



UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI – UNIVERSITE MONTPELLIER 2

MASTER INTERNATIONAL D'ENTOMOLOGIE MEDICALE ET
VETERINAIRE
*INTERNATIONAL MASTER IN MEDICAL AND VETERINARY
ENTOMOLOGY*

Année 2008 – 2009

Rapport de stage : Variabilité génétique chez des populations sauvages et domestiques de *Triatoma infestans*, vecteur majeur de la maladie de Chagas en Bolivie

Projet de recherche : Bactéries symbiontes de *Triatoma infestans* et leur potentiel comme outils de lutte antivectorielle.

Présenté par : Nerida Nadia HUAMAN VALERO
Sous la direction de : Dr. S. F. BRENIERE – M. P. KENGNE
Laboratoire d'accueil : LIN-IRD Montpellier (France)

Président du Jury : Pr. G. DUVALLET
Membres du Jury : Dr. V. AGUEH
Dr. T. BALDET
Pr. N. SAKITI

Présenté le : 09 juin 2009
A : Institut Régional de Santé Publique, Ouidah, Bénin

RAP/MIE/06/03

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche du Master 2 qui a coûté des efforts et du dévouement pour réussir, a eu l'aide et la collaboration de nombreuses personnes que je remercie.

D'abord à mon encadrante Dr. Frédérique Brenière pour avoir défini l'échantillonnage et apporté son aide pour l'interprétation ultérieure des résultats ainsi que pour la rédaction du rapport du stage. Je remercie le Dr Pierre Kengne mon maître de stage pour son enseignement, orientation et conseils au tout long de ces 5 mois de pratique que j'ai passés auprès de lui et qui m'ont aidée à me former dans mes débuts en tant que chercheur. Je les remercie tous les deux pour leur patience et leur disponibilité, même dans ces moments difficiles.

Dr. François Noireau pour m'avoir donné l'occasion de faire ce Master en Entomologie Médicale et Vétérinaire, qui m'a permis d'enrichir et d'améliorer mes connaissances et de vivre des expériences inoubliables.

Dr. Didier Fontenille pour m'accueillir dans l'Unité de recherche 016 à Montpellier dans laquelle j'ai trouvé des personnes très dynamiques, aimables et sympathiques.

À Daniel Couret pour leur aide dans la préparation de la carte de la distribution des résultats.

À Cyrille Ndo doctorant pour sa remarquable collaboration dans l'analyse des microsattellites, et l'interprétation des résultats et à Philippe Boussès pour son aide dans la traduction de la première version française de mon rapport, je vous remercie beaucoup. À Luc Abate pour son aide et sa collaboration avec les manipulations de laboratoire, merci beaucoup d'avoir été à mes côtés.

Et à tous les membres de l'équipe de l'Unité 016 qui ont contribué indirectement à mon travail, à Nil Rahola pour les photos, à Gilbert Le Goff mille merci pour votre correction de la présentation orale, et vos précieux conseils ; et d'autres personnes qui ont contribué à mon travail, celles que j'ai rencontrées et partagées ce séjour à l'IRD.

Merci beaucoup.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
II. MATERIELS ET METHODES	5
1. Zones d'étude	5
2. Échantillonnage	5
2.1. Département de La Paz	5
2.2. Département de Cochabamba.....	5
3. Méthodes moléculaires d'analyse	6
3.1. Extraction d'ADN	6
3.2. Réaction d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR)	6
3.2.1. Principe de la PCR	6
3.2.2. Choix des marqueurs, amorces et conditions de la PCR	6
3.3. Séquençage de gènes mitochondriaux (COI, Cytb) et ribosomal (ITS2)	7
3.3.1. Purification des produits amplifiés	7
3.3.2. Réaction de séquence	7
3.3.3. Purification des réactions des séquences	7
3.3.3. Correction et analyse de séquences	7
3.4. Genotypage des microsatellites	8
3.4.1. Préparation des échantillons	8
3.4.2. Genotypage et analyse.....	8
3.4.3. Quelques tests	8
III. RESULTATS	9
1. Séquençages des gènes du Cytb, du COI et de l'ITS2.	9
1.1. Cytochrome b (Cytb)	9
1.1.1. Caractérisation des séquences du cytochrome b.....	1
1.1.2. Distribution des haplotypes en fonction des populations	1
1.1.3. Distances génétiques entre populations.....	1
1.2. Cytochrome Oxydase I (COI)	2
1.2.1. Caractérisation des séquences COI	2
1.2.2. Distribution des haplotypes en fonction des populations	2
1.2.3. Distances génétiques entre populations.....	3
1.3. Analyse de séquence d'ITS2	3
3. Etude de la structure génétique de <i>T. infestans</i> avec les marqueurs microsatellites. 3	3
IV. DISCUSSION	5
1. Structuration des populations à l'aide des gènes Cytb, COI et ITS2	5
2. Population domestiques et sylvestres	7
3. Les marqueurs microsatellites	7
3.1. Diversité génétique des populations de <i>T. infestans</i>	7
3.2. Structure génétique des populations de <i>T. infestans</i>	7
4. Marqueurs moléculaires	8
VI. CONCLUSION	8
VI. BIBLIOGRAPHIE	9
PROJET DE RECHERCHE	A
I. INTRODUCTION	A
II. MÉTHODOLOGIE	B
III. RESULTATS ATTENDUS	D
IV. PERSPECTIVES	E
V I. BIBLIOGRAPHIE	E

