B. besnoiti* provenant du lapin T3.

Échantillon	Nombre d'équivalents parasites
Ombilic	< 10
Cou	< 10
Muqueuse nasale	18
Muqueuse trachéale	< 10
Œil droit	< 10
Ovaire droit	23

2-4- Discussion générale du chapitre 2

Le taux de gorgement des stomoxes sur les lames a été meilleur que lors de l'exposition aux vaches infestées chroniquement car de l'ADN parasite a été trouvé chez les trois lots de mouches. En outre la quantité d'ADN mis en évidence a été largement supérieure dans ces lots de mouches par rapport à l'unique lot de mouches positives gorgées sur bovin en phase de sclérodermie.

Malgré ces premiers résultats positifs, il n'y a eu qu'un seul lapin du groupe « Tachyzoïtes » (lapin T3) qui a séroconverti, comme cela a été le cas dans le groupe Bradyzoïte. Après la séroconversion légèrement plus tardive que pour le lapin B3, le titre d'anticorps de ce lapin a été sujet à une augmentation pour atteindre 1:800^{ème} à J42 puis à une diminution après J77. Cette cinétique des anticorps est différente pour le lapin B3. Après sa séronconversion à J14, son titre d'anticorps est resté élevé (1:800^{ème}) pendant toute la durée de l'expérimentation. Il n'a pas été observé pour le lapin B3 de variations d'intensité des bandes par Western blot au cours du suivi. Ces différences de titre d'anticorps et de cinétique ont déjà été précédemment reportées lors d'infections expérimentales de lapins par des tachyzoïtes ou des bradyzoïtes inoculés par voie sous-cutanée (**Liénard et al., 2015**). Cette séroconversion indique que les stomoxes sont capables de transmettre des tachyzoïtes aux lapins mais que la production d'anticorps est plus importante avec les bradyzoïtes. Les raisons de cette différence ne sont pas connues. Une possibilité expliquant cette différence serait un pouvoir immunogène différent entre les bradyzoïtes et les tachyzoïtes suggérés par des profils antigéniques différents (**Fernández-García et al., 2009a**) et des ruptures aléatoires des kystes libérant de nouveaux bradyzoïtes stimulant à nouveau le système immunitaire (**Frey et al., 2013b**). Toutefois, nous n'avons pas retrouvé ici de kystes ni dans les essais avec les bradyzoïtes ni dans ceux avec les tachyzoïtes.

Cette transmission de tachyzoïtes par les stomoxes au lapin T3 est demeurée silencieuse cliniquement à la différence du lapin B3 : il n'y a eu ni hyperthermie ni jetage, ni perte de poids ou de détection d'ADN parasitaire dans le sang. Malheureusement, les paramètres hématologiques n'ont pas été disponibles pour cet animal empêchant toute comparaison possible. L'absence apparente de virulence des tachyzoïtes, par comparaison avec les bradyzoïtes, pourrait au moins être due à deux facteurs : la dose de tachyzoïtes transmise par les stomoxes est trop faible pour déclencher le cortège clinique mais suffisante pour initier une

réponse immunitaire et il est envisageable que la virulence des tachyzoïtes ait été atténuée par la culture sur cellule Vero (**Liénard et al., 2015**). Cette atténuation de virulence a été rapportée pour *T. gondii* et *N. caninum* suivant le type de lignées cellulaires de culture utilisées et le nombre de passage *in vitro* (**Khordadmehr et al., 2013**). Cette diminution de virulence par culture cellulaire des tachyzoïtes pourrait être à l'origine de l'utilisation des tachyzoïtes pour la vaccination des bovins en Israël (**Álvarez-García et al., 2014b**).

Six sites tissulaires prélevés sur le lapin T3 ont révélé la présence d'ADN parasite sans qu'il soit possible de mettre en évidence de kyste ou d'inflammation par histologie et immunohistochimie, comme cela avait été déjà le cas pour le lapin B3. Les charges parasitaires estimées sont très faibles dans tous ces échantillons. La muqueuse trachéale est le seul échantillon qui soit positif à la fois pour les lapins T3 et B3. L'arbre respiratoire supérieur apparaît ainsi comme un site privilégié pour la persistance du parasite chez le lapin, et ceci est commun avec les bovins (**Frey et al., 2013 ; Liénard et al., 2015**). Dans l'étude précédente (**Liénard et al., 2015**), aucun site prélevé n'avait révélé la présence d'ADN parasite ou de kystes pour les lapins inoculés par les tachyzoïtes de culture. Il y a donc ici eu possibilité de maintien de l'ADN parasite jusqu'à 152 jours après l'exposition aux piqûres de stomoxes. Comme pour les bradyzoïtes, si des kystes ont été réellement présents, ils ont été peut-être en trop petit nombre pour être détectés par l'histologie et l'immunohistochimie, malgré les coupes sériées pratiquées sur les échantillons. Une explication alternative est qu'il n'y ait pas eu développement de kystes. L'absence de kystes met en avant une limite du modèle hétérologue utilisé ici et discutée dans l'article soumis. Malgré tout, il est également très difficile d'obtenir des kystes par infection expérimentale chez le bovin (**Álvarez-García et al., 2014b**). En revanche, il semble certain que l'ADN du parasite ait perduré toute la durée de notre étude. La présence d'ADN parasite ne signifie pas nécessairement la présence du parasite intact et viable. Il est rapporté ainsi qu'après un traitement curatif, l'ADN de *Plasmodium falciparum*

peut persister et être détecté dans le sang humain jusqu'à six semaines sans mise en évidence des formes sexuées et asexuées (**Vafa-Homann et al., 2017**). Nos résultats suggèreraient que la clairance de l'ADN de *B. besnoiti* pourrait être très longue, atteignant ici 152 jours. De nouvelles investigations semblent donc requises. En outre, ces mêmes travaux concernant la persistance de l'ADN de *P. falciparum* rapportent que la durée de détection de l'ADN parasite n'est pas corrélée à la charge infectieuse initiale (**Vafa-Homann et al., 2017**). Or, les charges parasitaires potentiellement transmises par les stomoxes, que ce soit sous la forme de bradyzoïtes ou de tachyzoïtes, sont très faibles d'après les mesures effectuées à l'issue du premier repas de sang.

En conclusion, nos travaux illustrent la difficulté de démonstration de la transmission mécanique d'agents pathogènes utilisant des modèles *in vivo* puisque dans chacun des deux essais uniquement un lapin sur trois a effectué une séroconversion et des signes cliniques ont été observés uniquement lors de l'exposition aux bradyzoïtes. Toute chose égale par ailleurs, d'autres auteurs travaillant sur le rôle vecteur mécanique de *S. calcitrans* ont connu des résultats similaires où la transmission effective n'est pas systématique. À titre d'exemple, **Prullage et al. (1993)** ont réussi à transmettre immédiatement *Mycoplasma suis* via *S. calcitrans* d'un porc infecté à un porc sensible dans trois essais sur 15. *Anaplasma marginale* a été transmise sans délais par les stomoxes d'un bovin à l'autre dans un cas sur trois (**Potgieter et al., 1981**).

Les mécanismes impliqués dans la transmission mécanique devraient être également plus étudiés afin d'estimer si la souillure des pièces buccales intervient uniquement ou si la régurgitation du repas précédent est impliquée également (**Butler et al., 1977**).

En utilisant uniquement 300 stomoxes, nombre réaliste en regard des pullulations estivales sur les bovins, il a été possible de transférer immédiatement des bradyzoïtes virulents mais aucun kyste ne s'est développé. Une augmentation du nombre de stomoxes pourrait sans doute augmenter la charge infectante sous l'hypothèse d'un effet-dose. Ce nombre est bien en-deçà

des estimations de **Bigalke (1968)** et suggère un rôle bien plus important des stomoxes dans la transmission locale de *B. besnoiti* qu'il n'avait été considéré jusqu'ici. Le contrôle des populations de stomoxes est donc un enjeu crucial tant pour le bien-être des animaux que pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes. De nouvelles méthodes demandent à être développées et sont l'objet du chapitre suivant.

3- Chapitre 3 : nouvelles méthodes de lutte contre les stomoxes.

3-1-Attractivité des écrans bleus

3-1-1-Contexte et objectifs de l'étude

Plusieurs insecticides de la famille des pyréthrinoïdes sont largement utilisés de nos jours chez les bovins pour lutter contre *Stomoxys calcitrans*. Toutefois, des cas de résistance aux pyréthrinoïdes ont été identifiés chez cette espèce en France (**Salem et al., 2012**) et aux USA (**Pitzer et al., 2010**). La recherche de méthodes alternatives, plus efficaces et plus pérennes pour contrôler ces insectes, est donc nécessaire. Parmi celles-ci, l'utilisation de systèmes attractifs et toxiques comme des écrans imprégnés d'insecticides, pourrait apporter une contribution très importante au contrôle de ces mouches en élevage bovin. C'est l'objet du troisième chapitre de ce manuscrit.

Dans cette étude, six écrans bleus en matière plastique et un écran bleu en tissu, présentant de légères différences de réflectance autour de 460 nm, ont été testés en 2016 sur le campus de l'ENVT à Toulouse, afin d'évaluer et de comparer leur attractivité et leur spécificité pour les stomoxes. Des facteurs importants à prendre en considération dans l'efficacité de ces pièges ont également été étudiés comme la hauteur des écrans, leur orientation est-ouest ou bien leur proximité avec différents types d'hôtes ou les tas de fumier. Les six écrans bleus en plastique ont été évalués lors de deux séries d'observations s'étalant sur une période de 6 semaines (du 26 juillet 2016 au 5 septembre 2016). Chaque essai a été réalisé avec 4 écrans : 3 écrans bleus en plastique et l'écran de tissu qui a servi de référence entre les deux séries d'observations. Chaque expérience a été effectuée en triplicata pendant trois semaines successives, selon un dispositif en carré latin. Les deux faces de chaque écran bleu ont été recouvertes d'un film collant transparent afin de retenir tous les insectes attirés par les écrans. Pour chaque journée de piégeage, les écrans bleus ont été installés le matin (8 h 30) et récupérés l'après-midi (16 h

30) pour une séance de piégeage de huit heures par jour, puisque l'activité des *S. calcitrans* est connue pour être diurne dans le sud-ouest de la France (**Jacquet et al., 2014**). Tous les insectes et mouches capturés sur les films collants ont été comptés, piège par piège, puis identifiés et classés en trois catégories (stomoxes, Tabanidés et insectes pollinisateurs).

Les résultats ont montré une forte attractivité de l'ensemble des écrans bleus testés (écrans en plastique comme l'écran bleu de tissu) pour l'espèce *S. calcitrans*. Un nombre total de 125404 mouches d'étables a été capturé au cours de la première série d'observations soit une moyenne de 2613 stomoxes par piège et par jour (écart-type = 1480, médiane = 2110 ; minimum = 744 et maximum = 7301). Le nombre total de stomoxes capturé lors de la deuxième série d'observations (N = 39288) est significativement plus faible ($p < 0,0001$) que lors de la première session. Toutefois, le nombre moyen de stomoxes capturé par piège et par jour reste relativement élevé : 819 stomoxes (écart-type = 492 ; médiane = 710 ; minimum = 141 et maximum = 2515). Aucune différence significative de niveau de capture n'a été observée entre les quatre types d'écrans pour une même série. Plus de 70% des stomoxes capturés le sont sur la moitié inférieure des pièges ($p < 0,05$). Même si la face « est » capture une courte majorité de stomoxes par rapport à la face « ouest », la différence n'est pas significative. La proximité des écrans avec certains paddocks semble jouer un rôle important dans les niveaux de capture. Enfin, en comparaison des niveaux de captures de stomoxes, les Tabanidés et les insectes pollinisateurs sont très peu représentés sur les écrans.

En conclusion, les principaux résultats de cette étude sont : i) les nombres élevés de *S. calcitrans* capturés lors des deux expériences quel que soit le type d'écran bleu ou la répétition et ii) l'absence de différence notable de niveaux de captures entre types d'écrans pour une même période d'observation. L'ensemble de ces résultats font l'objet du manuscrit suivant (en préparation)

3-1-2- article en preparation

Title: Evaluation of attractiveness and specificity of different blue screens on *Stomoxys calcitrans*.

Authors :

Sharif S.¹, Liénard E.¹, Duvallet G.², Etienne L.² Mongellaz C.¹, Grisez C.¹, Franc M.³, Bouhsira E.¹, Jacquet P.^{1*}

1 : UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Université de Toulouse, Toulouse, France

2. UMR 5175 Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Université Paul Valéry de Montpellier III, France

3. Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France

* Corresponding author

UMR INRA / ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes,
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23, chemin des capelles
BP 87 614
31076 Toulouse cedex 03
France
p.jacquet@envt.fr

Abstract

Stomoxys calcitrans is considered as a major pest of livestock worldwide. Insecticides have been extensively used to control this pest but resistance to these chemical compounds is now reported in many countries. Therefore, a more sustainable and efficient control is needed. Seven different types of blue screens, with slight differences in their reflectance around 460 nm, were tested during summer 2016 in southwestern France to evaluate their attractiveness and their specificity for stable flies. Height of the screen and orientation (east or west) of a blue screen were also considered. High levels of *S. calcitrans* captures were recorded during this study (from 141 to 7301 individuals per blue screen and per day) whereas the numbers of Tabanids and pollinator insects remained very low (less than 10 individual per screen and per day). No significant difference in attractiveness has been shown between the different types of blue screens. The lower half of the blue screens caught significantly more stable flies (70%) than the higher half (30%). The “east” side of the screen was a little more attractive (60% of stable flies) than the west side. These results are highlighting the interest of these blue screens to control stable flies in cattle farms.

Introduction

The stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) is a cosmopolitan pest of livestock, which compromises animal and human welfare. Males and females are harassing hematophagous insects, feeding preferentially on ungulates but also on dogs and humans and are causing painful bites (Hogsette et al., 1987; Taylor & Berkebile, 2006). High levels of biting activity lead to substantial reductions in beef cattle weight gains (Campbell et al., 2001) and in milk production in dairy cows (Miller et al., 1973; Mullens and Meyer, 1987). In the United States, the economic losses due to *S. calcitrans* have been estimated to be more than \$ 400 million per year in the beef cattle industry only (Wieman et al., 1992; Dougherty et al., 1995; Taylor et al., 2012). The stable fly is also a mechanical and a biological vector of numerous pathogens of veterinary and zoonotic importance (Baldacchino et al., 2013).

The control of stable flies relies mainly on the use of insecticides, such as pyrethroids, applied on beef or dairy cattle. The exposure of stable flies to pyrethroids, applied on cattle, is limited by their feeding behavior: they spend most of their time off the host, the complete blood meal is achieved in less than 3 minutes and the preferential bite sites are legs of cattle and horses where insecticide concentrations are the lowest (Salem et al., 2012a). However, pyrethroids could be also applied on barn's walls where stable flies spend most of their time increasing the selective pressure on stable flies' populations. Indeed, resistance to pyrethroids has been reported recently in Florida (Pitzer et al., 2010; Olafson et al., 2011) and in southwestern France (Salem et al., 2012b) and probably occurs in many other parts of the world. Alternative and sustainable control methods that ensure a minimized use of insecticides in fly control management are needed to address the spread of resistance and the increasing public concern over effects of insecticides on health and environment.

Trapping is considered as an appropriate method to monitor population dynamics of hematophagous flies and could readily help in the control of some of them such as Tsetse flies

(Lehane et al., 2016). Methods of biting-flies trapping used for tsetse flies in Africa were subsequently tested for stable flies. Blue cloth traps such as Vavoua traps are useful to monitor stable flies populations (Gilles et al. 2007) and have been used in different studies of seasonal dynamics of populations in the Indian Ocean (Gilles et al., 2005), Thailand (Masmeatathip et al., 2006) and in mainland France (Jacquet et al., 2014). However, the total numbers of stable flies entering within the Vavoua traps per day are relatively low in each of these studies (most of time less than 100 stable flies per trap and per day even at the seasonal peak of activity), excepted in La Reunion Island where Gilles et al (2007) reported that one Vavoua trap could catch up to 600 individuals per day. This could be due to a lack of attractiveness of the trap itself and/or to the behavior of the stable flies around the traps. Indeed, only a low percentage (less than 25%) of the insects that land on a trap finally entered them (Mihok, 2002). This observation suggests that an insecticide impregnated screen used as resting site would kill much more insects than a trap itself. This strategy was proposed a long time ago (Schoenefeld, 1983; Challier, 1984) for Tsetse flies and was successfully employed in some Gambian sleeping sickness foci (Lehane et al., 2016). However, before implementing a control strategy with attractive screens, their specificity should be carefully checked. A non-specific one, catching less biting flies than pollinating insects or in equal numbers for example, will be discarded immediately from an integrated control strategy.

Therefore, the purposes of this study were:

- i) To compare the trapping efficiency/ attractiveness towards *S. calcitrans* of several types of blue screen designs, differing by small reflectance levels around 460 nm
- ii) To study potential biases in the trapping efficiency (height of screens, east or west exposed sites of a blue screen, proximity of different hosts and manure sites...)
- iii) To study the specificity of attractiveness of the different blue screens tested

Materials and methods

Study sites

The study was conducted in the campus of the National Veterinary School of Toulouse (NVST), southwestern France (43.36° North and 1.43° East, 189 m a.s.l.). One quarter of the NVST property (a total of 53 hectares) is composed of pasturelands, which are equally divided into horse and cattle/sheep paddocks. Four locations were chosen to represent different types of environment in the NVST campus. The locations used in this study were selected due to the high stable fly activity observed each year (Jacquiet et al., 2014). They were located close to: horse manure (site 1), two different horse paddocks (sites 2 and 3) and a cattle/sheep paddock (site 4) (Figure 1). Traps were placed along the perimeters (and not inside the paddocks), 50 m apart to ensure that the attractive qualities of one trap are not influenced by those of another trap at this distance. Horses, sheep and cattle were the main animals present in and near the area of study.

The climate of Toulouse city/area is temperate with a mix of oceanic, continental and Mediterranean influences. In this area, the year can be divided into four seasons: winter from January to March, spring from April to June, summer from July to September and fall from October to December. Maximum, minimum temperatures and durations of sunshine (number of sunshine per day) recorded in Toulouse-Blagnac Airport (located at 2 km far from the NVST campus) during the summer 2016 are presented in Figures 2A and 2B.

Blue screens

Seven types of blue screens (0.6 m x 0.6 m of size) fixed on metal frames (figure 3) were compared and named as following: plastic blue screens (Klm1, Klm 2, Klm 3, Klm4, Sample 1, Sample 2) and one fabric blue screen (Burma), the latter was used as “reference” in two

different experiments. The plastic blue screens, obtained from A to Z company, showed slight differences in their reflectance which was around 460 nm. These devices are under a patent in progress. The fabric for the Burma screen was obtained from Thailand. Both sides of each blue screen were covered by a sticky transparent film (Luminos 4 adhesive Rolls, ref FE217, Rentokill Initial Supplies, Liverpool, UK) in order to retain all attracted insects landing on the screens. For each trapping day, blue screens were installed in the morning (8:30 am) and removed in the afternoon (16:30 pm) making a eight hour-trapping session, as the activity of *Stomoxys calcitrans* is known to be diurnal in southwestern France (Jacquet et al., 2014). Blue screens were installed to provide an “east” side and a “west” side for each screen. At each collection date, all flies captured on the sticky films were divided into three categories (stable flies, Tabanids and pollinating insects) and counted trap by trap. The numbers of flies caught on the lower half and on the upper half of a blue screen were recorded. In addition, as both sides of a blue screen were used for trapping insects, the number of stable flies caught on the west side and on the east side of the blue screen were recorded. Male/female ratios were not evaluated.

Experimental design

The study was run for six weeks from July 26th to September 5th 2016. Two different experiments were conducted: experiment one (12 days of trapping during three weeks from July 26th to August 12th) with the comparison of Klm2, Klm3, Klm4 and Burma blue screens and experiment two (12 days of trapping during three weeks from August 16th to September 5th) with the comparison of Klm1, Sample 1, Sample 2 and Burma blue screens. Burma blue screen was used all around the study in order to compare the number of stable flies caught in the two experiments.

Each trapping week included four days of trapping. The catches of each blue screen were compared using a 4 x 4 Latin square design (four types of trap at four locations over 4 days).