RÉSUMÉ

La maladie de Chagas est une infection due à *Trypanosoma cruzi*, transmise par des insectes hématophages dont le principal vecteur est *Triatoma infestans*. La mise en place de nouvelles stratégies de lutte contre ces vecteurs en cas d'échecs dans certaines régions, nécessite une meilleure connaissance de l'écologie et de la biologie, de même que de la génétique de ces populations de vecteurs permettant de mieux comprendre les processus de domestication. Cette étude a pour objectif d'analyser les séquences de gènes à vitesse d'évolution différente afin d'identifier les haplotypes et allèles spécifiques des populations sauvages et domestiques. Les 8 populations comptant au total 215 spécimens de *T. infestans* utilisés dans ce travail, ont été collectées dans l'écorégion des «Bosques secos interandinos» des départements de Cochabamba et de La Paz en milieu sylvestre et domestique. Après extraction de l'ADN, deux gènes mitochondriaux (Cytb et COI), un gène ribosomal (ITS2) et des marqueurs microsatellites ont été séquencés, génotypés et analysés. L'analyse des séquences d'ITS2 (450bp) n'a révélé, comme attendu pour un marqueur de différenciation inter-espèces, aucun polymorphisme nucléotidique (SNP) entre les différentes populations. En revanche, l'analyse des séquences du Cytb (445bp) et du COI (720bp) a montré un niveau de variabilité moins élevé que précédemment permettant de définir seulement trois et deux haplotypes respectivement, dont un décrit précédemment comme l'haplotype ancestral. En considérant globalement toutes les populations sylvestres et domestiques, nos résultats ne mettent pas en évidence de structuration liée à ces deux écotopes. La micro-structuration définie par les microsatellites, montre que chaque population constitue une unité panmictique en équilibre d'HW à flux de gènes restreints. En conclusion, tous les marqueurs montrent une forte tendance à la structuration géographique des populations, indiquant que cette espèce présente une faible dispersion et par conséquent, la probabilité d'infestation des zones domestiques venant de milieu sauvage est très faible.

Mots-clés: *Triatoma infestans*, COI, Cytb, ITS2, microsatellites, ré-infestation

ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, transmitted by a hematophagous insect whose the most important is *Triatoma infestans*. The implementation of new strategies to fight against the vector in case of failures in some regions, requires a better understanding of ecology and biology, but also populations genetics to understand the processes of domestication. This study aims to analyze the gene sequences with different rate of evolution to identify specific alleles and haplotypes of wild and domestic populations. The 8 populations of 215 *T. infestans* specimens used in this work were collected in the ecoregion of "Bosques secos Interandinos" in the wild and domestic zones of Cochabamba and La Paz departments. After DNA extraction, two mitochondrial genes (Cytb and COI), a ribosomal gene (ITS2) and microsatellite markers have been sequenced, genotyped and analyzed. Analysis of ITS2 sequence (450bp) had revealed no nucleotide polymorphism between populations as expected for interspecies differentiation markers. However, analysis of Cytb (445bp) and COI (720bp) sequences showed a lower level of variability that defines respectively only three and two haplotypes. One of them was previously described as the ancestral haplotype. Considering all populations globally, our results do not reveal population structure linked to both ecotopes (wild and domestic). The structure defined by the microsatellites, show that each population represents a panmictic unit in HW equilibrium with restricted gene flow. In conclusion, all markers show a strong tendency to a geographical populations structure, indicating that this species has a low dispersion capacity; therefore, the likelihood of domestic area infestation from wilderness is very low.

Key words: *Triatoma infestans*, COI, Cytb, ITS2, microsatellites, re-infestation

I. INTRODUCTION

Triatoma infestans (Heteroptera, Reduviidae, sous famille Triatominae) est le principal vecteur (Fig. 1) de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), parasite protozoaire, agent de la maladie de Chagas, dans les pays du cône sud de l'Amérique Latine : l'Argentine, la Bolivie, le Brésil, le Chili, le Paraguay et l'Uruguay. Endémique dans tous les pays d'Amérique Latine où différentes espèces de triatomes sont vectrices, la maladie de Chagas est principalement associée à la pauvreté et représente un poids socio économique lourd dû à sa chronicité. Environ 90 millions de personnes vivent dans des régions où le risque de transmission vectorielle existe et la lutte contre les vecteurs est pour le moment la seule forme efficace d'interrompre la transmission (WHO, 1991).

Comme la transmission a lieu dans la grande majorité des cas dans la maison, le phénomène fondamental qui conditionne le succès de la transmission est l'adaptation des triatomes à des écotopes artificiels à l'intérieur de la maison comme à l'extérieur (le périodomicile) souvent propice au développement de grandes colonies d'insectes. Le degré d'adaptation est variable d'une espèce à l'autre et dépend entre autre de la disponibilité alimentaire et du degré d'anthropophilie (Días, 1988).

Les triatomes sont hématoiphages et peuvent se nourrir sur de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux. En milieu domestique ils s'alimentent couramment sur l'homme, des mammifères domestiques (chiens, bétail) et les poulets (Wisnivesky-Colli, 1987 ; Gürtler *et al.*, 1997). *T. infestans* est une espèce qui se caractérise par son haut degré d'adaptation à l'habitat humain (Rabinovich, 1972) qui lui a permis, au cours du temps, de coloniser de nouvelles régions en s'installant exclusivement à l'intérieur des maisons et dans le périodomicile (Avalos, 1965). Les populations peuvent atteindre de très fortes densités dans les maisons qui n'ont pas été traitées par des insecticides en maintenant la même taille de la population d'année en année. Cette espèce peut compléter deux générations par an au Brésil (Schofield, 1980) et une seule dans d'autres régions à cause du froid de l'hiver (Gorla et Schofield, 1985). En général, ces populations de *T. infestans* dispersées par les hommes, restent exclusivement intradomiciliaires, incapables de survivre à l'extérieur de la maison (périodomicile), à l'exception de certaines régions du nord de l'Argentine, du Paraguay, de l'Uruguay et du sud du Brésil qui présentent des similitudes climatiques avec les régions du centre de la Bolivie lieux d'origine putative de ces populations (Gorla, 2002). Au niveau épidémiologique, la dispersion de *T. infestans* a joué un rôle primordial. Ces populations sont des vecteurs efficaces de *T. cruzi*. Elles ont été les responsables de la dispersion de clones parasites, particulièrement virulents dans les pays du cône sud, associés à des pathologies



Triatoma infestans (Klug 1834)

du tube digestif (méga colon, méga œsophage) et cardiaques. Toutefois, leur distribution exclusivement liée à l'habitat et leurs caractéristiques intrinsèques les rend vulnérables aux insecticides organochlorés et des pyréthriinoïdes.

La Bolivie est un pays de forte endémie où les indices de prévalence de la maladie de Chagas dans la population humaine et des taux d'infestation intra domiciliaire par *T. infestans* atteignent les niveaux les plus élevés. La zone d'endémie couvre 55% du pays et en 1985, plus d'un million de personnes était infectées par *T. cruzi* (WHO, 1991). Les études de génétique des populations indiquent que *T. infestans* a pour origine le centre de la Bolivie (Dujardin *et al.*, 1998), seul pays où l'existence de populations sauvages de *T. infestans* a été largement documenté (Noireau *et al.*, 2005). Les colonies ont d'abord été signalées dans les collines de pierres, dans la banlieue de Cochabamba (1700m), une importante ville andine (Torrico, 1946) au centre du pays. Par la suite quelques foyers ont été identifiés dans d'autres régions de Bolivie mais la distribution géographique des populations de *T. infestans* sylvestre reste à mieux définir sachant que des recherches préliminaires identifient des foyers dans le nord de l'Argentine et au Chili (Bacigalupo *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2009). D'après certains auteurs, il semblerait que la dérive génétique et d'autres facteurs (Schofield *et al.*, 1999) ont abouti à un début de spéciation entre les populations initialement sauvages et les domestiques étant donné qu'il n'existe pas de preuve de flux de gènes entre elles et pas non plus de colonisation de l'habitat par les populations sauvages suite à l'élimination des domestiques par pulvérisation insecticide (Dujardin *et al.* 1996, 1997).