This was repeated three times (multiple Latin squares with a total of 12 trapping days) in each experiment. Details of trap locations per week are showed in additional data.

Statistical analyses

Data were analyzed using Shapiro-Wilk test to verify the normality. Following a normal distribution, a variance analysis and multiple comparison tests of the means were performed (RStudio version 3.3.3; packages “agricolae” and “pgirmess”). Comparisons between the distribution numbers of *S. calcitrans* (up / down and west / east modalities) on the blue screen were performed using Student's t-test. All p-values were considered significant at ≤ 0.05 . If the normality distribution was not verified, the difference or similarity of the stable fly numbers was checked by using a Kruskal-Wallis test.

Results

In experiment 1, a total of 125,404 stable flies were caught (July 26th to August 12th). No significant difference of attractiveness on stable flies was recorded between the four different types of traps: Klm2, Klm3, Klm4 and Burma blue screens caught 30476 (24.3%), 34107 (27.2%), 30298 (24.2%) and 30523 (24.3%) flies respectively. This homogeneity of stable flies captures between the different types of blue screens was observed during the three weeks of trapping whatever the total number of flies caught per week (Figure 4).

In the experiment 2 (August 16th to September 5th), a total of 39,288 stable flies were caught during the 12 days of trapping which represents about 31% of the total number of *S. calcitrans* caught during the first experiment. As in experiment 1, no significant differences of attractiveness on stable flies were observed between the four different types of traps tested (Klm1, Sample 1, Sample 2 and Burma blue screens) (Figure 5).

Significantly higher numbers of stable flies were captured on the lower half of the screens compared to the higher half whatever the experiment, the type of blue screen and the repetition (Tables 1A and 1B).

The east side of the blue screens captured about 60% of the total number of stable flies in the experiment 1 and about 56% of the total number of stable flies in experiment 2. This was observed whatever the type of blue screen and the repetition (Tables 2A and 2B). However, the difference between both sides (east versus west) was not significant.

Regarding the influence of screen's location, the site 3 (horse paddock 2) showed a significantly higher number of *S. calcitrans* captures in both experiments compared to the three other sites (figure 6A and 6B).

Pollinating insects and horse flies were caught in very low numbers during the two experiments: 32 and 20 individuals respectively for experiment 1 and 74 and 8 individuals respectively for experiment 2, whatever the type of blue screen or the repetition (Tables 3A and 3B). These two categories of insects represented 0.041% and 0.2% of the total number of captures during the experiments 1 and 2 respectively. It should be noted that the total number of pollinating insects caught in the experiment 2 was 2.3 times higher than in the experiment 1 and that the Tabanids captures decreased from 32 individuals in experiment 1 to 8 individuals in experiment 2. Most of these Tabanids belonged to the *Haematopota* genus and a few to the *Tabanus* according to Chlava et al. (1972).

Discussion

This study aimed to evaluate the efficacy of different types of blue screens in order to provide an effective method to control stable flies as a part of integrated management programme.

Visual stimuli are of highly importance in the host's detection by hematophagous flies (Allan et al., 1987). Electroretinographic recordings of stable flies showed strong peaks of visual activities occurring at 330 - 360 nm, 460 - 525 nm and 605 - 635 nm (Agee and Paterson, 1983; Zhu et al., 2016). In this laboratory study, young stable flies were more responsive to white, whereas gravid females preferred blue. In the present study, the reflectance of the tested blue screens varied slightly around 460 nm. The results showed high efficacies of trapping with high number of stable flies captured during a trapping session of eight hours only (8.30 am to 4.30 pm). The total number of stable flies ranged from 141 to 7301 individuals per trap and per day. These levels of capture are substantially higher than those reported by Taylor and Berkebile (2006) in their comparison between five adhesive traps and the Nzi trap, and Gilles et al. (2007) who compared two Alsynite sticky traps and two phtalogen blue fabric traps (Vavoua and Nzi). For comparisons to be possible, the number of caught flies per cm² should be evaluated for each device. The double sides of the blue screens (60 x 60 cm) were covered with sticky films giving a trapping area of 7,200 cm². The maximum number of caught stable flies per trap was 7301 individuals with KLM3 blue screen; this corresponded to 1.01 stable flies per cm². In comparison, the maximum number of stable flies per cm² was 0.066 flies in the study of Gilles et al. (2007) with an Alsynite trap. In the same vein, Jacquiet et al. (2014) observed a maximum of 120 stable flies per Vavoua trap and per day during the summer months in the NVST campus. This latest difference of captures observed in the same environment could be due to highly favorable conditions for stable flies' activities during summer 2016 and/or to a very high attractiveness of the blue screens devices tested in this study. Another important difference resides in the fact that stable flies could land on fabric traps (such as Vavoua traps) without entering in it, leading to an underestimation of the total number of attracted flies (Solórzano et al., 2015). Beresford and Sutcliffe (2017) reported that live stable flies caught in sticky traps could inhibit subsequently stable flies from being captured. Regarding the number of stable

flies caught and the density of these flies on the small surface of our blue screens, this phenomenon probably did not occur in the conditions of the NVST campus and with the tested blue screens.

Several studies have been conducted to understand the relationships between the height of the traps and the efficacy of catching of stable flies. Beresford and Sutcliffe (2006) found that the 30-60 cm is the optimum height of the sticky traps in the field with taking into account the height of grass. Black (1985) demonstrated that stable flies preferred lower perching sites either when they are flying near the host searching the blood meal or when they are resting. Showler and Osbrink (2015) confirmed that in the field stable flies can fly about 90 cm above the ground in their local movements near the host. Our results showed also that the most attractive part of the blue screen was the lowest part (between 30- 60 cm above the ground). Differentiation of sex (male and female) of *S. calcitrans* that have been captured by blue screens was not performed in this study, because of the high number of stable flies caught - the trap was readily overloaded of flies and they were very contending and adhering on the sticky film (making them difficult to sample for an observation under binocular microscope). However, in a complementary study in 2017, we observed that the sex ratio was almost 1 to 1 (47% of males and 53% of females on 150 stable flies examined) in the same conditions of sampling.

The east and the west exposed sides of the blue screen caught slightly different numbers of stable flies without significant difference. The east side caught a little bit more than the west side and this was observed whatever the type of blue screen and the repetition. This might suggest once again that activity of stable flies was more important in the morning (when the east side of the blue screen is in front of the sun) than in the afternoon during the period of both experiments. Referring to our results, the specificity of attractiveness was very high by showing very low numbers of pollinators captured by the different types of blue screens. As sticky traps are expendable not recyclable products and they cannot be re-used, it is quite difficult to

imagine the systematic association between blue screens and sticky films in a sustainable and cost-effective control program of stable flies. Therefore, the impregnation of the blue screen with an insecticide in a combination of “specific attraction” and “contact mortality” could be an alternative solution to the topical application of such insecticides on cattle. Nevertheless, the landing time of stable flies on the blue screens and the mortality rates following short contacts between the screens and the flies should be carefully checked.

Conclusions

The most striking result of this study was the high numbers of *S. calcitrans* caught during both experiments whatever the type of blue screens or the repetition. Most of time, more than one thousands of stable flies were caught by one blue screen in 8 hours only.

The second important finding of this study was that the different devices tested in both experiment showed more or less the same attractiveness for stable flies in the NVST campus. Moreover, the results obtained in this study showed clearly that the majority of stable flies are landing on the lower half of the blue screen, *i.e.* between 30 and 60 cm height from the soil.

References

- Agee H.R. & Patterson R.S. (1983) Spectral sensitivity of stable, face, and horn flies and behavioral responses of stable flies to visual traps (Diptera: Muscidae). *Environmental Entomology* 12: 1823-1827
- Allan S.A., Day J.F. & Edman J.D. (1987) Visual ecology of biting flies. *Annual Review of Entomology* 32: 297–316.
- Baldacchino F., Muenwom V., Desquesnes M., Desoli F., Charoenviriyaphap T., Duvallet G. (2013). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, 20, 26.
- Beresford D.V. & Sutcliffe J.F. (2006) Stable fly (*Stomoxys calcitrans*: Diptera, Muscidae) trap response to changes in effective trap height causing by growing vegetation. *Journal of Vector Ecology* 33: 40-45.
- Black W.C. & Krafusur E.S. (1985). Use of sticky traps to investigate seasonal trends in the spatial distribution of House Flies and Stable Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 22: 250-257
- Campbell J.B., Skoda S.R., Berkerile D.R., Boxler D.J., Thomas G.D., Adams D.C., Davis R. (2001). Effects of stable flies (Diptera: Oestridae) on weight gains of grazing yearling cattle. *Journal of Economic Entomology*, 94: 780-783.
- Challier A. (1984). Perspectives d'utilisation des systèmes attractifs toxiques dans la lutte contre les glossines (Diptera, Glossinidae). *Revue d'Elevage et de Médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 37: 31-59.
- Chlava M., Lyneborg L., Moucha J. (1972) The Horse Flies of Europe. Entomological Society of Copenhagen, Copenhagen.

Dougherty C.T., Knapp F.W., Burrus P.B., Willis D.C. & Cornelius P.L. (1995) Behaviour of grazing cattle exposed to small population of stable flies (*Stomoxys calcitrans* L.). *Applied Animal Behaviour Science* 42: 231-248.

Gilles J. (2005). Dynamique et génétique des populations d'insectes vecteurs. Les stomoxes, *Stomoxys calcitrans* et *Stomoxys niger niger* dans les élevages bovins réunionnais. Thèse de l'Université de la Réunion, 135pp

Gilles J, David J.F., Duvallet G., De La Rocque S. & Tillard E. (2007) Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 65-69

Hogsette J.A., Ruff J.P. & Jones C.J. (1987) Stable fly biology and control in northwest Florida. *Journal of Agricultural Entomology* 4: 1-11.

Jacquet P., Rouet D., Bouhsira E., Salem A., Liénard E. & Franc M., 2014. Population dynamics of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) in southwestern France. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2014, 165 (9-10): 267-271

Lehane M., Alfaroukh I., Bucheton B., Camara M., Harris A., Kaba D., Lumbala C., Peka M., Rayaisse JB., Waiswa C., Solano P. & Torr S. (2016). Tsetse control and the elimination of Gambian Sleeping Sickness. *Plos Neglected Tropical Diseases*. DOI:10.1371/journal.pntd.0004437

Masmethip R., Gilles J., Ketavan C. & Duvallet G. (2006). First survey of seasonal abundance and daily activity of *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae) in Kamphaengsaen Campus, Nakornpathorn Province, Thailand. *Parasite* 13: 245-250.

Mihok S. (2002). The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Entomological Research*, 92: 385-403

Miller R.W., Pickens I.G., Morgan N.O., Thimijan R.W. & Wilson RL, 1973. Effects of stable flies on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Economic Entomology*, 66: 711-713.

Mullens B.A. & Meyer J.A. (1987). Seasonal abundance of stable flies (Diptera: Muscidae) on California dairies. *Journal of Economic Entomology*, 80 (5):1039-1043.

Olafson P.U., Pitzer J.B. & Kaufman P.E. (2011) Identification of a mutation associated with permethrin resistance in the para-type sodium channel of the stable fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 104: 250-257.

Pitzer J.B., Kaufman P.E. & Tenbroeck S.H. (2010) Assessing permethrin resistance in the stable fly (Diptera: Muscidae) in Florida by using laboratory selections and field evaluations. *Journal of Medical Entomology*, 103: 2258-2263.

Salem A., Franc M., Jacquet P., Bouhsira E. & Liénard E. (2012a). Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans*(Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. *Parasite*, 19: 309–317.

Salem A., Bouhsira E., Liénard E., Bousquet Melou A., Jacquet P. & Franc M. (2012b) Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, λ -cyhalothrin, Permethrin and Phoxim. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10: 249-257

Schoenefeld A. (1983). Essai de lutte contre *Glossina morsitans morsitans* par utilisation d'écrans imprégnés de deltaméthrine. *Revue d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux*, 36(1) : 33-43.

Showler A.T. & Osbrink W.L.A. (2015). Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (L.), dispersal and governing factors. *International Journal of Insect Science*, 7: 19-25. doi: 10.4137/IJIS.S21647

Solórzano J.A., Gilles J., Bravo O., Vargas C., Gomez-Bonilla Y., Bingham G.V. & Taylor D.B. (2015). Biology and Trapping of Stable Flies (Diptera: Muscidae) Developing in Pineapple Residues (*Ananas comosus*) in Costa Rica. *Journal of Insect Science*, 15:1-5

Taylor D.B., Moon R.D. & Mark D.R. (2012). Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy and beef cattle production. *Journal of Medical Entomology*, 49: 198-209.

Taylor D.B. & Berkebile D. (2006). Comparative efficiency of six stable fly (Diptera: Muscidae) traps. *Journal of Economic Entomology*, 99: 1415-1419

Wieman G.A., Campbell J.B., Deshazer J.A. & Berry I.L. (1992). Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) and heat stress on weight gain and feed efficiency of feeder cattle. *Journal of Economic Entomology*, 85: 1835-1842.

Zhu J.J., Zhang Q.H., Taylor D.B. & Friesen K.A. (2016). Visual and olfactory enhancement of stable fly trapping. *Pest Management Science*, 72: 1765-1771.

Table 1A: Proportions of *Stomoxys calcitrans* caught on the higher half of a blue screen compared to the total number of flies caught by this type of trap (experiment 1).

Type of blue screen / Latin square	Klm2	Klm3	Klm4	Burma
Latin square 1	0.26	0.31	0.27	0.26
Latin square 2	0.27	0.29	0.27	0.3
Latin square 3	0.25	0.25	0.25	0.29
Mean	0.26	0.28	0.26	0.28

Table 1B: Proportions of *Stomoxys calcitrans* caught on the higher half of a blue screen compared to the total number of flies caught by this type of trap (experiment 2).

Type of blue screen / Latin square	Klm1	Sample 1	Sample 2	Burma
Latin square 1	0.245	0.217	0.201	0.215
Latin square 2	0.202	0.209	0.179	0.203
Latin square 3	0.282	0.244	0.242	0.230
Mean	0.243	0.224	0.208	0.216

Table 2A: Total numbers of *Stomoxys calcitrans* caught during three sessions of 4 days of trapping according to the east/west sides of the blue screens (experiment 1). In red: percentages of *S. calcitrans* caught in the east side of a blue screen / total number of stable flies caught on both sides during the entire experiment (total of 12 days of trapping).

Type of blue screen / Latin square	Klm2		Klm3		Klm4		Burma		Total	
	East	West	East	West	East	West	East	West	East	West
Latin square 1	5294	3922	5762	4520	4927	3515	4715	3182	20698	15139
Latin square 2	8154	6136	10129	6834	9190	6300	9189	6322	36662	25592
Latin square 3	4571	2399	4157	2705	4176	2190	4140	2975	17044	10269
Total	17019 (59%)	12457	20048 (59%)	14059	18293 (60%)	12005	18044 (59%)	12479	74404 (59.3%)	51000

Table 2B: Total numbers of *Stomoxys calcitrans* caught during three sessions of 4 days of trapping according to the east/west sides of the blue screens (experiment 2). In red: percentages of *S. calcitrans* caught in the east side of a blue screen / total number of stable flies caught on both sides during the entire experiment (total of 12 days of trapping).

Type of blue screen / Latin square	Klm1		Sample 1		Sample 2		Burma		Total	
	East	West	East	West	East	West	East	West	East	West
Latin square 1	2622	1638	1756	1396	3160	2460	1963	2060	9501	7554
Latin square 2	1190	1128	1170	676	966	731	1448	1048	4774	3583
Latin square 3	2031	1032	1480	1878	2054	1221	2048	2132	7613	6263
Total	5843 (60.6%)	3798	4406 (52.7%)	3950	6180 (58.3%)	4412	5459 (51%)	5240	21888 (55.7%)	17400

Table 3A: Total numbers of pollinating insects (including bees and syrphids) and horse flies caught during three sessions of 4 days of trapping (experiment 1).

Type of blue screen Latin square	Klm2		Klm3		Klm4		Burma		Total	
	Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids	
Latin square 1	10	0	1	0	1	0	1	0	13	0
Latin square 2	3	7	3	2	1	2	0	2	7	13
Latin square 3	5	3	3	2	3	1	1	1	12	7
Total	18	10	7	4	5	3	2	3	32	20

Table 3B: Total numbers of pollinating insects (including bees and syrphids) and horse flies caught during three sessions of 4 days of trapping (experiment 2).

Type of blue screen Latin square	Klm1		Sample 1		Sample 2		Burma		Total	
	Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids		Pollinators / Tabanids	
Latin square 1	12	0	5	2	8	1	7	2	32	5
Latin square 2	6	1	5	1	6	1	4	0	21	3
Latin square 3	5	0	5	0	7	0	4	0	21	0
Total	23	1	15	3	21	2	15	2	74	8

Captions of figures:

Figure 1: zone of study and traps locations: site 1: Horse manure site, site 2: Horse paddock 1, site 3: Horse paddock 2, site 4: Sheep paddock (Google map modified)

Figure 2A: Temperatures during the experiments 1 and 2 .The study took place between July 26th and September 5th.

Figure 2B: Percentages of relative humidity and number of hours of sunshine per day.The study took place between July 26th and September 5th. The total annual rainfall in the study area was 577 mm in 2016 and the monthly rainfalls were 71.4, 24.7 and 15.4 mm for July, August and September respectively.

Figure 3: Metal frame and blue screen; the picture was taken at 16: 30 pm i.e. 8 hours after the blue screen installation. In the backside: horse and manure.

Figure 4: Proportions of stable flies captured by different blue screens during the experiment 1 (July 26th to August 12th). The total numbers of stable flies caught per trap were: 30,476 (KLM2); 34,107 (KLM3); 30,298 (KLM4) and 30,523 (Burma).

Figure 5: Proportion of stable flies captured by different blue screens during the experiment 2 (16 August to 5 September). The total numbers of stable flies caught per trap were: 9,641 (KLM1); 8,356 (Sample 1); 10,592 (Sample 2) and 10,699 (Burma).

Figure 6: Proportion of stable flies captured by location in experiment 1 (6A) and in experiment 2 (6B).

Figure 1



Figures 2A and 2B

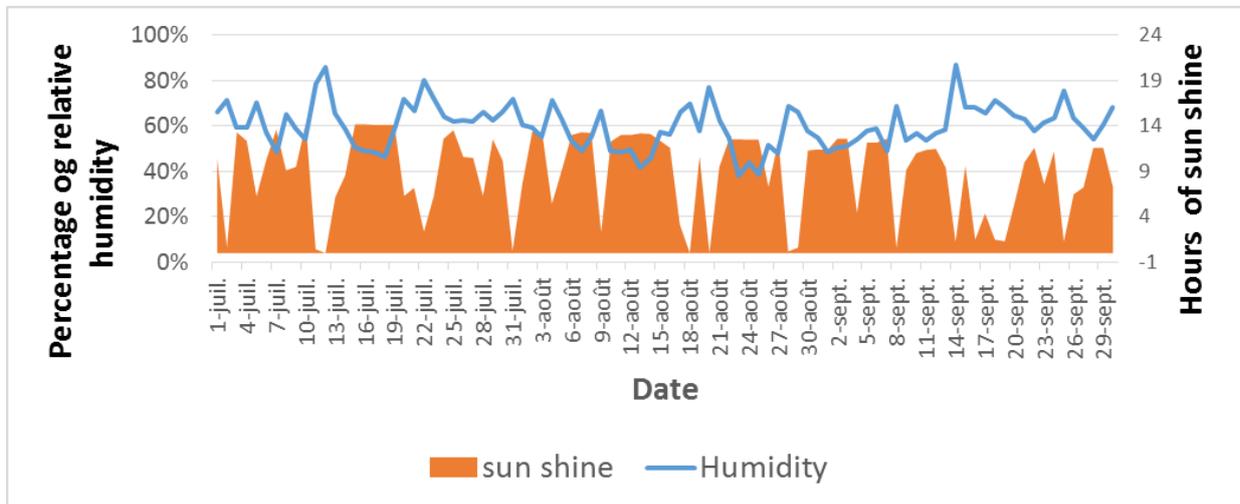
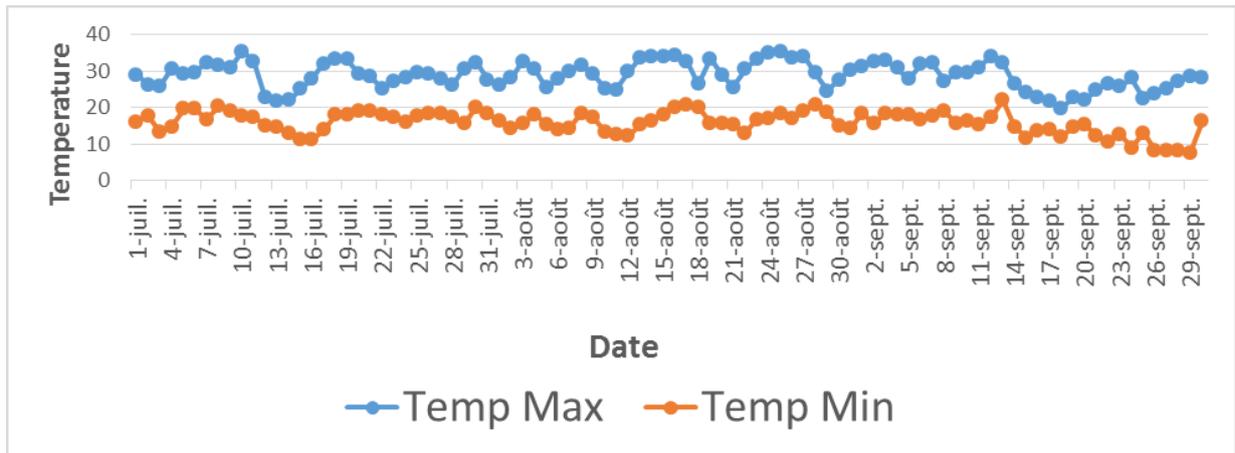


Figure 3



Figure 4

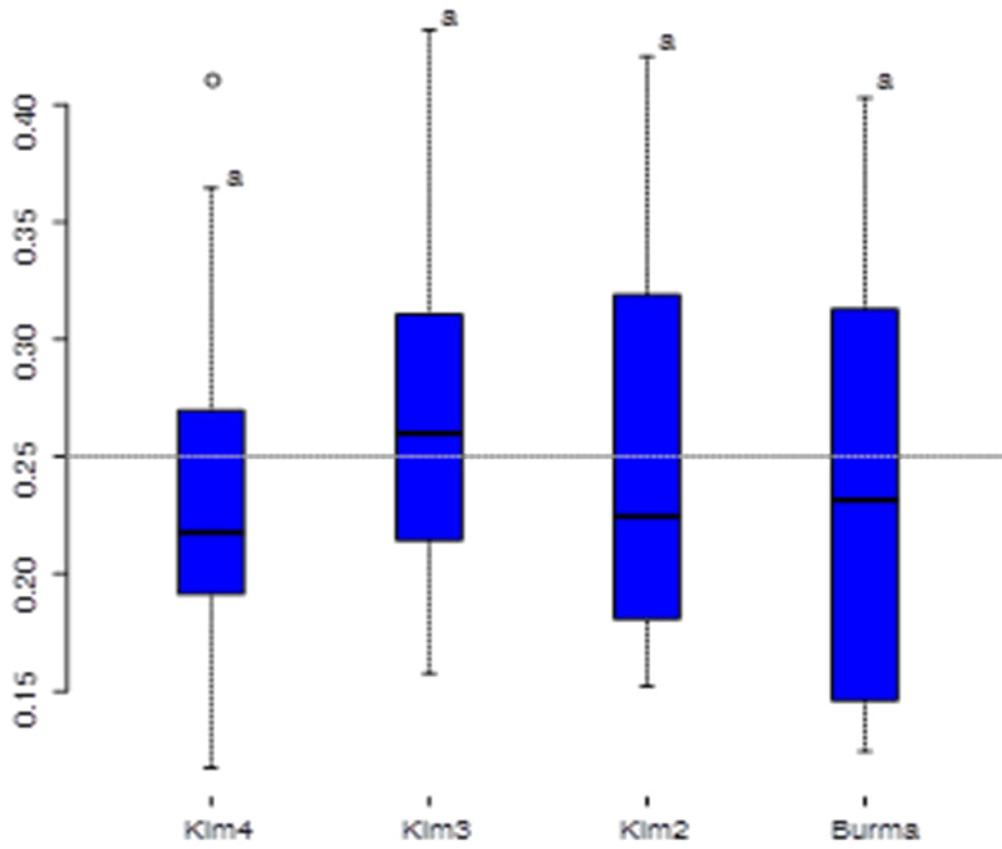
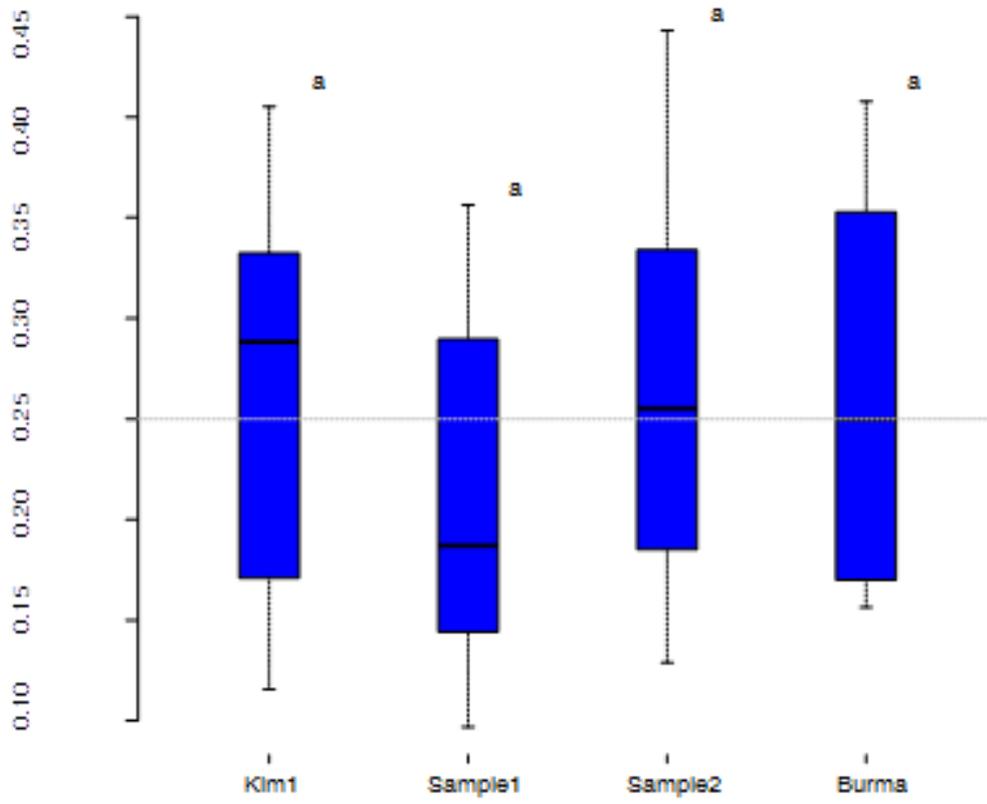
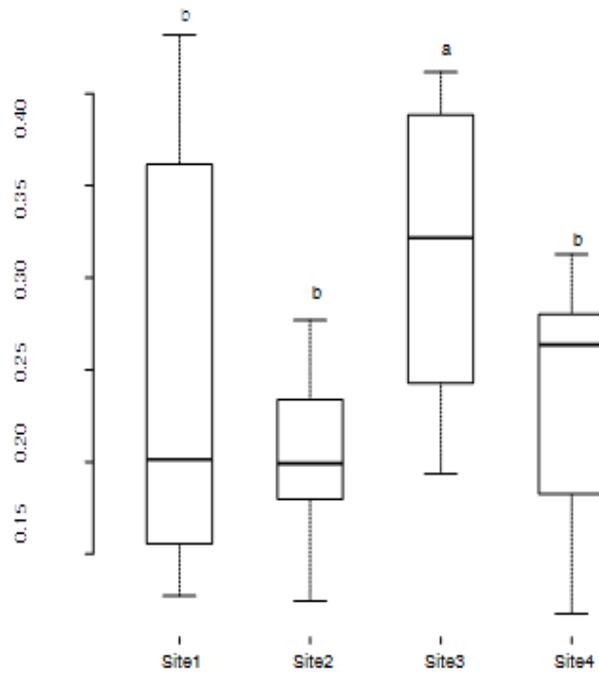


Figure 5

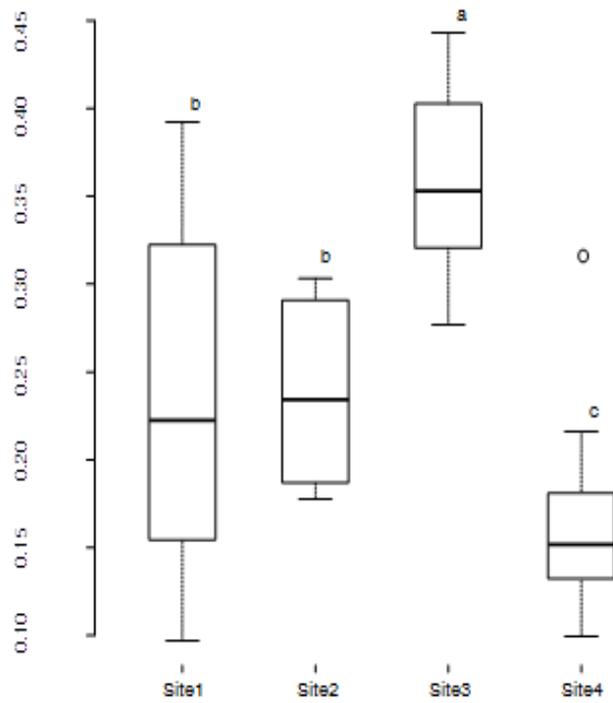


Figures 6A and 6B

6A



6B



Additional data

Table I: Total numbers of *Stomoxys calcitrans* caught during three sessions of 4 days of trapping according to the type of blue screen (experiment 1). In red: percentages of *S. calcitrans* caught by one type of blue screen / total number of stable flies caught during a trapping session of 4 days and during the entire experiment (total of 12 days of trapping).

Type of blue screen / Latin square	Klm 2	Klm 3	Klm 4	Burma	Total
Latin square 1	9 216 (25.7%)	10 282 (28.7%)	8 442 (23.6%)	7 897 (22%)	35 837
Latin square 2	14 290 (22.9%)	16 963 (27.3%)	15 490 (24.9%)	15 511 (24.9%)	62 254
Latin square 3	6 970 (25.5%)	6 862 (25.1%)	6 366 (23.3%)	7 115 (26%)	27 313
Total (12 days of trapping)	30 476 (24.3%)	34 107 (27.2%)	30 298 (24.2%)	30 526 (24.3%)	125 404

Table 2: Total numbers of *Stomoxys calcitrans* caught during three sessions of 4 days of trapping according to the type of blue screen (experiment 2). In red: percentages of *S. calcitrans* caught by one type of blue screen / total number of stable flies caught during a trapping session of 4 days and during the entire experiment (total of 12 days of trapping).

Type of blue screen / Latin square	Klm 1	Sample 1	Sample 2	Burma	Total
Latin square 1	4260 (25%)	3152 (18.5%)	5620 (32.9%)	4023 (23.6%)	17055
Latin square 2	2318 (27.7%)	1846 (22%)	1697 (20.3%)	2496 (30%)	8357
Latin square 3	3063 (22.1%)	3358 (24.2%)	3275 (23.6%)	4180 (30.1%)	13876
Total (12 days of trapping)	9641 (24.5%)	8356 (21.3%)	10592 (27%)	10699 (27.2%)	39288

3-2-Observations complémentaires

Dans l'étude précédente, les écrans bleus de tissu ou de plastique se sont montrés très attractifs pour les stomoxes et relativement spécifiques puisque très peu d'insectes pollinisateurs ont été capturés par les différents dispositifs testés. Pour autant, l'utilisation des films collants (Rentokill ®) qui entourent les écrans bleus ne permettent pas d'étudier l'interaction entre les stomoxes et l'écran car tout insecte se posant sur le film collant est immédiatement retenu. Il n'est donc pas possible de savoir s'il s'y serait posé une seconde ou plusieurs minutes. Par ailleurs, l'utilisation du film collant Rentokill ® s'est avérée pertinente pour suivre une dynamique saisonnière des populations de stomoxes ou pour comparer l'attractivité de différents écrans mais il n'est pas envisageable de l'utiliser dans un programme de lutte à l'échelle d'une exploitation pour des raisons pratiques (le temps nécessaire pour changer le film régulièrement voire tous les jours aux pics d'activité des stomoxes est bien trop long pour inciter les éleveurs à utiliser cette méthode de lutte) et de coût. La solution envisagée consiste à imprégner un écran bleu avec un insecticide et de recourir au principe « attract and kill ».

La société A to Z nous a fourni en juillet 2017 des écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine selon un procédé industriel qui reste confidentiel. La concentration en deltaméthrine sur les couches externes des écrans est de 4% w/w ce qui, aux dires du fabricant, doit être suffisant pour exercer une activité insecticide après un contact tarsal des stomoxes.

Deux questions ont été abordées dans la suite de ce travail :

- quel est le comportement des stomoxes sur des écrans bleus imprégnés de deltaméthrine ? S'y posent-ils et si oui, combien de temps ?
- quelle est l'efficacité adulticide d'un temps de pose de trois secondes sur l'écran bleu imprégné de deltaméthrine et ce, pour plusieurs populations différentes de stomoxes ?

Les résultats, encore préliminaires, font l'objet des deux paragraphes suivants.

3-2-1-Interactions stomoxes et écrans bleus imprégnés par la deltaméthrine

Deux écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine, fournis par la société A to Z, ont été installés sur le campus de l'ENVT le 22 août 2017. Les observations de temps de pose des stomoxes ont été réalisées après la pose des écrans, sur 5 journées (29 et 30 août et 1^{er}, 2 et 26 septembre 2017). Elles ont été réalisées en matinée (entre 8h30 et 10h30, les 29 et 30 août ainsi que les 1^{ers} et 26 septembre) et en fin d'après-midi (17h à 18h30 le 29 août et les 1^{er}, 2 et 26 septembre) par la même personne. Dans un premier temps, l'observateur s'approche de l'écran pour en chasser toutes les mouches posées, puis il se retire à une distance de deux ou trois mètres qui n'interfère plus avec le comportement normal des stomoxes. Le temps de pose du premier stomoxe qui se pose est évalué avec un chronomètre. Puis l'observateur s'avance à nouveau vers l'écran chassant toutes les mouches présentes avant de se retirer à nouveau pour laisser les stomoxes s'approcher et se poser. Cette opération est répétée ainsi 30 fois par matinée ou fin d'après-midi.

247 temps de pose de stomoxes ont été évalués (125 en matinée et 122 en fin d'après-midi) (**Tableau 7**). Ces temps de pose sont très variables puisqu'ils varient d'une seconde à peine à 387 secondes. Sur l'ensemble de la période d'étude, le temps moyen de pose des stomoxes est de 52 secondes environ pour un écart-type de 73 secondes et une médiane de 21 secondes. Les temps de pose sont significativement plus importants en matinée qu'en fin d'après-midi (56,6 secondes contre 46,7 secondes, $p < 0,05$). La répartition des stomoxes (total des observations et totaux en matinée et en fin d'après-midi) selon leur temps de pose sur l'écran bleu KLM3 imprégné de deltaméthrine est présentée dans la figure 30. On notera que 15,4% des stomoxes se sont posés 3 secondes ou moins et une très grande majorité d'entre eux (73%) moins d'une minute.

Figure 30: répartition des stomoxes selon leur temps de pose sur l'écran bleu KLM3 imprégné de deltaméthrine (total des observations, N = 247 ; observations en matinée, N = 125 ; observations en fin d'après-midi, N = 122).

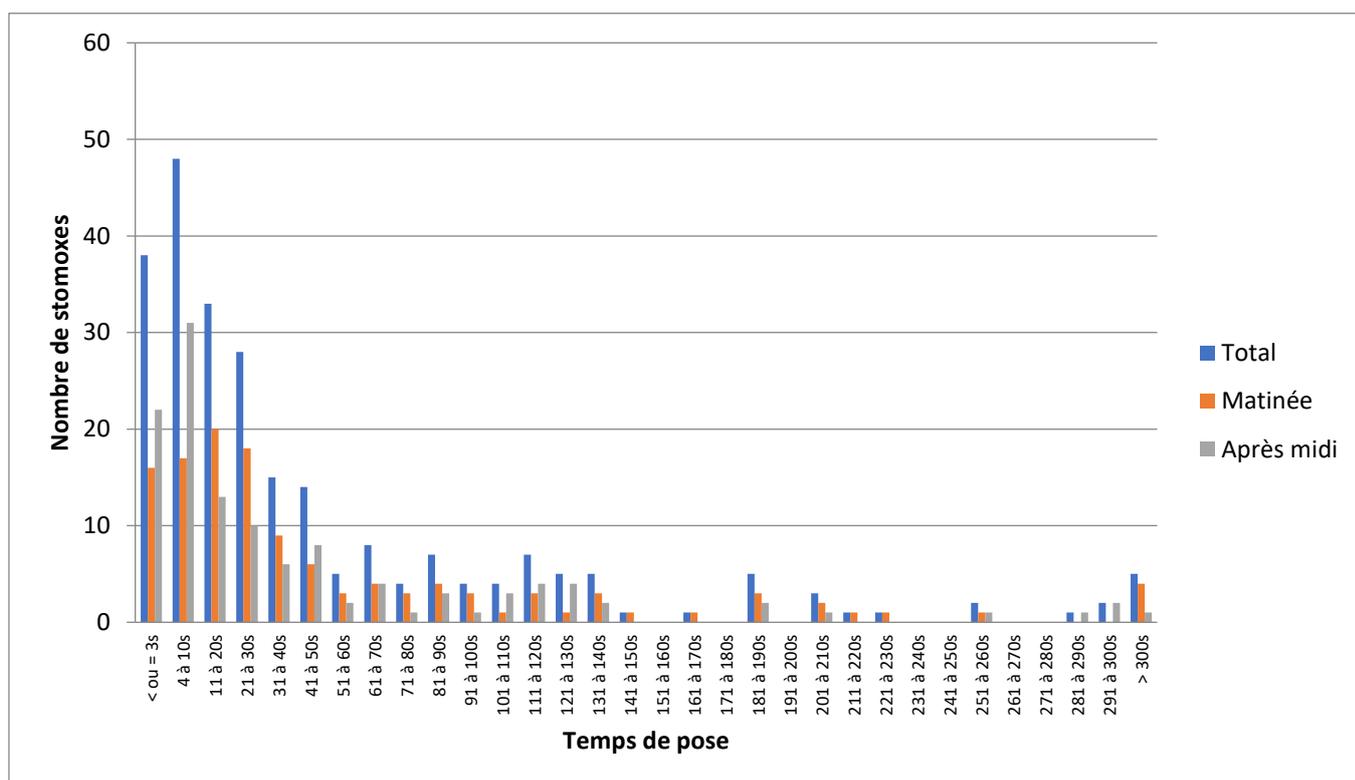


Tableau 7: estimations des temps de pose des stomoxes sur les écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine.

Date	Matinée / après- midi	Nombre de stomoxes observés	Temps de pose (en secondes)				
			Moyenne	Ecart- type	Médiane	Minimum	Maximum
29 août	Matinée	34	52,8	67,9	28	3	305
	Après midi	32	30,5	37	12	1	118
30 août	Matinée	31	35,2	51,6	16	2	230
01 septembre	Matinée	30	56	82,5	23	1	375
	Après midi	30	84	106,9	34	2	387
02 septembre	Après midi	30	48,2	63,5	30	1	260
26 septembre	Matinée	30	83,8	91,1	46,5	2	341
	Après midi	30	25,2	37,6	7,5	1	134
Total matinées		125	56,6	75,5	24	1	375
Total après midi		122	46,7	70,2	14,5	1	387
Total général		247	51,7	73	21	1	387

3-2-2-Activité insecticide des écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine

Les résultats précédents indiquent qu'environ 85% des stomoxes observés ont des temps de pose supérieurs à 3 secondes sur les écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine. Afin de mesurer l'effet insecticide de ces écrans pour des temps de pose de très courte durée, une technique d'anesthésie des mouches par le dioxyde de carbone a permis de réaliser des contacts précis de trois secondes entre les tarse des stomoxes et la surface de l'écran KLM3 imprégné.

❖ Populations de stomoxes étudiées

Deux populations de *S. calcitrans* originaires du sud-ouest de la France, distantes de plus de 80 km, ont été utilisées dans ce test préliminaire. La première est la population du campus de l'ENVT dont on sait qu'elle présente une résistance partielle à la deltaméthrine (**Salem et al, 2012**), la seconde est située en Ariège sur le piémont pyrénéen à proximité de la ville de Pamiers dont on ne connaît pas le statut de résistance ou de sensibilité à la deltaméthrine (**Figure 31**). Deux séries de captures de stomoxes adultes, mâles ou femelles, ont été réalisées dans chaque site (série 1 et série 2) à quelques jours d'intervalle en septembre 2017 à l'aide d'aspirateurs à bouche. Immédiatement après leur capture, les stomoxes ont été placées dans des cages cubiques Bug Dorm-1 (30 cm de côté) avec de l'eau et du miel *ad libitum* jusqu'au lendemain. Les stomoxes capturés ont été amenés dans les locaux du laboratoire de parasitologie de l'ENV Toulouse où la suite des manipulations a été réalisée.

❖ Anesthésie des mouches au dioxyde de carbone

Le lendemain de leur capture, ces mouches, par lots de 10, ont été anesthésiées au dioxyde de carbone (pression de 1 bar ou 100 kPa) pendant 20 secondes dans une chambre d'anesthésie de confection « maison » (**Figure 32**) connectée avec une bouteille de CO₂ (LindeHiQ, Linde

Gase s.a, France). Quelques secondes après l'arrivée du gaz, les stomoxes tombent « inertes » au fond de la chambre d'anesthésie.

❖ **Test du contact tarsal**

Des carrés de 15 cm de côté ont été découpés dans des écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine puis conservés dans du papier aluminium à +4°C jusqu'à utilisation avec les lots traités. Des carrés de papier filtre (Whatman no. 5), de même dimension, ont été utilisés pour les lots contrôles. Des groupes de 10 stomoxes ont été anesthésiés comme décrit précédemment puis les tarsi de chaque mouche ont été mis en contact pendant trois secondes soit avec l'écran bleu imprégné (lots traités) soit avec le papier filtre (lots contrôles), les mouches étant tenues par les ailes à l'aide d'une pince souple (**Figure 32**). Immédiatement après le contact tarsal, les mouches sont placées dans des cages de réveil par groupes de 10 pendant 24h pour observation. Trois ou quatre répliques de 10 mouches ont été effectués dans chaque série.

❖ **Paramètres mesurés**

L'effet de l'anesthésie au CO₂ étant très court, le taux de réveil a été évalué 5 minutes après la réalisation du contact tarsal. L'effet knock down (KD) a été mesuré 60 minutes après le contact tarsal, puis le taux de mortalité a été évalué au bout de 24 heures. Le degré de résistance des deux populations de stomoxes a été interprété selon les critères de l'OMS (**WHO, 2016**) : pour une mortalité à 24 heures comprise entre 98% et 100%, la population testée est considérée comme « sensible » ; pour une mortalité comprise entre 90% et 97% il y a une suspicion de résistance et d'autres études plus approfondies sont nécessaires ; enfin, si la mortalité est inférieure à 90% la résistance est probable. Si au moins deux tests supplémentaires montrent systématiquement une mortalité inférieure à 98%, la résistance est confirmée.

❖ Résultats et discussion

Sur un total de 280 mouches anesthésiées au CO₂, 276 d'entre elles, soit 98,6%, se sont bien réveillées dans les 5 minutes qui ont suivi le test. Les effets KD à 60 minutes et les mortalités à 24h dans les lots contrôles sont très faibles (respectivement 1,4% et 8,6% dans la population ariégeoise et 0 et 1,4% dans la population du campus de l'ENVT) ce qui semble indiquer que l'anesthésie des mouches au CO₂ n'a pas ou très peu d'effet en soi au moins sur ces deux paramètres et que les résultats de KD et de mortalités à 24h dans les lots traités sont interprétables.

On constate des différences très importantes d'effet KD et de mortalités à 24h entre les deux populations de stomoxes testées. Les très faibles valeurs de KD et de mortalité à 24h dans la population du campus de l'ENVT ne sont pas surprenantes dans la mesure où une résistance à la deltaméthrine y est suspectée depuis 2012. En revanche, si l'effet KD dans la population ariégeoise est supérieur à 95%, la mortalité à 24h n'est plus que de 81,4%. (**Tableau 8**)

En l'absence de souche sensible de référence dans ce travail (présentant un taux de mortalité de 100% à la suite du contact tarsal), il est difficile de conclure à une résistance des stomoxes à la deltaméthrine dans ces deux populations même si on ne peut pas l'écarter. Toutefois, on peut affirmer que des temps de pose courts, de l'ordre de 3 secondes, sur les écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine ne permettent pas de tuer 100% des stomoxes qui s'y posent et que la proportion d'insectes tués à la suite du contact peut varier d'une population à une autre. Des études complémentaires sont nécessaires en utilisant des temps de contact plus longs pour ces deux populations et en testant également des populations, potentiellement sensibles, en provenance d'élevages en agriculture biologique.

Tableau 8: effet KD (% de mouches présentant un effet knock down) et le pourcentage de la mortalité à 24h post exposition à l'écran bleu ou au papier filtre dans les populations de stomoxes de l'ENVT et de Pamiers.

	Lot	Nombre de mouches anesthésiées	Nombre de mouches s'étant réveillé de l'anesthésie	Nombre de mouches présentant un effet KD à 60 min (%)	Nombre de mouches mortes à 24h (%)
Population de <i>S. calcitrans</i> de Pamiers (Ariège, piémont pyrénéen)					
Série 1	Contrôles	29	29	0	3 (10,34%)
	Traités	30	30	27 (90%)	23 (76,67%)
Série 2	Contrôles	41	41	1 (2,4%)	3 (7,3%)
	Traités	40	36	40 (100%)	34 (85%)
Total	Contrôles	70	70	1 (1,4%)	6 (8,6%)
	Traités	70	66	67 (95,7%)	57 (81,4%)
Population de <i>S. calcitrans</i> du campus de l'ENV Toulouse					
Série 1	Contrôles	33	33	0	0
	Traités	30	30	14 (46,67%)	4 (13,33%)
Série 2	Control	40	40	0	1 (2,5%)
	Traités	40	40	18 (45%)	5 (12,5%)
Total	Control	70	70	0	1 (1,4%)
	Traité	70	70	32 (45,7%)	9 (12,8%)



Figure 31: sites d'origine des deux populations de *Stomoxys calcitrans* étudiées

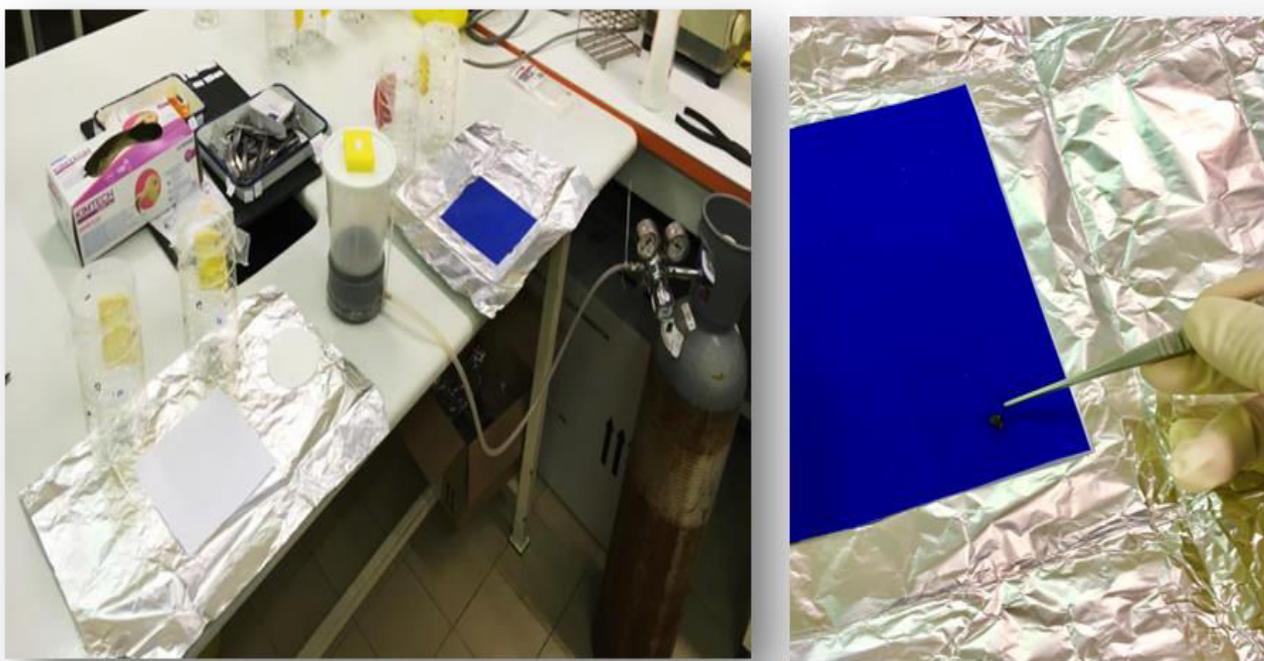


Figure 32: chambre d'anesthésie des stomoxes reliée à la bouteille de Co2 (à gauche), carrés de 15 cm de côté découpés dans les écrans bleus KLM3 imprégnés de deltaméthrine sur lequel est effectué le test du contact trasal de 3 secondes (à droite)

3-3- Conclusion générale du chapitre 3

Les écrans bleus de type KLM3, présentant une réflectance de 460 nm, ont démontré une grande attractivité pour les stomoxes dans le campus de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Les résultats présentés ont été obtenus en 2016, des observations complémentaires durant l'été et l'automne 2017 confirment largement les hauts niveaux de captures. En revanche, très peu d'insectes pollinisateurs ont été attirés par ces écrans dans le campus en 2016 comme en 2017. Il serait intéressant de confirmer cette grande spécificité d'attraction dans d'autres contextes, en particulier dans des zones à plus forte diversité spécifique entomologique (parcs naturels...).

Pour les études présentées ci-dessus, un film transparent et collant (Rentokill ®) a été utilisé. Pour des raisons pratiques (temps passé à la pose et au retrait réguliers des films collants autour

des écrans) et de coût, il n'est pas envisageable d'utiliser l'association écran bleu et film collant dans une lutte au quotidien dans les élevages. Aussi, l'imprégnation de l'écran bleu par un insecticide dans une combinaison « attraction spécifique » et « mortalité à la suite du contact » pourrait être une solution intéressante dans la lutte contre les stomoxes. Les premières observations de l'interaction entre les stomoxes et un prototype d'écran KLM3 imprégné de deltaméthrine ont montré que les temps de pose sont très variables d'un individu à l'autre et que 15% des stomoxes attirés ne passe pas plus de 3 secondes sur l'écran. Il faut donc un insecticide puissant, rapide d'action, en concentration suffisante pour exposer l'insecte sur une très courte période de temps à des doses létales et provoquer une mortalité de 100%. A l'aide d'une nouvelle technique d'anesthésie des stomoxes au CO₂, nous avons montré de grandes variations entre populations dans l'effet knock down (KD) et dans les mortalités à 24h post-exposition à l'écran. Dans les deux populations testées, le pourcentage de mortalité à 24h était bien inférieur à 100% ce qui laisse supposer que soit la concentration en deltaméthrine n'est pas suffisante à la surface de l'écran soit que les populations testées présentent une proportion non négligeable d'individus résistants.

Conclusion et discussion générale

Les principaux résultats des travaux entrepris dans cette thèse sont relatifs à la transmission expérimentale du parasite *Besnoitia besnoiti* par *Stomoxys calcitrans* d'une part et à l'évaluation de l'attractivité et de la sélectivité de nouveaux dispositifs de lutte contre cet insecte d'autre part.

La très courte persistance du parasite dans les pièces buccales ou le tube digestif du vecteur interdit toute possibilité de transmission biologique du parasite (**article 1**). Toutefois, nous avons démontré que, dans certaines conditions, la transmission de parasites virulents d'un animal infecté à un animal sain a bien lieu avec un nombre relativement restreint de repas interrompus de mouches dans un mécanisme de transmission mécanique (**article 2**). Dans un système hôte-parasite-vecteur (ici, le système bovin - *Besnoitia besnoiti* - stomoxe peut servir d'exemple), l'intensité de la transmission d'un hôte infecté à un hôte sain peut varier en fonction de nombreux paramètres liés aux caractéristiques physiologiques ou comportementales de l'hôte infecté. Il en résulte alors une grande hétérogénéité de la transmission selon les individus. Selon **VanderWaal et Ezenwa (2016)**, cette hétérogénéité peut être évaluée en introduisant une valeur V , égale au nombre de nouvelles infections causées ou produites par un seul individu infecté. Cette valeur V est le produit de plusieurs composantes. En premier lieu, il faut considérer l'infectiosité du sujet infecté, à savoir, l'intensité de sa virémie, bactériémie ou parasitémie ou bien l'intensité de son infection dans la peau. Nous distinguons alors des individus infectés présentant une forte infectiosité (les « *super-spreaders* » comme les désignent les auteurs anglo-saxons) et d'autres qui présentent une très faible infectiosité voire une infectiosité nulle bien qu'étant infectés. Dans un second temps, il faut prendre en considération le taux de contact entre un individu infecté et les individus sains de son entourage ou de son environnement ; un individu infecté « *super-spreader* » n'aura aucune chance de transmettre une infection à des individus sains s'il en est totalement isolé. Enfin, la persistance

de l'infection chez l'individu infecté joue également un grand rôle, une parasitémie intense mais fugace jouera probablement un rôle moindre dans la transmission d'un pathogène qu'une parasitémie un peu plus faible mais persistante des mois et des mois chez l'hôte infecté. Cette persistance de l'infection dépend du taux de mortalité occasionné par le pathogène dans la population d'hôtes infectés mais aussi de conditions physiologiques propres à cet hôte (qualité et intensité de la réponse immune, capacités à compenser les pertes occasionnées par le pathogène...). Il en résulte une première approximation de la valeur V d'un individu infecté par le produit suivant :

$$V = (\text{infectiosité}) \times (\text{taux de contact avec des congénères sains}) \times (\text{persistance de l'infection chez l'hôte infecté}).$$

Dans la mesure où la besnoitiose est une maladie vectorielle et que les autres modes de transmission de ce parasite entre bovins (vénérienne, contact direct) n'ont pas été formellement démontrés, il faut prendre en compte une dimension supplémentaire, celle du vecteur. Ici, nous ne nous attacherons qu'à l'espèce *Stomoxys calcitrans*, qui a fait l'objet de ce travail de thèse, mais nous sommes conscients que dans les conditions naturelles, les Tabanidés jouent également un rôle important. Deux phénomènes distincts concourent à l'efficacité des stomoxes dans la transmission de *B. besnoiti* : les interactions entre le parasite et ce vecteur et l'activité de ce dernier, elle-même tributaire de la densité et des conditions météorologiques.

Ainsi le terme V devient-il la résultante des éléments suivants :

$$V = (\text{infectiosité de l'individu infecté}) \times (\text{taux de contact avec des individus sains}) \times (\text{persistance de l'infection}) \times (\text{interaction parasite-vecteur}) \times (\text{activité du vecteur}).$$

Ce sont ces différentes composantes que nous allons maintenant analyser dans le cadre du système Bovin - *Besnoitia besnoiti* – *Stomoxys calcitrans* en mettant en perspectives les résultats obtenus dans ce travail de thèse et en le comparant à d'autres modèles connus.

1. Infectiosité de l'individu infecté

Déjà Bigalke en 1968 soulignait l'importance de l'animal source de parasites dans ses expérimentations de transmission expérimentale de *B. besnoiti* par les taons ou les stomoxes : avec certains animaux infectés, ces transferts étaient relativement aisés et reproductibles alors qu'avec d'autres ces expérimentations se soldaient régulièrement par des échecs. Sans avoir la possibilité de mesurer exactement l'intensité de l'infection dans la peau de ces animaux-sources de parasites, Bigalke avait déjà compris intuitivement la notion de « *super-spreaders* ». Il faut se rappeler que les bovins, utilisés dans nos expériences de transmission à des lapins (article 2), sont des bovins en phase chronique avancée dont le derme est très riche en kystes à bradyzoïtes. L'analyse en PCR temps réel de différents fragments de peau de ces bovins, prélevés en différents endroits du corps, ont tous démontré des valeurs de Ct très faibles (de 17,3 à 20,8 soit entre $3,6.10^5$ et $3,5.10^6$ équivalents-parasites) L'endroit où les stomoxes ont pris un repas de sang interrompu (ligne du dos de l'animal) donnait des valeurs de Ct très fortes : 34,5 dans le contenu abdominal (soit 41 équivalents-parasites) et 37 dans les pièces buccales (soit 9 équivalents-parasites). Cette richesse en ADN parasitaire dans la peau n'est pas retrouvée chez tous les animaux exposés à l'infection par *B. besnoiti*. C'est ce qu'a montré une enquête réalisée dans trois élevages d'Occitanie en collaboration avec la FRGDS Occitanie (Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire) en 2017. Notre équipe a pu démontrer que seule une petite minorité des bovins séropositifs de ces troupeaux (entre 12 et 19% d'entre eux) présentait des signaux PCR significatifs sur un fragment de peau prélevé à la base de la queue. Ce résultat nous permet de formuler l'hypothèse que seule une petite partie des individus infectés d'un troupeau ont une quantité suffisante de parasites dans leur peau pour participer massivement à la transmission vectorielle (Le Mével, 2017). Dans le cadre de ce travail de thèse, il était prévu initialement de répéter l'expérimentation de transmission à des lapins en partant de bovins séropositifs sans signes cliniques avec des valeurs de Ct très élevées dans leur

peau mais, par manque de temps, ce travail n'a pas pu être mené. Cette information est pourtant capitale car s'il s'avère exact que seuls les individus à valeurs de Ct faibles dans la peau participent réellement à la transmission, alors un dépistage et une réforme sélective de ces individus auraient tout leur sens dans une stratégie de contrôle de la besnoitiose dans les élevages à forte séroprévalence.

2. Taux de contact entre un individu infecté et des individus sains.

Comme indiqué dans la partie bibliographie, la plupart des bovins exposés et infectés par *B. besnoiti* ne présentent aucun signe clinique. Ainsi dans un troupeau où la besnoitiose est présente, individus séropositifs et séronégatifs coexistent tout au long de l'année, au pâturage comme à l'intérieur des bâtiments en hiver. Cela peut concerner également les individus ayant présenté des signes cliniques. En effet, hormis les taureaux qui, une fois malades, montrent souvent une stérilité définitive, les vaches en phase de sclérodermie sont très souvent gardées dans le troupeau, parfois pendant plusieurs années, car elles mettent bas tous les ans et continuent à très bien s'occuper de leurs veaux. Dans ce dernier cas, le taux de contact entre animaux « *super-spreaders* » et le reste du troupeau sain est alors maximal. Depuis le début des années 2010, des stratégies ayant pour principe une séparation physique des individus séropositifs et des individus séronégatifs d'un même troupeau, au moins au pâturage, ont été proposées à des éleveurs désireux de parvenir à un assainissement de leur troupeau. Il semble qu'une séparation de 200 mètres à peine entre des parcs abritant des bovins séropositifs et ceux abritant des bovins séronégatifs soit suffisante pour limiter voire supprimer toute nouvelle séroconversion (**Jacquet et al., 2013**). En respectant ce principe avec une très grande rigueur et en réformant petit à petit les animaux séropositifs, ces éleveurs ont réussi à assainir leur troupeau après une période de lutte variant de trois à huit ans en fonction de leur situation initiale (**Boulon, GDS07, communication personnelle**).

3. Persistance du pathogène chez l'hôte.

Dans un système hôte-parasite-vecteur, l'intensité de l'infection et sa persistance dans le temps chez l'hôte conditionnent toutes deux la disponibilité du pathogène pour la transmission par les vecteurs. Dans certains cas, cette disponibilité est courte dans le temps : virémie passagère dans les infections par le virus de la fièvre catarrhale ovine (**Bonneau et al., 2002**) ou parasitémies fluctuantes dans les trypanosomoses (**White et al., 1992**). En revanche, dans d'autres situations, cette disponibilité se prolonge dans le temps : les nodules cutanés de la dermatose nodulaire contagieuse bovine représentent une source pérenne de virus pour les stomoxes ou les taons (**Carn and Kitching, 1995 ; Chihota et al., 2003 ; Kahana-Sutin et al., 2017**). Dans le cas de la besnoitiose, **Liénard et al. (2011)** ont montré dans un suivi longitudinal de deux ans réalisé sur un troupeau en zone d'endémie du sud-ouest de la France, que les individus séropositifs au début de l'étude l'étaient toujours deux ans plus tard. Dans le cadre de l'étude réalisée en collaboration avec la FRGDS Occitanie, six individus d'un troupeau identifiés comme « *super-spreaders* » en mai 2017 (à l'aide d'analyses PCR temps réel sur biopsies cutanées) l'étaient toujours en mars 2018, soit 10 mois plus tard, suggérant ainsi que les kystes persistent sur une longue période dans le derme de ces animaux en quantité relativement similaire (Jacquet, données non publiées). Ainsi, garder ces individus « *super-spreaders* » au sein du troupeau, comme les vaches utilisées dans le transfert expérimental sur lapins (article 2), revient à conserver une source importante et pérenne de parasites pour la transmission vectorielle ; c'est bien évidemment une décision à proscrire dans les élevages qui souhaitent parvenir à l'assainissement.

4. Interactions parasites – vecteurs

Un des résultats importants de ce travail de thèse est la faible persistance des bradyzoïtes de *B. besnoiti* chez *Stomoxys calcitrans* à la suite d'un repas de sang sur un bovin à un stade de

sclérodémie avancée. L'ADN parasite n'est plus retrouvé dans ou sur les pièces buccales des stomoxes 96h après le repas de sang infectant, de même, aucune trace d'ADN n'est détectée dans l'intestin moyen des stomoxes 144h après ce repas. Ceci signifie qu'il n'y a pas d'installation ni de multiplication du parasite chez le vecteur et que nous pouvons écarter toute possibilité de transmission biologique. La transmission vectorielle de *B. besnoiti* par *S. calcitrans* semble donc être uniquement mécanique. Cette dernière peut s'opérer à la faveur de la souillure des pièces buccales par les parasites lors d'un repas de sang sur un bovin en sclérodémie. À partir des valeurs de Ct obtenues en PCR temps réel, il est possible d'évaluer sinon le nombre exact du moins un ordre de grandeur du nombre de bradyzoïtes encore présents dans ou sur les pièces buccales à des intervalles réguliers après le repas infectant. Ce nombre est faible (moins de 100 bradyzoïtes) immédiatement après le repas de sang infectant à très faible 48h après (moins de 10 bradyzoïtes). Bien que des parasites vivants aient été observés dans le sang receveur jusqu'à 48h post-repas infectant, il n'est pas possible d'affirmer que ces parasites sont en capacité d'infecter un nouvel hôte. Dans un modèle de transmission de trypanosomes par des stomoxes, **Sumba et al. (1998)** ont montré que *Trypanosoma congolense* et *T. evansi* restaient infectants très peu de temps sur les pièces buccales de stomoxes (5 à 7 minutes seulement) alors que ces deux parasites survivent un peu plus longtemps (210 et 480 minutes respectivement) dans l'intestin moyen. Dans une autre étude, *T. evansi* a été retrouvé vivant et infectant jusqu'à 26h post-repas infectant dans l'intestin moyen de *S. calcitrans* mais pas au-delà (**Yasameen et al., 2014**). Un autre phénomène pourrait jouer en faveur d'une plus longue capacité à transmettre des stomoxes après un repas de sang infectant : en effet, **Buttler et al. (1977)** ont montré que les stomoxes régurgitent une partie du repas précédent avant d'en commencer un autre. Il se pourrait alors que quelques bradyzoïtes de *B. besnoiti*, ayant persisté vivants et infectants dans le jabot de l'insecte, puissent être inoculés à un nouvel hôte, 24 à 48h

après le repas infectant. Quoiqu'il en soit, la faible persistance du parasite chez le vecteur pourrait être compensée par sa longue persistance chez les bovins en sclérodermie.

5. Activité des stomoxes

Les stomoxes présentent une préférence d'hôtes pour les grands mammifères. **Pitzer et al (2011)** ont montré en Floride que sur 350 repas de *S. calcitrans* analysés, 65% avaient été pris sur bovins, 24% sur équins, 10% sur l'homme et 1% sur le chien. Lors de leur repas de sang, les stomoxes sont très sensibles aux mouvements de défense des animaux sur lesquels ils piquent : ainsi, près de 75% des repas de sang sont interrompus au moins une fois (**Schofield et Torr, 2002**), ce qui constitue un facteur favorisant la transmission mécanique d'agents pathogènes par ces vecteurs. Les stomoxes vont-ils compléter leur repas de sang immédiatement après avoir été interrompus ? Sur le même hôte ? Sur un nouvel hôte à proximité ? Ou bien sur un nouvel hôte distant de plusieurs centaines de mètres ? La réponse à ces questions est cruciale pour comprendre la dynamique de la transmission de la besnoitiose entre les individus d'un même troupeau mais aussi entre individus de troupeaux différents. Toutefois, ces données manquent pour *S. calcitrans*. En revanche, **Barros et Foil (2007)** ont montré que les Tabanidés, qui attaquent les chevaux dans l'état du Pantanal au Brésil, complètent leur repas de sang à proximité immédiate de l'hôte qui les a chassés et que les mouvements de ces insectes entre chevaux n'excèdent pas 25 mètres lors de la recherche d'un repas de sang. Ce phénomène, s'il est retrouvé chez les Tabanidés européens et chez *S. calcitrans*, pourrait être un puissant facteur concourant à la transmission intra-troupeau d'un agent pathogène et un frein important à la transmission inter-troupeau des mêmes agents pathogènes. Or, dans les foyers récents de besnoitiose, comme celui du plateau du Coiron en Ardèche, certains troupeaux assainis parviennent à se maintenir sains sur une longue période (certains troupeaux sont suivis depuis 8 ans) à proximité immédiate d'élevages à très forte séroprévalence dans lesquels on constate, année après année, de nombreux cas cliniques

(**Jacquet et al., 2013**). Cette observation plaide en faveur d'un phénomène identique à celui observé par **Barros et Foil** en Amérique Latine. Le potentiel de dispersion active (ou passive) a été étudié dans de nombreux pays. Hormis le cas tout à fait exceptionnel des 225 km parcourus par des stomoxes en Floride après une tempête (**Duvallet et al., 2017**), la plupart des auteurs s'accordent pour attribuer une dispersion active plutôt faible des stomoxes autour de leurs lieux d'émergence (**Hogsette et al., 1987 ; Taylor et al., 2010**). **Lempereur et al. (2018)** confirment qu'une distance de 150 mètres est suffisante pour éviter tout risque de transmission mécanique d'un agent pathogène entre individus infectés et individus sains à l'aide d'expériences de capture – marquage et recapture de stomoxes. Cette dernière observation est capitale car elle semble attester de la « sédentarité » des stomoxes et confirmer ce que nous observons sur le terrain dans les zones d'émergence de la besnoitiose.

L'activité des stomoxes n'est pas continue sur l'année. En régions tempérées de l'hémisphère nord, l'activité de *S. calcitrans* au pâturage s'interrompt en hiver mais elle est bien présente de mars à décembre (**Liénard et al., 2011 ; Jacquet et al., 2014**). Cette activité présente deux pics, le premier en fin de printemps et le second en automne, les périodes très chaudes et à faible humidité relative de l'été pouvant diminuer temporairement l'activité des stomoxes. Ces pics d'activité sont, semble-t-il, la conjonction d'une forte densité de population et de conditions climatiques très favorables à l'activité de recherche d'hôtes. Toutefois, les stomoxes sont également présents en bâtiments, dans les écuries et les étables et ceci toute l'année. Si le cœur de l'hiver semble marquer une diminution nette des populations imaginaires de *S. calcitrans* (ou de l'activité trophique sur les animaux tout au moins), il n'est pas rare de voir des stomoxes en grand nombre sur les animaux avant leur mise à l'herbe à partir de février ou mars (**Liénard et al. 2011 ; Duvallet, communication personnelle**). Il en résulte que la période de lutte contre les stomoxes doit, peu ou prou, s'organiser toute l'année.

Comment limiter l'activité des stomoxes ? Et ainsi limiter la transmission d'agents pathogènes comme *Besnoitia besnoiti* ? La stratégie de lutte anti-vectorielle peut-elle avoir un impact sur le niveau d'incidence sérologique dans les troupeaux atteints ?

Il est possible dans un premier temps de limiter les gîtes larvaires ou d'en diminuer le « rendement ». La gestion du fumier est déterminante dans la dynamique d'une population de stomoxes à l'échelle d'une exploitation bovine (**Duvallet, communication personnelle**). Sans précaution particulière, le tas de fumier devient une véritable nurserie à stomoxes, fonctionnant à plein régime dès que les conditions climatiques sont favorables. La simple pose d'une bâche noire sur ce tas de fumier suffirait pourtant pour limiter drastiquement le développement des larves par une élévation de la température dans le fumier. L'application d'inhibiteurs de croissance comme la cyromazine peut avoir un effet très important sur la dynamique des populations à condition d'être réalisée tôt dans la saison (**Taylor et al., 2012**). Mais ici aussi, des cas de résistance à la cyromazine ont été rapportés (**Bell et al., 2010**) mais sur l'espèce *Musca domestica* seulement, pour le moment. Des insectes parasitoïdes ont été utilisés avec succès contre *S. calcitrans* et *S. niger niger* à l'île de la Réunion ou à l'île Maurice, dans l'Océan Indien (**Gilles et al., 2005**) ; de nombreuses spécialités d'insectes parasitoïdes sont en vente libre actuellement en métropole mais leur impact exact sur les populations de stomoxes reste à évaluer.

Le développement de répulsifs efficaces et de longue durée d'action, applicables sur les chevaux et les bovins, y compris pour ces derniers lorsqu'ils sont en lactation, représenteraient une avancée majeure dans le contrôle des maladies transmises par les stomoxes. Malheureusement, si des travaux ont été entrepris en ce sens (**Bruce et Decker, 1957 ; Mullens et al., 2009 ; Hieu et al., 2015**), aucun dispositif répondant aux critères énoncés plus haut n'est actuellement disponible sur le marché. L'application d'insecticides sur les animaux est-elle en capacité de répondre à nos questions ? Les applications en *Pour On* de pyréthrinoïdes sont les

plus utilisées actuellement dans la « lutte contre les mouches » du bétail (**Jacquet et al., 2015**). À la suite de l'application, les concentrations de pyréthrinoïdes sont maximales sur la ligne du dos des bovins mais beaucoup plus limitées à l'extrémité des pattes ; or, ce sont les zones de prédilection de piqûres des stomoxes. La durée de protection contre les piqûres de stomoxes est donc sans doute plus faible que celle revendiquée par les fabricants (**Presley et Wright, 1986**). Il en résulte qu'une plus grande fréquence d'applications et ce, sur 10 mois de l'année, serait nécessaire en théorie pour limiter le risque de transmission d'agents pathogènes. Pour des raisons pratiques (temps passé aux applications, possibilité limitée de rattraper des bovins allaitants au pâturage pendant l'été...) et de coût, cette stratégie montre assez vite des limites.

Des pièges mécaniques ont été développés pour les stomoxes ou adaptés aux stomoxes après une première utilisation sur une autre cible (glossines par exemple). Parmi ces pièges, nous avons déjà cité les pièges Alsynite, testés et utilisés aux USA (**Taylor et Berkebile, 2006 ; Hogsette et Kline, 2017**) ou les pièges Vavoua (**Gilles et al., 2007**) utilisés en France pour le monitoring des populations (**Jacquet et al., 2014**). Toutefois, le rendement de ces pièges reste limité dans nos régions tempérées et ils nécessitent de la manutention et du temps pour vider les cages de collecte des insectes piégés ou changer le film collant. Or, il faut être bien conscient que les éleveurs, sur le terrain ont de moins en moins de temps à consacrer à des tâches considérées comme annexes car ils ont en charge des troupeaux de plus en plus grands. Le risque est grand de voir une mesure de lutte, pourtant efficace, ne plus être utilisée ou ne plus être menée avec rigueur et régularité dans le temps, par découragement des éleveurs. L'utilisation d'écrans attractifs, spécifiques, toxiques pour les espèces ciblées, sans impact néfaste pour l'environnement, ne nécessitant aucune manutention particulière en dehors de la pose initiale et d'une surveillance régulière de leur état (vérifier qu'ils ne sont pas déchirés par exemple) permettrait de se soustraire à cet écueil. C'est dans ce sens que les écrans bleus ont été testés dans ce travail de thèse. Ces derniers se sont révélés très attractifs pour les stomoxes :

les niveaux de capture à l'aide de films collants Rentokill ® sont exceptionnellement hauts en comparaison de ce qui est décrit dans la littérature avec d'autres dispositifs (**Foil et Younger, 2006 ; Taylor et Berkebile, 2006 ; Gilles et al., 2007 ; Hogsette et Kline, 2017**). Ils auraient pu être encore augmentés si les écrans avaient été placés à l'intérieur des paddocks et non pas sur leur périmètre extérieur comme le suggèrent **Hogsette et Ose, (2017)** dans leur étude avec des pièges collants de type Knight Stick en parc zoologique. Quelle part de la population totale de stomoxes sommes nous en capacité de piéger sur nos écrans bleus ? Cette question cruciale n'a pas été abordée dans ce travail de thèse et nécessiterait sans doute des expérimentations spécifiques de capture -marquage - recapture. La spécificité des écrans bleus, mesurée dans les conditions particulières du campus de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, semble excellente. Toutefois, elle mériterait d'être étudiée dans d'autres contextes et le déploiement de ces mêmes écrans bleus dans d'autres situations (Parc National du Mercantour par exemple) a donné des résultats bien plus contrastés avec la capture de Lépidoptères endémiques (**Duvallet, communication personnelle**). Ce point mérite d'être approfondi dans le futur en disposant les pièges dans des exploitations bovines ou des centres équestres sur la chaîne pyrénéenne par exemple. La prochaine étape est de déployer des écrans bleus attractifs, spécifiques et toxiques car imprégnés d'insecticides. En effet, il n'est pas concevable dans les conditions de lutte au quotidien dans une exploitation bovine ou un centre équestre de remplacer tous les deux ou trois jours les films collants de Rentokill ® pour des raisons évidentes de temps et de coût. L'étude des interactions entre les stomoxes et les écrans bleus imprégnés de deltaméthrine (prototypes fournis par la société A to Z en 2017) est indispensable avant d'envisager leur déploiement sur le terrain. C'est pourquoi, nous avons entrepris de mesurer les temps de pose des stomoxes sur ces écrans. Les temps de pose mesurés en 2017 ont été extrêmement variables d'un stomoxe à l'autre allant du « touch and go » de moins d'une seconde à plusieurs minutes. Nous avons noté que 15% des stomoxes se posent 3 secondes ou moins sur les écrans ce qui

signifie que si nous voulons éliminer une grande partie des stomoxes qui se posent sur ces écrans, l'exposition de l'insecte à l'insecticide qui imprègne l'écran doit être rapide et massive. En conditions de laboratoire (contact tarsal forcé sur un écran imprégné de mouches anesthésiées au CO₂ durant trois secondes), nous avons montré que l'effet *knock down* était plutôt bon sur une population d'Ariège mais qu'il était très insuffisant avec la population de *S. calcitrans* capturée sur le campus de l'ENV Toulouse. De même, la mortalité à 24 heures présentait de grandes différences entre les deux populations, la population de l'ENV Toulouse présentant sans doute une résistance. Cela revient à souligner que cette approche par écrans attractifs et toxiques peut elle aussi connaître assez rapidement des limites notamment en raison de la résistance développée par certaines populations (**Salem et al., 2012**). Pouvons-nous imaginer une imprégnation par d'autres insecticides que les pyréthroïdes permettant ainsi des rotations de familles d'insecticides à un rythme à définir ? La question reste ouverte.

6. Conclusion générale

Les données accumulées au cours de ce travail de thèse ont apporté des informations intéressantes pour mieux concevoir la lutte contre la besnoitiose bovine dans notre pays et en Europe. Limiter la transmission de ce parasite entre bovins infectés et bovins sains et donc limiter la valeur V décrite plus haut, revient à agir à deux niveaux.

Au niveau du troupeau d'abord, en éliminant prioritairement les individus « *super-spreaders* » comme les animaux au stade de sclérodémie avancée dont on a démontré la dangerosité dans les conditions expérimentales. L'intérêt d'une analyse PCR quantitative sur des biopsies cutanées pour le dépistage des individus participant pleinement à la transmission devra être objectivé dans un futur proche afin d'orienter, si possible, le choix des animaux à réformer. En parallèle, la séparation des individus séropositifs des animaux séronégatifs est une autre stratégie qui a montré son intérêt dans de multiples exemples sur le terrain et qui est sous-tendue par notre compréhension du comportement trophique des vecteurs et par la faible persistance du parasite chez les stomoxes.

Au niveau des vecteurs ensuite, il faut imaginer une combinaison de méthodes de limitation des populations de stomoxes dans une stratégie de lutte intégrée : mieux gérer les gîtes larvaires, disposer des écrans attractifs et toxiques (avec un insecticide ou un régulateur de croissance efficace !) autour des bâtiments d'élevage, imaginer des pièges lumineux pour capter les imagos dans les bâtiments en fin d'hiver avant la mise à l'herbe, tester des dispositifs attractifs sucrés comme cela a été fait au Mali (**Muller et al., 2012**). Voilà quelques mesures ou pistes de recherche qui seraient nécessaires d'explorer conjointement, la lutte contre les stomoxes ne pouvant plus reposer sur cette stratégie passée qu'est la seule application d'insecticides chimiques sur les animaux.

Références bibliographiques (Hors articles)

ADLER RD., PAUL WS.

Entomopathogenic Nematode.

Curr. Biol., 2012, 22, R430–R431.

AGEE HR., PATTERSON RS.

Spectral sensitivity of stable, face, and horn flies and behavioral responses of stable flies to visual traps (Diptera: Muscidae).

Environ. Entomol., 1983, 12, 1823–1827.

AGOSTI M., BELLONI A., MORINI M., VACIRCA G.

Segnalazione di un focolaio di besnoitiosi in bovine da carne importati.

Praxis, 1994, 15, 5-6.

AHMED AB., OKIWELU SN., SAMDI SM.

Species diversity, abundance and seasonal occurrence of some biting flies in Southern Kaduna, Nigeria Afr.

J. Biomed. Res., 2005, 8, 113-118.

ALLAN SA., DAY J., EDMAN JD.

Visual ecology of biting flies.

Ann. Rev. Entomol., 1987, 32, 297-231.

ÁLVAREZ-GARCÍA G., FERNÁNDEZ-GARCÍA A., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., QUITERIA JA., AGUADO-MARTÍNEZ A., ORTEGA-MORA LM.

Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* infection and associated risk factors in cattle from an endemic region in Europe.

Vet. J., 2014a, 200, 328-331.

ÁLVAREZ-GARCÍA G., FREY CF., ORTEGA-MORA LM., SCHARES G.

A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe.

Trends Parasitol., 2013a, 29, 407-415.

ÁLVAREZ-GARCÍA G., GARCÍA-CULEBRAS A., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., NAVARRO-LOZANO V., PASTOR-FERNÁNDEZ I., ORTEGA-MORA LM.

Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests.

Vet. Parasitol., 2013b, 198, 85-95.

ÁLVAREZ-GARCÍA G., GARCÍA-LUNAR P., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., SHKAP V., ORTEGA-MORA LM.

Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle.

Parasitology, 2014b, 141, 1419-1435.

ALZIEU, J. P.

Re-emerging cattle besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in France: update on clinical and epidemiological aspects.

In: Proceedings of the 21st International Conference WAAVP, Ghent, Belgium, 2007, 222.

ALZIEU JP., JACQUIET PH., BOULON C., CORBOZ N., DESCLAUX X., PREVOT F., FRANC M., RAMEIL M., GRISEZ C., MALAVIEILLE R., LACZ C., LE TALLEC C., LANTUEJOUL C., NGWA MBOT D., BOUHSIRA E., LIENARD E.

Quelles stratégies possibles pour éviter l'introduction de la besnoitiose dans des cheptels sains?.

Recueil Journées Nationales GTV, NANTES, 2015, 509-518.

ALZIEU JP., JACQUIET PH., BOULON C., MEJEAN F., DESCLAUX X., PREVOT F., FRANC M., RAMEIL M., GRISEZ C., MALAVIEILLE R., BOUHSIRA E., LIENARD E.

La besnoitiose bovine : actualités physio-pathogéniques, cliniques et épidémiologiques.

Bulletin des GTV, 2017a, n°84, 67-78.

ALZIEU JP., JACQUIET PH., BOULON C., MEJEAN F., DESCLAUX X., PREVOT F., FRANC M., RAMEIL M., GRISEZ C., MALAVIEILLE R., BOUHSIRA E., LIENARD E.

La besnoitiose bovine : moyens de diagnostic et stratégies possibles de contrôle.

Bulletin des GTV, 2017b, n°85, 63-70.

BADELON J.

Piégeage des taons et des stomoxes : efficacité comparée des pièges h-trap et vavoua.

Thèse Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 93 p.

BALDACCHINO F., MUENWORN V., DESQUESNES M., DESOLI F.,
CHAROENVIRIYAPHAP T., DUVALLET G.

Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review.
Parasite., 2013, 20, 26.

BARRE N,

Les stomoxes ou mouches boeuf à La Réunion. Pouvoir pathogène, écologie, moyen de lutte.
Maison Alfort (FRA) - GERDAT – IEMVT, 1981, 90 pp.

BARROS AT., FOIL LD.

The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses.
Vet. Parasitol., 2007, 144, 380–384.

BASSON PA., MCCULLY RM., BIGALKE RD.

Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel,
1912) infection in cattle and rabbits.
Onderstepoort J. Vet. Res., 1970, 37, 105-126.

BASSON PA., VAN NIEKERK JW., MCCULLY RM., BIGALKE RD.,

Besnoitiosis in South African antelopes: a preliminary note on the occurrence of *Besnoitia* cysts
in the cardiovascular system.
Jl. S. Afr. Vet. Ass., 1965, 36, 578.

BASSO W., LESSER M., GRIMM F., HILBE M., SYDLER T., TROSCH L., OCHS H.,
BRAUN U., DEPLAZES P.

Bovine besnoitiosis in Switzerland: imported cases and local transmission.
Vet. Parasitol., 2013, 198, 265-273.

BASSO W., SCHARS G., GOLLNICK NS., RUTTEN M., DEPLAZES P.

Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* - experimental infection of putative definitive and
intermediate host species.
Vet. Parasitol., 2011, 178, 223-234.

BECK R., STOKOVIC I., PLEADIN J., BECK A.

Bovine besnoitiosis in Croatia.

In: Proceedings of The 2nd International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals. ApiCOWplexa, Kusadasi, Turkey, 2013, p64. Cité dans (Epidemiological patterns of bovine besnoitiosis in an endemic beef cattle herd reared under extensive conditions A. Esteban-Gil et al., 2017, Veterinary Parasitology).

BELL HA., ROBINSON KA., WEAVER RJ.

First report of cyromazine resistance in a population of UK house fly (*Musca domestica*) associated with intensive livestock production.

Pest Manag. Sci., 2010, 66, 693–695.

BENNETT SCJ.

A peculiar equine sarcosporidium in the Anglo Egyptian Sudan.

Vet. J., 1927, 83, 297-304.

BERESFORD DV., SUTCLIFFE JF.

The effect of *Macrocheles muscaedomesticae* and *M. subbadius* (Acarina: Macrochelidae) phoresy on the dispersal of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae).

Syst. Appl. Acarol .Special Pub., 2009, 23, 1-30.

BERRY IL., STAGE DA., CAMPBELL JB.

Populations and economic impacts of stable flies on cattle.

Trans. Am. Soc. Agric. Eng., 1983, 26, 873–877.

BESNOIT C., ROBIN V.

Sarcosporidiose cutanée chez une vache.

Rev. Vet., 1912, 37, 649–663.

BIGALKE, R. D.

Besnoitiosis and Globidiosis.

In: RISTIC, M., MCINTYRE, I. (Eds) Diseases of Cattle in the Tropics. The Hague. The Netherlands: Marunus Nijhoff, 1981, 429–442.

BIGALKE RD.

New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations.

Onderstepoort. J Vet. Res., 1968, 35, 3-137.

BIGALKE RD., SCHOEMAN J H., MCCULLY RM.

Immunization against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of *Besnoitia besnoiti* grown in cell cultures. 1. Studies on rabbits.

Onderstepoort. J Vet. Res., 1974, 41, 1-5.

BIGALKE RD., VAN NIEKERK JW., BASSON PA., MCCULLY RM.

Studies on the relationship between *Besnoitia* of blue wildebeest and impala, and *Besnoitia besnoiti* of cattle.

Onderstepoort. J Vet. Res., 1967, 34, 7-28.

BONNEAU KR., DEMAULA CD., MULLENS BA., MACLACHLAN NJ.

Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep.

Vet. Microbiol., 2002, 88, 115-125.

BOURDEAU PJ., CESBRON N., ALEXANDRE F., MARCHAND AM., DESVAUX JP., DOUART A.

Outbreak of bovine besnoitiosis, *Besnoitia besnoiti* in the west of France and its diagnosis by immunofluorescence assay.

In, Proc. IX E. M. O. P., Valencia, 2004, 459-460.

BRUCE WN., DECKER GC.

Experiments with Several Repellent Formulations Applied to Cattle for the Control of Stable Flies.

J. Econ. Entomol., 1957, 50, 709-713.

BRUCE WN., DECKER GC.

The relationship of stable fly abundance to milk production in dairy cattle.

J. Econ. Entomol., 1958, 52, 269-274.

BUSSIERAS J., CHERMETTE R.

Abrégé de Parasitologie Vétérinaire, Fascicule IV : Entomologie Vétérinaire,
Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.1991, 164p.

BUSSIERAS J., CHERMETTE R.

Abrégé de Parasitologie Vétérinaire, Fascicule III: Helminthologie Vétérinaire.

Dexiem edition. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Parasitologie et Maladies
Parasitaires., 1995, 290 p.

BUTLER JF., KLOFT WJ., DUBOSE LA., KLOFF ES.

Recontamination of food after feeding a ³²P food source to biting Muscidae.

J. Med. Entomol., 1977, 27, 874–877.

BUXTON BA., HINKLE NC., SCHULTZ RD.

Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus - potential for transmission by stable
flies, horn flies, and tabanids.

Am. J. Vet. Res., 1985, 46, 123-126.

CADÉAC C.

Identité de l'éléphantiasis et de l'anasarque du boeuf. Description de cette maladie.

Revue Vétérinaire, 1884, 521, 521-540.

CAMPBELL JB., BERRY IL., BOXLER DJ., DAVIS RL., CLANTON DC., DEUTSCHER
GH.

Effects of stable flies (Diptera-Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle.

J. Econ. Entomol., 1987, 80, 117-119.

CAMPBELL JB., SKODA SR., BERKERILE DR., BOXLER DJ., THOMAS GD., ADAMS
DC., DAVIS R.

Effects of stable flies (Diptera: muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle.

J. Econ. Entomol., 2001, 94, 780-783.

CAMPBELL JB., WHITE RG., WRIGHT JE., CROOKSHANK R., CLANTON DC.

Effects of stable flies (Diptera-Muscidae) on weight gains and feed-efficiency of calves on growing and finishing rations.

J. Econ. Entomol., 1977, 70, 592-594.

CAMPION DG.

Insect chemosterilants: a review.

Bull. Ent.Res., 1972, 61, 577-635.

CARN VM.

The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses.

Br. Vet. J., 1996, 152, 377-393.

CARN VM., KITCHING RP.

The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus.

Arch. Virol., 1995, 140, 503-513.

CASTILLO JA., MARCÉN JM., ORTEGA-MORA LM., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

La besnoitiosis bovina, presentada como una enfermedad emergente europea.

Albeitar., 2009, 127, 24-25.

CATANGUI MA., CAMPBELL JB., THOMAS GD., BOXLER DJ.

Average daily gains of Brahman Crossbred and English x Exotic feeder heifers exposed to low, medium, and high levels of stable flies (Diptera : Muscidae).

J. Econ. Entomol., 1993, 86, 1144-1150.

CATANGUI MA., CAMPBELL JB., THOMAS GD., BOXLER DJ.

Calculating economic injury levels for stable flies (Diptera: Muscidae) on feeder heifers.

J. Econ. Entomol., 1997, 90, 6-10.

CHANTAL J,

Actualités de l'Anthrax ou fièvre charbonneuse.

Med. Trop., 1997, 57, 52-60.

CHATIKOBO P., CHOGA T., NCUBE C., MUTAMBARA J.

Participatory diagnosis and prioritization of constraints to cattle production in some smallholder farming areas of Zimbabwe.

Prev. Vet. Med., 2013, 109, 327-333.

CHEEMA AH., TOOFANIAN F.

Besnoitiosis in wild and domestic goats in Iran.

Cornell Vet., 1979, 69, 159-168.

CHIHOTA CM., RENNIE LF., KITCHING RP., MELLOR PS.

Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects.

Med. Vet. Entomol., 2003, 17, 294-300.

CHUNG CY., KASTEN RW., PAFF SM., VAN HORN BA., VAYSSIER-TAUSSAT M., BOULOUIS H., CHOMEL BB.

Bartonella spp. DNA Associated with biting flies from California.

Emerging Infect. Dis., 2004, 10, 1311-1313.

CILEK JE., GREENE GL.

Stable fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots.

J. Econ. Entomol., 1994, 87, 275-279.

CORTES HC., LEITÃO A., GOTTSTEIN B., HEMPHILL A.

A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges).

Parasitology, 2014, 141, 1406-1417.

CORTES HC., LEITÃO A., VIDAL R., VILA-VIÇOSA MJ., FERREIRA ML., CAEIRO V., HJERPE CA.

Besnoitiosis in bulls in Portugal.

Vet. Rec., 2005, 157, 262-264.

CORTES HC., NUNES S., REIS Y., STAUBLI D., VIDAL R., SAGER H., LEITAO A., GOTTSTEIN B.

Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot.

Vet. Parasitol., 2006c, 141, 216-225.

CORTES HC., REIS Y., GOTTSTEIN B., HEMPHILL A., LEITÃO A., MÜLLER N.

Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies.

Vet. Parasitol., 2007, 146, 352-356.

CORTES HC., REIS Y., WAAP H., MARCELINO E., VAZ Y., NUNES T., FANZENDEIRO I., CAEIRO V., LEITÃO A.

Longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infection prevalence rates in a beef cattle herd in Alentejo, Portugal. In: Proceedings of the COST 854 Final Conference, Liege, Belgium, 2006a 20p (cite dans ÁLVAREZ-GARCÍA, 2014). (Parasitology 2014 Sep;141(11):1419-35. doi: 10.1017/S0031182014000729. Epub 2014 May 29.

CORTES HC., REIS Y., WAAP H., VIDAL R., SOARES H., MARQUES I., PEREIRA DA FONSECA I., FAZENDEIRO I., FERREIRA ML., CAEIRO V., SHKAP V., HEMPHIL A., LEITAO A.

Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal.

Vet. Parasitol., 2006b, 141, 226-233.

CORTES HC., VIDAL R., REIS Y.

Bovine besnoitiosis, one approach for a better understanding of its importance in Portugal.

In: Proceedings of 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada., 11-16 July 2004, 35-36.

CORTINAS R., JONES CJ.

Ectoparasites of cattle and small ruminants.

Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract, 2006, 22, 673–693.

D'AMICO F., GOUTEUX JP., LE GALL F., CUISANCE D.

Are stable flies (Diptera: *Stomoxysinae*) vectors of *Trypanosoma vivax* in the Central African Republic?

Vet. Res, 1996, 27, 161-170.

DA SILVA JUNIOR VP., MOYA BORJA GE., LEANDRO ADES.

Oviposition capacity of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) on four species of Muscidae and two species of Calliphoridae under laboratory conditions.

Rev. Bras. Parasitol. Vet, 1999, 8, 99-101.

DARLING ST.

Sarcosporidiosis in the opossum and its experimental production in the guinea pig by the intramuscular injection of sporozoites.

Bull. Soc. Pathol. Exot., 1910, 3, 513-518.

DESQUESNES M., BOSSARD G., PATREL D., HERDER S., PATOUT O., LEPETITCOLIN E., THEVENON S., BERTHIER D., PAVLOVIC D., BRUGIDOU R., JACQUIET P., SCHELCHER F., FAYE B., TOURATIER L., CUNY G.

First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France.

Vet. Rec., 2008, 162, 750-752.

DESQUESNES M., DARGANTES A., LAI DH., LUN ZR., HOLZMULLER P., JITTAPALAPONG S.

Trypanosoma evansi and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects.

Biomed. Res. Int., 2013, 2013, 1-20.

DIESING L., HEYDORN AO., MATUSCHKA FR., BAUER C., PIPANO E., DE WAAL DT., POTGIETER FT.

Besnoitia besnoiti: studies on the definitive host and experimental infections in cattle.

Parasitol. Res., 1988, 75, 114-117.

DIEZMA-DÍAZ C., BENAVIDES-SILVAN J., JIMÉNEZ-MELÉNDEZ A., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., GARCÍA-LUNAR P., ORTEGA-MORA LM., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

First case of bovine besnoitiosis in a calf. In : Proceedings in the XX Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina, Burgos, Spain., 2015 (cite dans la these de Paula García Lunar, 2016, Estrategias para la mejora del diagnóstico serológico de la besnoitiosis bovina) et (cite dans la these de Dña. Paula García Lunar 2015) <http://eprints.ucm.es/44196/1/T39055.pdf>.

DOUGHERTY CT., KNAPPE FW., BURRUS PB., WILLIS DC., CORNELIUS PL.

Behaviour of grazing cattle exposed to small populations of stable flies (*Stomoxys calcitrans* L.).

Appl. Anim. Behav. Sci., 1995, 42, 231-248.

DOYLE MS., SWOPE BN., HOGSETTE JA., BURKHALTER KL., SAVAGE HM., NASCIR S.

Vector competence of the stable fly (Diptera: Muscidae) for West Nile Virus.

J. Med. Entomol., 2011, 48, 656-668.

DSOULI-AYMES N.

Contribution a la phylogénie du genre *Stomoxys* (Diptera, Muscidae) et a la phylogéographie de *Stomoxys calcitrans* (L. 1758).

Thèse, Ecologie, Environnement, Université Paul Valéry - Montpellier III, 2009. 157 p.

DSOULI-AYMES N., MICHAUX J., DE STORDEUR E., COULOUX A., VEUILLE M., DUVALLET G.

Global population structure of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) inferred by mitochondrial and nuclear sequence data Infect.

Infect. Genet. Evol., 2011, 11, 334-342.

DUBEY JP.

Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion.

Parasitology, 1998, 116, 43-50.

DUBEY JP., LINDSAY DS.

Development and ultrastructure of *Besnoitia oryctofelisi* tachyzoites, tissue cysts, bradyzoites, schizonts and merozoites.

Int. J. Parasitol., 2003, 33, 807-819.

DUBEY JP., LINDSAY DS., SPEER CA.

Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.

Clin. Microbiol. Rev., 1998, 11, 267-299.

DUBEY JP., SREEKUMAR C., DONOVAN T., ROZMANEC M., ROSENTHAL BM., VIANNA MC., DAVIS WP., BELDEN JS.

Redescription of *Besnoitia bennetti* (Protozoa: Apicomplexa) from the donkey (*Equus asinus*).
Int. J. Parasitol., 2005, 35, 659-672.

DUBEY JP., SREEKUMAR C., ROSENTHAL BM., LINDSAY DS., GRISARD EC., VITOR RW.

Biological and molecular characterization of *Besnoitia akodoni* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the rodent *Akodon montensis* in Brazil.
Parassitologia., 2003, 45, 61-70.

DUBEY JP., VAN WILPE E., BLIGNAUT DJC., SCHARES G., WILLIAMS J H.

Development of early tissue cysts and associated pathology of *Besnoitia besnoiti* in a naturally infected bull (*Bos taurus*) from South Africa.
J. Parasitol., 2013, 99, 459–466.

DUBEY JP., YABSLEY MJ.,

Besnoitia neotomofelis n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*).
Parasitology, 2010. 137, 1731-1747.

DUVALLET G., BOIREAU P.

Other vector-borne parasitic diseases: animal helminthiases, bovine besnoitiosis and malaria.
Rev. - Off. Int. Epizoot., 2015, 34, 651-658.

DUVALLET G., FONTENILLE D., ROBERT V.

Entomologie médicale et vétérinaire.
Marseille (FRA) ; Versailles : IRD ; Editions Quae, 2017, 688 p.

EIGEN M., KLOFT WJ., BRANDNER G.

Transferability of HIV by arthropods supports the hypothesis about transmission of the virus from apes to man.
Naturwissenschaften., 2002, 89, 185-186.

ELLIS JT., HOLMDAHL OJ., RYCE C., NJENGA JM., HARPER PA., MORRISON DA.

Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats.

Protist., 2000, 151, 329-336.

ESTEBAN-GIL A., CALVETE C., CASASÚS I., SANZ A., FERRER J., PERIS MP., MARCÉN-SERAL JM., CASTILLO JA.

Epidemiological patterns of bovine besnoitiosis in an endemic beef cattle herd reared under extensive conditions.

Vet Parasitol., 2017, 236, 14-21.

ESTEBAN-GIL A., GRISEZ C., PREVOT F., FLORENTIN S., DECAUDIN A., PICARD-HAGEN N., BERTHELOT X., RONSIN P., ALZIEU JP., MAROIS M., CORBOZ N., PEGLION M., VILARDELL C., LIÉNARD E., BOUHSIRA E., CASTILLO JA., FRANC M., JACQUIET P.

No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. Parasitology.

Parasitol. Res., 2014, 113, 2355-2362.

ESTEBAN-GIL A., JACQUIET P., FLORENTIN S., DECAUDIN A., BERTHELOT X., RONSIN P., GRISEZ C., PREVOT F., ALZIEU J., MAROIS M.

Does bovine besnoitiosis affect the sexual function of chronically infected bulls?.

Theriogenology., 2016, 86, 1325-1332.

FERNÁNDEZ-GARCÍA A., ÁLVAREZ-GARCÍA G., RISCO-CASTILLO V., AGUADO-MARTÍNEZ A., MARCÉN JM., ROJO-MONTEJO S., CASTILLO JA., ORTEGA-MORA LM.

Development and use of an indirect ELISA in an outbreak of bovine besnoitiosis in Spain.

Vet. Rec., 2010, 166, 818-822.

FERNÁNDEZ-GARCÍA A., ÁLVAREZ-GARCÍA G., RISCO-CASTILLO V., AGUADO-MARTÍNEZ A., MARUGÁN-HERNÁNDEZ V., ORTEGA-MORA . LM.

Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle.

Vet. Parasitol., 2009a, 164, 104-110.

FERNÁNDEZ-GARCÍA A., RISCO-CASTILLO V., PEDRAZA-DÍAZ S., AGUADO-MARTÍNEZ A., ÁLVAREZ-GARCÍA G., GÓMEZ-BAUTISTA M., COLLANTES-FERNÁNDEZ E., ORTEGA-MORA LM.

First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain.

J. Parasitol., 2009b, 95, 474-476.

FISCHER O., MATLOVA L., DVORSKA L., SVASTOVA P., BARTL J., MELICHAREK I., WESTON RT., PAVLIK I.

Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs.

Med. Vet. Entomol., 2001, 15, 208-211.

FOIL LD., GORHAM JR.

Mechanical Transmission of Disease Agents by Arthropods.

In: Eldridge B.F., Edman J.D. (eds) Medical Entomology. Springer, Dordrecht, 2000, 461-514.

FOIL LD., HOGSETTE JA.

Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies.

Rev. - Off. Int. Epizoot., 1994, 13, 1125-1158.

FOIL LD., MEEK CL., ADAMS WV., ISSEL CJ.

Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*).

Am. J. Vet. Res., 1983, 44, 155–156.

FOIL LD., YOUNGER CD.

Development of treated targets for controlling stable flies (Diptera: Muscidae)

Vet. Parasitol., 2006, 137, 311-315.

FRANCO EE., BORGES I.

Sur la sarcosporidiose Bovine.

Arquivos do Instituto Bacteriologico Câmara Pestana., 1916, 4, 269–289. (Cite dans Cortes et al 2014, A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916).

FRANK W., FRENKEL JK.

Besnoitia in a palaeartic lizard (*Lacerta dugesii*) from Madeira.

Z. Parasitenkd., 1981, 64, 203-206.

FRENKEL JK.

Infections with organisms resembling *Toxoplasma*, together with the description of a new organism: *Besnoitia jellisoni*.

In: Atti del VI Congresso Internazionale di Microbiologia, Roma, Italia., 1953, 426-437 (cite dans la these de Daniel Gutiérrez Expósito 2017) <http://eprints.ucm.es/44196/1/T39055.pdf>.

FREY CF., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., ORTEGA-MORA LM., BENAVIDES J., MARCÉN JM., CASTILLO JA., CASASÚS I., SANZ A., GARCÍA-LUNAR P., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

Chronic bovine besnoitiosis: histopathological findings and parasite distribution and load in subclinical cases.

In: Proceedings of the 2nd International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals, Kusadasi ,2013a, Turkey.

FREY CF., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., ORTEGA-MORA LM., BENAVIDES J., MARCÉN JM., CASTILLO JA., CASASÚS I., SANZ A., GARCÍA-LUNAR P., ESTEBAN-GIL A., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

Chronic bovine besnoitiosis: Intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases.

Vet. Parasitol., 2013b, 197, 95-103.

FREY CF., REGIDOR-CERRILLO J., MARREROS N., GARCÍA-LUNAR P., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., SCHARES G., DUBEY JP., GENTILE A., JACQUIET P., SHKAP V., CORTES H., ORTEGA-MORA LM., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

Besnoitia besnoiti lytic cycle in vitro and differences in invasion and intracellular proliferation among isolates.

Parasit. Vectors., 2016, 29, 9-115.

GARCÍA-LUNAR P., ORTEGA-MORA LM., SCHARES G., DIEZMA-DÍAZ C., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

A new lyophilized tachyzoite based ELISA to diagnose *Besnoitia spp.* infection in bovids and wild ruminants improves specificity.

Vet. Parasitol., 2017, 244, 176-182.

GARNHAM PCC.

Besnoitia (Protozoa: Toxoplasmea) in lizards.

Parasitology, 1966, 56, 329-334.

GENTILE A., MILITERNO G., SCHARES G., NANNI A., TESTONI S., BASSI P.,
GOLLNICK N S.

Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy - first in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy.

Vet. Parasitol., 2012, 184, 108-115.

GILLES J.

Dynamique et génétique des populations d'insectes vecteurs. Les Stomoxes, *Stomoxys calcitrans* et *Stomoxys niger niger* dans les élevages bovins réunionnais.

Thèse de l'Université de La Réunion., 2005, 140 p.

GILLES J., DAVID JF., DUVALLET G., DE LA ROCQUE S., TILLARD E.

Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island.

Med. Vet. Entomol., 2007, 21, 65-69.

GOLDMAN M., PIPANO E.

Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel.

Trop. Anim. Health. Prod., 1983, 15, 32-8.

GOLLNICK NS., SCHARR JC., SCHARES G., LANGENMAYER MC.

Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: Chronology of disease progression.

BMC Vet. Res., 2015, 11, 35.

GREGOR F., ROZKOSNY R., BARTAK M., VANHARA J.

The muscidae (Diptera) of Central Europe.

Masaryk University, Brno, Czech Republic, 2002, 280 p

GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., ARNAL MC., MARTÍNEZ-DURÁN D., REGIDOR-CERRILLO J., REVILLA M., FERNANDEZ DE LUCO D., JIMENEZ-MELENDEZ A., CALERO -BERNAL R., HABELA MA., GARCIA-BOCANEGRA I., ARENAS-MONTES A., ORTEGA-MORA LM., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle.

Vet. Parasitol., 2016, 223, 7-13.

GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., FERRE I., ORTEGA-MORA LM., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

Advances in the diagnosis of bovine besnoitiosis: current options and applications for control.

Int. J. Parasitol., 2017a, 47, 737-751.

GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., GARCÍA-BOCANEGRA I., HOWE DK., ARENAS-MONTES A., YEARGAN MR., NESS SL.

Clinical and serological dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in three endemically infected beef cattle herds.

Transbound Emerg Dis., 2017b, 64, 538-546.

GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., GARCÍA-BOCANEGRA I., HOWE DK., ARENAS-MONTES A., YEARGAN MR., NESS SL., ORTEGA-MORA LM., ÁLVAREZ-GARCÍA G.

A serosurvey of selected cystogenic coccidia in Spanish equids: first detection of anti-*Besnoitia* spp. specific antibodies in Europe.

BMC Vet. Res., 2017c, 13, 1-9.

GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D., ORTEGA-MORA LM., GARCÍA-LUNAR P., ROJO-MONTEJO S., ZABALA J., SERRANO M., ALVAREZ-GARCÍA G.

Clinical and serological dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in three endemically infected beef cattle herds.

Transbound Emerg Dis., 2017d, 64, 538-546.

HADWEEN S.

Cyst-forming protozoa in reindeer and caribou, and a sarcosporidian parasite of the seal (*Phoca richardi*).

J. Am. Vet. Med. Assoc., 1922, 61, 282-374.

HAFEZ, M, GAMAL-EDDINE, FM.

Ecological studies on *Stomoxys calcitrans* L. and *sitiens* Rond. In Egypt, with suggestions on their control.

Bull. Soc. Entomol. Egypte, 1959, 43, 245–283.

HAFEZ M., GAMAL-EDDIN FM.

The behaviour of the stable fly larva, *Stomoxys calcitrans* L., towards some environmental factors.

Bull. Soc. Entomol. Egypte, 1961, 45, 341-367.

HALL RD., SMITH JP.

Life history and economic importance of the stable fly.

In: Stable fly biology and control in cattle feedlots. Kansas Agricultural Experiment Station Publ., 1986, 86-362.

HALL RD., THOMAS GD., BERRY IL., FISCHER FJ., FOEHSE MC.

Relative abundance of stable flies, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae), at dairies, feedlots and Pastures in Missouri.

J. Kans. Entomol. Soc., 1983, 56, 223-228.

HARWOOD RF., JAMES MT.

Entomology in human and animal health.

Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 7th edition, 1979, 548 pp.

HASEYAMA KL., WIEGMANN BM., ALMEIDA EA., DE CARVALHO CJ.

Say goodbye to tribes in the new house fly classification: A new molecular phylogenetic analysis and an updated biogeographical narrative for the Muscidae (Diptera).

Mol. Phylogenet. Evol., 2015, 89, 1-12.

HEATH ACG.

Distribution, seasonality and relative abundance of *Stomoxys calcitrans* (stable fly) (Diptera: Muscidae) in New Zealand.

N. Z. Vet. J., 2002, 50, 93-98.

HEMPHILL A., VONLAUFEN N., NAGULESWARAN A.

Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*.

Parasitology, 2006, 133, 261-278.

HENRY. A.

Sarcosporidiose cutanée chez une Vache.

Rec. med. Vet., 1912, 327.

HEYDORN AO., SENAUD J., MEHLHORN H., HEINONEN R.

Besnoitia sp. from goats in Kenya.

Z. Parasitenkd., 1984, 70, 709-713.

HIEU TT., CHOI WS., KIM SI., WANG M., AHN YJ.

Enhanced repellency of binary mixtures of *Calophyllum inophyllum* nut oil fatty acids or their esters and three terpenoids to *Stomoxys calcitrans*.

Pest Manag. Sci., 2015, 71, 1213-1218.

HIEU TT., KIM SI., LEE SG., AHN YJ.

Repellency to *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) of plant essential oils alone or in combination with *Calophyllum inophyllum* nut oil.

J. Med. Entomol., 2010, 47, 575-580.

HOCH AL., GARGAN TP., BAILAY CL.,

Mechanical transmission of Rift Valley fever virus by hematophagous Diptera.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 1985, 34, 188-193.

HOFFMAN RA.

The stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L): Biology and behavior studies.

Thèse. Oklahoma State Univ., 1968, 92 p.

HOFMEYR CFB.

Globidiosis in cattle.

J. S. Afr. Vet. Med. Ass., 1945, 16, 102-109.

HOGSETTE JA., KLINE DL.

The Knight Stick Trap and Knight Stick Sticky Wraps: New Tools for Stable Fly (Diptera: Muscidae) Management.

J. Econ. Entomol., 2017, 110, 1384–1389.

HOGSETTE JA., OSE GA.

Improved capture of stable flies (Diptera: Muscidae) by placement of knight stick sticky fly traps protected by electric fence inside animal exhibit yards at the Smithsonian's National Zoological Park.

Zoo biology., 2017, 36, 382-386.

HOGSETTE JA., RUFF JP., JONES CJ.

Stable fly biology and control in Northwest Florida.

J. Agric. Entomol., 1987, 4, 1-11.

HORNOK S., FEDAK A., BASKA F., HOFMANN-LEHMANN R., BASSO W.

Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary.

Parasit Vectors., 2014, 7, 20.

JACQUIET P., LIENARD E., FRANC M.

Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects.

Vet. Parasitol., 2010, 174, 30-36.

JACQUIET P., PREVOT F., GRISEZ C., LIENARD E., BOUHSIRA E., FRANC M., ALZIEU J.P., DESCLAUX X., RAMEIL M., MALAVIEILLE R., BOULON C., MEJEAN F.

Emergence of bovine besnoitiosis in Europe: how to stop the spread? European Forum of Buiatrics 2013 (Marseille, France).

JACQUIET P., ROUET D., BOUHSIRA E., SALEM A., LIENARD E., M. FRANC.

Population dynamics of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) in southwestern France.

Rev. Med. Vet., 2014, 165, 267–271.

JACQUIET P., SHARIF S., LIENARD E., FRANC M., BOUHSIRA E.

Stomoxes et taons, biologie, rôles pathogènes et contrôle chez les bovins.

NEVA, élevages et santé, 2015, 8, 13-20.

JOHNSON G., PANELLAN N., HALE K., KOMAR N.

Detection of West Nile Virus in stable flies (Diptera: Muscidae) parasitizing juvenile American white pelicans.

J. Med. Entomol., 2010, 47, 1205-1211.

JONES TW., DAVILA ARM.

Trypanosoma vivax-out of Africa.

Trends Parasitol, 2001, 17, 99-101.

KAHANA-SUTIN E., KLEMENT E., LENSKY I, GOTTLIEB Y.

High relative abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* is associated with lumpy skin disease outbreaks in Israeli dairy farms.

Med. Vet. Entomol., 2017, 31, 150-160.

KEAWRAYP S., DUVALLET G., SUKONTHABHIROM S., CHAREONVIRYYAPHAP T.

Diversity of *Stomoxys spp.* (Diptera: Muscidae) and diurnal variations of activity of *Stomoxys indicus* and *S. calcitrans* in a farm, in Wang Nam Khiao District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand.

Parasite, 2012, 19, 259-265.

KHORDADMEHR M., NAMAVARI M., KHODAKARAM-TAFTI A., MANSOURIAN M., RAHIMIAN A., DANESHBOD Y.

Comparison of use of Vero cell line and suspension culture of murine macrophage to attenuation of virulence of *Neospora caninum*.

Res. Vet. Sci. 2013, 95, 515-521.

KRINSKY WL.

Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae).

J. Med. Entomol., 1976, 13, 225–275.

KUMI-DIAKA J., WILSON S., SANNUSI A., NJOKU CE. OSORI DI.

Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system.

Theriogenology., 1981, 16, 523-530.

KUNZ SE., MONTY J.

Biology and ecology of *stomoxys nigra* Macquart and *Stomoxys calcitrans* (L.)(Diptera, Muscidae) in Mauritius.

Bull. Entomol. Res., 1976, 66, 745-755.

LANGENMAYER MC., GOLLNICK NS., MAJZOUB-ALTWECK M., SCHARR JC., SCHARES G., HERMANNNS W.

Naturally acquired bovine besnoitiosis: histological and immunohistochemical findings in acute, subacute, and chronic disease.

Vet. Pathol., 2015a, 52, 476-488.

LANGENMAYER MC., GOLLNICK NS., SCHARR JC., SCHARES G., HERRMANN DC., MAJZOUB-ALTWECK M., HERMANNNS W.

Besnoitia besnoiti infection in cattle and mice: ultrastructural pathology in acute and chronic.

Parasitol. Res., 2015b, 114, 955-963.

LAVEISSIERE C., PENCHENIER L.

Manuel de lutte contre la maladie du sommeil.

IRD Editions. Institut de recherche pour le développement, Paris, 2005, 366 p.

LECLERCQ M.

Les mouches nuisibles aux animaux domestiques, Un problème mondial.

Presses agronomiques de Gembloux., 1971. 200 p.

LEFEVRE PC., BLANCOU J., CHERMETTE R.

Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes.

Tome 2, partie 3, maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires- Dermatophilose. Paris: Lavoisier, 2003.-p. 977- 992 . (cite dans Guillot et Chemette 2005)

http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/47816/AVF_2006_1_85.pdf?sequence=1.

LE MEVEL J.

Besnoitiose bovine : vers une nouvelle stratégie d'assainissement des troupeaux à forte séroprévalence ? IUT Brest-Morlaix, Département Génie Biologique, 2017, 34pp.

LEMPEREUR L., SOHIER C., SMEETS F., MARÉCHAL F., BERKVENNS D., MADDER M., LOSSON B.

Dispersal capacity of *Haematopota* spp. and *Stomoxys calcitrans* using a mark–release–recapture approach in Belgium.

Med. Vet. Entomol. 2018. doi: 10.1111/mve.12297.

LENFANT F., FRANC M., JACQUIET P., GRISEZ C., PREVOT F., ALZIEU JP., BOUHSIRA E., LIENARD E.

Development of an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) for the diagnosis of cattle besnoitiosis.

Rev Med Vet., 2014, 165, 327-333.

LESSER M., BRAUN U., DEPLAZES P., GOTTSTEIN B., HILBE M., BASSO W.

First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland.

Schweiz. Arch. Tierheilkd., 2012, 154, 469-474.

LIÉNARD E., POP L., PREVOT F., GRISEZ C., MALLET V., RAYMOND-LETRON I., BOUHSIRA É., FRANC M., JACQUIET P.

Experimental infections of rabbits with proliferative and latent stages of *Besnoitia besnoiti*.

Parasitol. Res., 2015, 114, 3815-3826.

LIENARD E., SALEM A., GRISEZ C., PREVOT F., BERGEAUD JP., FRANC M., GOTTSTEIN B., ALZIEU JP., LAGALISSE Y., JACQUIET P.

A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France.

Vet. Parasitol., 2011, 177, 20-27.

LIENARD E., SALEM A., JACQUIET P., GRISEZ C., PREVOT F., BLANCHARD B., BOUHSIRA E., FRANC M.

Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae).

Parasitol. Res., 2013, 112, 479-486.

LIU SS., LI AY., LOHMEYER KH., PEREZ DE LEON AA.

Effects of pyriproxyfen and buprofezin on immature development and reproduction in the stable fly.

Med. Vet. Entomol., 2012, 26, 379-85.

LYSYK TJ.

Arthropods associated with livestock grazing systems.

Chapter 3 In : Arthropods of Canadian grasslands (Vol. 2) : Inhabitants of a changing landscape. Edited by Floate K.D.- Biological survey of Canada. 2011. p. 45-69. Disponible sur : https://www.zin.ru/Animalia/Coleoptera/pdf/Chapter3_ACGv2.pdf.

LYSYK TJ.

Relationships between temperature and life history parameters of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae).

J. Med. Entomol., 1998, 35, 107-119.

LYSYK TJ., KALISCHUK-TYMENSEN LD., SELINGER LB.

Mortality of adult *Stomoxys calcitrans* fed isolates of *Bacillus thuringiensis*.

J. Econ. Entomol., 2012, 105, 1863-1870.

MADUBATA C., DUNAMS-MOREL DB., ELKIN B., OKSANEN A., ROSENTHAL BM.

Evidence for a recent population bottleneck in an Apicomplexan parasite of caribou and reindeer, *Besnoitia tarandi*.

Infect. Genet. Evol., 2012, 12, 1605-1613.

MAJZOUB M., BREUER W., GOLLNICK NS., ROSTAHER A., SCHARES G., HERMANN S W.

Ein ausbruch von besnoitiose bei rindern in Deutschland; ultrastrukturelle und molekularbiologische Untersuchungen.

Wien Tierarztl Monatsschr., 2010, 97, 9-15.

MARCON PCRG., THOMAS GD., SIEGFRIED BD., CAMPBELL JB.

Susceptibility of stable flies (Diptera: Muscidae) from southeastern Nebraska beef cattle feedlots to selected insecticides and comparison of 3 bioassay techniques.

J. Econ. Entomol., 1997, 90, 293-298.

MAROTEL M.

Discussion of paper by Besnoit et Robin.

Bulletin des Mémoires de la Société de Sciences Veterinaires de Lyon et de la Société de Médecine Veterinaire de Lyon et du Sud-Est., 1912, 15, 196–217.

MARQUEZ JG., CUMMINGS MA., KRAFSUR ES.

Phylogeography of stable fly (Diptera : Muscidae) estimated by diversity at ribosomal 16S and Cytochrome Oxidase I mitochondrial genes.

J. Med. Entomol., 2007, 44, 998-1008.

MASMEATATHIP R., GILLES J., KETAVAN C., DUVALLET G.

First survey of seasonal abundance and daily activity of *Stomoxys spp.* (Diptera: Muscidae) in Kamphaengsaen Campus, Nakornpathorn province.

Parasite, 2006, 13, 245-250.

MC CULLY RM., BASSON PA., VAN NIEKERK JW., BIGALKE RD.

Observations on *Besnoitia* cysts in the cardiovascular system of some wild antelopes and domestic cattle.

Onderstepoort J. Vet. Res., 1966, 33, 245-276.

MELLOR PS., KITCHING RP., WILKINSON PJ.

Mechanical transmission of capri-pox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*.

Res. Vet. Sci., 1987, 43, 109-112.

MIHOK S., KANGETHE EK., KAMAU GK.

Trials of Traps and Attractants for *Stomoxys Spp.* (Diptera, Muscidae).

J. Med. Entomol., 1995, 32, 283-289.

MRAMBA F., BROCE AB., ZUREK L.

Vector competence of stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae), for *Enterobacter sakazakii*.

J. Vector Ecol., 2007, 32, 134-139.

MUENWORN V., DUVALLET G., THAINCHUM K., TUNTAKOM S., TANASILCHAYAKUL S., PRABARIPAI A., AKRATANAKUL P., SUKONTHABHIROM S., CHAREONVIRIYAPHAP T.

Geographic distribution of stomoxylene flies (Diptera: Muscidae) and diurnal activity of *Stomoxys calcitrans* in Thailand.

J. Med. Entomol., 2010, 47, 791-797.

MULLENS BA., REIFENRATH WG., BUTLER SM.

Laboratory trials of fatty acids as repellents or antifeedants against houseflies, horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae).

Pest Manag. Sci., 2009, 65, 1360-1366.

MULLER GC., HOGSETTE JA., BEIER JC., TRAORE SF., TOURE MB., TRAORE MM., BAH S., DOUMBIA S., SCHLEIN Y.

Attraction of *Stomoxys sp.* to various fruits and flowers in Mali.

Med. Vet. Entomol., 2012, 26, 178–187.

NELDER MP., LLOYD JE., LOFTIS AD., REEVES WK.

Coxiella burnetii in wild-caught filth flies.

Emerging Infect. Dis., 2008, 14, 1002–1004.

NEUMAN M.

Serological survey of *Besnoitia besnoiti* (Marotel 1912) infection in Israel by immunofluorescence.

Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B., 1972, 19, 391-396.

NEWSON HD.

Arthropod problems in recreation areas.

Annu. Rev. Entomol., 1977, 22, 333–353.

NIETO-RODRÍGUEZ JM., CALERO-BERNAL R., ÁLVAREZ-GARCÍA G., GUTIÉRREZ EXPÓSITO D., REDONDO-GARCÍA E., FERNÁNDEZ-GARCÍA JL., MARTÍNEZ-ESTÉLLEZ MÁH.

Characterization of an outbreak of emerging bovine besnoitiosis in Southwestern Spain.
Parasitol. Res., 2016, 115, 2887-2892.

NJENGA, JM., BWANGAMOI O., KANGETHE EK., MUGERA GM., MUTIGA ER.
Comparative ultrastructural studies on *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia caprae*.
Vet. Res. Commun., 1995, 19, 295-308.

NOBEL TA., KLOPFER U., PERL S., NYSKA A., NEUMANN M., BRENNER G.
Histopathology of genital besnoitiosis of cows in Israel.
Vet. Parasitol., 1981, 8, 271-276.

NOZAIS JP., DATRY A., DANIS M.
Traité de parasitologie médicale.
Edition paradel. Paris, 1996, 817 p.

OFFERI ED.
Gamma irradiation of *Stomoxys calcitrans*.
J. Econ. Entomol., 1970, 63, 574-579.

OLAFSON PU., PITZER JB., KAUFMAN PE.
Identification of a mutation associated with permethrin resistance in the para-type sodium channel of the stable fly (Diptera: Muscidae).
J. Econ. Entomol., 2011, 104, 250-257.

OLIAS P., SCHADE B., MEHLHORN H.
Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae).
Infect. Genet. Evol., 2011, 11, 1564–1576.

PAPADOPOULOS E., ARSENOS G., PTOCHOS S., KATSOULOS P., OIKONOMOU G., KARATZIA MA., KARATZIAS H.

First report of *Besnoitia besnoiti* seropositive cattle in Greece.

J. Hellenic. Vet. Med. Soc., 2014, 65, 115-120.

PARR HCM,

Studies on *Stomoxys calcitrans* (L.) in Uganda, East Africa. Notes on life history and behaviour.

Bull. Entomol. Res., 1962, 53, 437-443.

PASCOE RR.

Habronémose cutanée.

In : Dermatologie du cheval Edition Maloine., 1993, 157-194.

PETERSON A.

Larvae of Insects. An introduction to Nearctic species.

Part II. Coleoptera, Diptera, Neuroptera, Siphonaptera, Mecoptera, Trichoptera. 4th ed. Edwards Brothers, Ann Arbor, MI., 1960, 416 p.

PETESHEV VM., GALUZO IG., POLOMOSHNOV AP.

Cats —definitive hosts of *Besnoitia* (*Besnoitia besnoiti*) (En Russe).

Azv Akad Nauk Kazakh ,SSR B., 1974 41, 33–38. (Cite par Diesing et al.,1988 et Jacquiet et al., 2010) Disponible sur :<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0002116668&origin=inward&txGid=4859fa405f4cc6e2de97afa81c4e559e> .

PITZER JB., KAUFMAN PE., TENBROECK SH.

Assessing permethrin resistance in the stable fly (Diptera: Muscidae) in Florida by using laboratory selections and field evaluations.

J. Econ. Entomol., 2010, 103, 2258-2263.

PITZER JB., KAUFMAN PE., TENBROECK SH., MARUNIAK JE.

Host blood meal identification by multiplex polymerase chain reaction for dispersal evidence of stable flies (Diptera: Muscidae) between livestock facilities.

J. Med. Entomol., 2011, 48, 53-60.

POLS JW.

Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology.

Onderstepoort J. Vet. Res., 1960, 28, 264-356.

POLS JW.

The artificial transmission of *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912), to cattle and rabbits.

J S Afr Vet Assoc., 1954, 25, 37-44.

POTGIETER FT., SUTHERLAND B., BIGGS HC.

Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*.

Onderstepoort J. Vet. Res., 1981, 48, 119-122.

PRESLEY SM., WRIGHT RE.

Field test of pyrethroid ear tags, sprays and a pour-on formulation for control of horse flies on cattle.

J. Agric. Entomol., 1986, 3, 369-373.

PRULLAGE JB., WILLIAMS RE., GAAFAR SM.

On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*.

Vet. Parasitol., 1993, 50, 125-135.

REBHUN WC.

Observations on habronemiasis in horses.

Equine Vet. Educ., 1996, 8, 188-191.

REIS Y., CORTES H., VISEU ML., FAZENDEIRO I., LEITÃO A., SOARES H.

Microtubule cytoskeleton behavior in the initial steps of host cell invasion by *Besnoitia besnoiti*.

FEBS Letters., 2006, 580, 4673-4682.

RHODAIN F., PEREZ C.

Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. Maloine, Paris, S.A., 1985. 458p.

ROCHON K., LYSYK TJ, SELINGER LB.

Persistence of *Escherichia coli* in immature house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) in relation to larval growth and survival.

J. Med. Entomol., 2004, 41, 1082-1089.

ROCHON K., LYSYK TJ, SELINGER LB.

Retention of *Escherichia coli* by house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) during pupal metamorphosis and eclosion.

J. Med. Entomol., 2005, 42, 397-403.

RODRIGUEZ-BATISTA Z, LEITE RC.

Occurrence of biological vectors of *Dermatobia hominis* (L. Jr, 1781) (Diptera: Cuterebridae), captured by Magoom trap in the metallurgic region, Minas Gerais, Brazil.

Cienc. Rural., 1997, 27, 645-649.

RODRÍGUEZ-BATISTA Z., LEITE RC., OLIVEIRA PR., LOPES CM., BORGES LM.

Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil.

Vet. Parasitol., 2005, 130, 343-346.

ROEDER R., BOLTON H.

Flies Impacting Livestock, Poultry and Food Safety.

U.S. Department of Agriculture National Agricultural Library S1030: 2007. Disponible sur:

<https://fsrio.nal.usda.gov/fsrio/research-projects/flies-impacting-livestock-poultry-and-food-safety>.

ROMMEL M.

New knowledge on the biology of *Coccidia*, *Toxoplasma*, *Sarcosporidia* and *Besnoitia*.

Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 1975, 88, 112-117.

ROSTAHER A., MUELLER RS., MAJZOUB M., SCHARES G., GOLLNICK NS.

Bovine besnoitiosis in Germany.

Vet. Dermatol., 2010, 21, 329-334.

RYAN EG., LEE A., CARTY C., O'SHAUGHNESSY J., KELLY P., CASSIDY JP., SHEEHAN M., JOHNSON A., DE WAAL T.

Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd.

Vet. Rec., 2016, 178, 608.

SALEM A.

Stomoxys calcitrans (L. 1758) : morphologie, biologie, rôle vecteur et moyens de lutte.

These doctorat de l'université de Toulouse, Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires, INP-ENVT, 2012, 149p.

SALEM A., BOUHSIRA E., LIENARD E., MELOU AB., JACQUIET P., FRANC M.

Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, lambda cyalothrin, permethrin and phoxim.

Intern. J. Appl. Res. Vet. Med., 2012, 10, 249-257.

SANNUSI AA.

Simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis.

Vet. Parasitol., 1991, 39, 185-188.

SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., CORTES HC., ROSTAHER A., SELMAIR J., HERMANNNS W., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS.

First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany.

Vet. Parasitol., 2009, 163, 315-322.

SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SCHARR JC., LANGENMAYER MC., SELMAIR J., DUBEY JP., CORTÉS HC., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS.

Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera.

Vet. Parasitol., 2010, 171, 32-40.

SCHARES G., LANGENMAYER MC., MAJZOUB-ALTWECK M., SCHARR JC., GENTILE A., MAKSIMOV A., SCHARES S., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS.

Naturally acquired Bovine besnoitiosis: Differential distribution of parasites in the skin of chronically infected cattle.

Vet. Parasitol., 2016, 216, 101-107.

SCHARES G., LANGENMAYER MC., SCHARR JC., MINKE L., MAKSIMOV P., MAKSIMOV A., SCHARES S., BÄRWALD A., BASSO W., DUBEY JP., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS.

Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis.

Int. J. Parasitol., 2013, 43, 143-154.

SCHARES G., MAKSIMOV A., BASSO W., MORE G., DUBEY JP., ROSENTHAL B., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SELMAIR J., LANGENMAYER MC., SCHARR JC., CONRATHS FJ. GOLLNICK NS.

Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle.

Vet. Parasitol., 2011, 178, 208-216.

SCHOFIELD S., BRADY J.

Circadian activity pattern in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*.

Physiol. Entomol., 1996, 21, 159-163.

SCHOFIELD S., TORR SJ.

A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies.

Med. Vet. Entomol., 2002, 16, 177-85.

SCHORDERET-WEBER S., NOACK S., SELZER PM., KAMINSKY R.

Blocking transmission of vector-borne diseases.

Int J Parasitol Drugs Drug Resist., 2017, 7, 90-109.

SCOLES GA., BROCE AB., LYSYK TJ., PALMER GH.

Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae).

J. Med. Entomol., 2005, 42, 668-675.

SHARIF S., GRISEZ C., JACQUIET P., PREVOT F., BOUHSIRA E., FRANC M., LIENARD E.

Experimental transmission of *Besnoitia besnoiti* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*).

25th International Conference of the World Association for the Advancement of the Veterinary Parasitology, Liverpool, 16-20 August 2015 (oral communication).

SHARIF S., JACQUIET P., PRÉVOT F., GRISEZ C., BOUHSIRA E., FRANC M., LIÉNARD E.

Assessment of persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae).

Revue. Méd. Vét., 2017, 168, 197-203.

SHKAP V., PIPANO E., MARCUS S., KRIGEL Y.

Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection.

Onderstepoort J. Vet. Res., 1994, 61, 273-275.

SHKAP V., RESKE A., PIPANO E., FISH L., BASZLER T.

Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*.

Vet. Parasitol., 2002, 106, 35-43.

SHOWLER AT., OSBRINK WL.

Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (L.), Dispersal and Governing Factors.

Int J Insect Sci., 2015, 7, 19–25.

SINSHAW A., ABEBE G., DESQUESNES M., YONI W.

Biting flies and *Trypanosoma vivax* infection in three highland districts bordering lake Tana, Ethiopia.

Vet. Parasitol., 2006, 142, 35-46.

SKOVBGARD H., NACHMAN G.

Population dynamics of stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) at an organic dairy farm in Denmark based on marker capture with destructive sub-sampling.

Environ. Entomol., 2012, 41, 20-29.

SPEER CA., DUBEY JP., MCALLISTER MM., BLIXT JA.

Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.

Int. J. Parasitol., 1999, 29, 1509-1519.

SQUARZONI C.

Lutte biologique contre les stomoxes des bovins à la Réunion: exemple du "Poseidom vétérinaire".

Thèse. Veto., 2001, 143p.

STEELMAN CD.

Effects of external and internal arthropod parasites on domestic livestock production.

Annu. Rev. Entomol., 1976, 21, 155-78.

STÜBEN M.

Chemosterilantien. (En Allemand).

Anzeiger für Schädlingskunde, 1969, 42, 62-62. Disponible sur : <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-64-270159-1.pdf>.

SUMBA AL., MIHOK S., OYIEKE., FA.

Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model.

Med. Vet. Entomol., 1998, 12, 417-422.

SZALANSKI AL., OWENS CB., MCKAY T., STEELMA CD.

Detection of *Campylobacter* and *Escherichia coli* O157:H7 from filth flies by polymerase chain reaction.

Med. Vet. Entomol., 2004, 18, 241-246.

TAYLOR DB., BERKEBILE DR.

Comparative efficiency of six stable fly traps.

J. Econ. Entomol., 2006, 99, 1415-1419.

TAYLOR DB., BERKEBILE DR.

Sugar feeding in adult stable flies.

Environ. Entomol., 2008, 37, 625-629.

TAYLOR DB., BERKBILE DR., SCHOLL PJ.

Stable fly population dynamics in eastern Nebraska in relation to climatic variables.

J. Med. Entomol., 2007, 44, 765- 771.

TAYLOR DB., FRIESEN K., ZHU J.

Precipitation and Temperature Effects on Stable Fly (Diptera: Muscidae) Population Dynamics.

Environ. Entomol., 2017, 46, 434-439.

TAYLOR D B., FRIESEN K., ZHU JJ., SIEVERT K.

Efficacy of Cyromazine to Control Immature Stable Flies (Diptera: Muscidae) Developing in Winter Hay Feeding Sites.

J. Econ. Entomol., 2012, 105, 726–731.

TAYLOR DB., MOON RD., MARK DR.

Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy and beef cattle production.

J. Med. Entomol., 2012, 49, 198- 209.

TENTER AM., BARTA JR, BEVERIDGE I., DUSZYNSKI DW., MEHLHORN H., MORRISON DA., THOMPSON RC., CONRAD PA.

The conceptual basis for a new classification of the coccidia.

Int. J. Parasitol., 2002, 32, 595-616.

TARRY DW., BERNAL L., EDWARDS S.

Transmission of bovine virus diarrhea virus by blood feeding flies.

Vet. Rec., 1991, 128, 82-84.

TARRY DW., KIRKWOOD AC.,NANCY HEBERT C.

The response to “Black-Light” radiation of some common flies of economic importance.

Ent. Exp. et Appl., 1971, 14, 23-29.

TRAVERSA D., OTRANTO D., IORIO R., CARLUCCIO A., CONTRI A., PAOLETTI B., BARTOLOINI R., GIANGASPERO A.

Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions.

Med. Vet. Entomol., 2008, 22, 283-287.

TRONCY PM., ITARD J., MOREL PC.

Manual of tropical veterinary parasitology.

In: African animal trypanosomioses- The vectors of African trypanosomes/ French ed. Par ITARD J., 1981.C.A.B. International, 1989, 107-209.

TURELL M J.; KNUDSON G B.

Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taenirhynchus*).

Infect. Immun.; 1987, 55, 1859-1861.

VAFA HOMANN M., EMAMI SN., YMAN V., STENSTRÖM C., SONDÉN K., RAMSTRÖM H., KARLSSON M., ASGHAR M., FÄRNERT A.

Detection of Malaria Parasites After Treatment in Travelers: A 12-months Longitudinal Study and Statistical Modelling Analysis.

EBioMedicine., 2017, 25, 66-72.

VANDER WAAL KL., EZENWA V O.

Heterogeneity in pathogen transmission: mechanisms and methodology.

Funct. Ecol, 2016, 30, 1606-1622.

VANHOUDT A., PARDON B., DE SCHUTTER P., BOSSELER T., SARRE C., VERCRUYSSSE J. DEPREZ P.

First confirmed case of bovine besnoitiosis in an imported bull in Belgium.

Vlaams Diergeneeskd Tijdschr., 2015, 84, 2005-2011.

VEER V., PARASHAR BD., PRAKASH S.

Tabanid and muscoid haematophagous flies, vectors of trypanosomiasis or surra disease in wild animals and livestock in Nandankanan biological park, Bhubaneswar (Orissa, India).

Current Sci., 2002, 82, 5, 500-503.

VERMA SK., CERQUEIRA-CÉZAR CK., MURATA FHA., LOVALLO MJ., ROSENTHAL BM., DUBEY JP.

Bobcats (*Lynx rufus*) are natural definitive host of *Besnoitia darlingi*.

Vet. Parasitol., 2017, 248, 84-89.

VOGELSANG EG., GALLO P.

Globidium besnoiti (Marotel, 1912) y habronemosis cutanea en bovinos de Venezuela.

Rev. Med. Vet. Parasitol., Caracas., 1941, 3, 153-155.

WAAP H., NUNES T., CORTÉS H., LEITAO A., VAZ Y.

Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal.

Parasitol. Res., 2014, 113, 3703-3711.

WALLACE GD., FRENKEL JK.

Besnoitia species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae): recognition of cyclic transmission by cats.

Science, 1975, 188, 369-371.

WALL R., SHEARER D.

Veterinary Entomology, Arthropod Ectoparasites of Veterinary Importance.

Chapman & Hall: London., 1997, 439 p.

WALL R., SHEARER D.

Veterinary ectoparasites: biology, pathology and control.

Second edition blackwell science Ltd Osney mead Oxford Ox2 0EL 25 street, London., 2001, 304 P.

WEIDHAAS DE., HAILE DG.

A theoretical Model to Determine the Degree of Trapping Required for Insect Population Control.

Bull. Entomol. Soc. Am., 1978, 24, 18-20.

WHITE NJ, CHAPMAN D, WATT G.

The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1992, 86, 590-597.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.

Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2nd ed.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2016, 55 p.

YASAMEEN SG., ALI SR., LATIF B.

Longevity and Infectivity of *Trypanosoma evansi* Isolated from the Gut of the Stable Fly *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae).

Glob. J. Immunol. Allerg. Dis., 2014, 2, 45-50.

ZHU JJ., BERKEBILE DR., DUNLAP CA., ZHANG A., BOXLER D., TANGTRAKULWANICH K., BEHLE RW., BAXENDALE F., BREWER G.

Nepetalactones from essential oil of *Nepeta cataria* represent a stable fly feeding and oviposition repellent.

Med. Vet. Entomol., 2012, 26, 131-138.

ZHU JJ., ZENG XP., BERKEBILE D., DU HJ., TONG Y., QIAN K.

Efficacy and safety of catnip (*Nepeta cataria*) as a novel filth fly repellent.

Med. Vet. Entomol., 2009, 23, 209-216.

ZHU JJ., ZHANG QH., TAYLOR DB., FRIESEN KA..

Visual and olfactory enhancement of stable fly trapping.

Pest Manag. Sci., 2016, 72, 1765-1771.

ZUMPT F.

The Stomoxyine biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures.

Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1973, 175pp.

Abstract

Shukri SHARIF

Title: *Stomoxys calcitrans*: assessment of the role in the transmission of *Besnoitia besnoiti* and new methods of control.

Ph.D. thesis : INP de Toulouse : Parasitologie : 2018.

Abstract

The Stable fly, *Stomoxys calcitrans*, is a common and worldwide-distributed blood-feeding fly. It is the vector of numerous pathogens including *Besnoitia besnoiti*, a cyst-forming coccidian parasite of cattle. Vector competency of *S. calcitrans* for *B. besnoiti* remains poorly understood. We investigated here the persistence of bradyzoites and tachyzoites forms of *B. besnoiti* on mouthparts and in digestive tract of *S. calcitrans*. In experimental conditions, *B. besnoiti* proved to persist until two days in stable flies. The fast destruction of parasite within this vector suggests that mechanical transmission could occur a short time only after a contaminated blood meal. Moreover, we investigated the competence of stable flies to transmit immediately *B. besnoiti* bradyzoites and tachyzoites to susceptible rabbits after an interrupted blood meal on chronically infected cows (source of bradyzoites) or on a tachyzoite-contaminated blood meal. The results show that 300 *S. calcitrans* only were able to transmit virulent bradyzoites to rabbits which suffered from clinical signs of acute besnoitiosis and seroconverted. In the third part of this study, we examined sustainable methods as alternative to insecticides but efficient to control this pest. Seven different types of blue screens, with slight differences in their reflectance around 460 nm, were tested in order to evaluate their attractiveness for stable flies and to determine the factors associated with the efficiency of trapping (height of screens, east *versus* west side of blue screen, proximity of different hosts and manure). The results showed high attractiveness, high number of captures and very high selectivity of all tested screens, with a total number of 164692 stable flies during the study (24 days of capture, 4 blue screens per day, 8 hours per day). The results showed that the lower part of the blue screens caught the majority of stable flies, whereas the east orientation was the most attractive which caught up to 60 % of the total number captured of stable flies. Taking together, these results are highlighting the interest of these new devices in the future control of stable flies.

Keywords: cattle besnoitiosis, stable fly, mechanical vector, selective control