Dans les pays du Cône Sud, *T. infestans* peut être considéré comme étant récemment importé et généralement génétiquement peu diversifié à cause d'une série d'effets fondateurs, de la dérive génétique et par conséquent ayant peu de chances de développer de la résistance aux insecticides (Dujardin *et al.*, 1998). En conséquence, il était raisonnablement d'envisager dans la plupart des régions, leur élimination par traitement insecticide de l'habitat. Ainsi, en 1991, un programme de santé publique dans les pays du Cône Sud a été lancé par l'Organisation Mondiale de la Santé afin d'éliminer les populations de *T. infestans* (Schofield et Dias, 1998), par pulvérisation des maisons avec des insecticides (Schmunis *et al.*, 1996).

Il a été observé que, après un traitement massif des zones domestiques et péri-domestiques dans les communautés rurales avec des pyréthriinoïdes, les maisons ont tendance à connaître une ré-infestation précoce (Dias, 1963, Pinchin *et al.* 1980, Gualtieri *et al.*, 1984, Oliveira Filho *et al.*, 1986; Paulone *et al.*, 1988; Chuit *et al.*, 1992; Gürtler *et al.*, 1994) si des actions de surveillance entomologique et d'intervention immédiate ne sont pas mises en place afin de maintenir l'efficacité du traitement initial (Segura *et al.*, 1999).

La détection de l'origine précise de la ré-infestation est une information extrêmement précieuse pour orienter les mesures de vigilance à mettre en place pour contrôler durablement la transmission vectorielle (Dujardin *et al.*, 1998). Dans le cas de *T. infestans*, dans certaines régions, la ré-émergence de ce vecteur dans les maisons traitées pourrait être due à une nouvelle infestation par des populations provenant de zones sauvages à proximité. Dernièrement, en Argentine, des travaux ont montré que plusieurs années après les traitements aux pyréthrinoïdes des insectes probablement résistants aux insecticides étaient retrouvés dans les périodomiciles (Gürtler *et al.*, 2003).

Les facteurs combinés de densité d'hôtes nourriciers potentiels, de type d'habitat et d'organisation du milieu adjacent à la maison (le périodomicile) conditionnent la colonisation par les populations ré-infestantes quelles soient résiduelles où venues de l'extérieur.

De manière générale, les triatomes extra domestiques représentent un risque épidémiologique qui est fonction de leur capacité à remplacer les populations domestiques une fois que cette niche écologique a été libérée (Wisnivesky-Colli, 1993). Cependant, la lutte contre les triatomes en milieu ouvert comme le périodomicile pose de nombreuses difficultés qui abaissent l'efficacité des traitements insecticides (Dias, 1987, Rocha et Silva, 1979). Par conséquent, l'étude du périodomicile et de ses composantes prend de plus en plus d'importance pour mieux comprendre quels sont les déterminants associés à sa colonisation.

Les outils génétiques, principalement les techniques analysant les séquences d'ADN, sont capables de fournir des informations qui aident à la compréhension de la capacité de domiciliation des espèces de triatomes (Bargues *et al.*, 2002). Les études de génétique des populations sont prometteuses et indispensables pour orienter les méthodes de contrôle des vecteurs et contribuer à l'évaluation des risques de dispersion de la transmission vectorielle. L'ensemble de ces données nous amènent à approfondir des études basées sur la génétique des populations de manière à établir s'il existe des variations polymorphiques entre les individus sylvestres et les domestiques.

Ainsi l'objectif de ce travail est d'analyser la variabilité génétique de *Triatoma infestans* dans deux régions de forte endémicité de la maladie de Chagas en Bolivie comme sont les départements de La Paz et de Cochabamba. Les marqueurs génétiques choisis sont des gènes mitochondriaux, ribosomiaux et les marqueurs microsatellites. Leur analyse permettra d'identifier des haplotypes et des allèles spécifiques entre les populations sylvestres et domestiques afin de mieux comprendre le processus de re-infestation dans ces zones qui ont été préalablement traitées.

L'étude de la variabilité génétique des populations vectorielles et leur distribution dans l'espace peut donner une information significative qui permette de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie. En effet, les forces qui conditionnent les structures génétiques des vecteurs et leur évolution jouent également un rôle sur la capacité à transmettre l'agent pathogène et à s'adapter aux pressions environnementales.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Zones d'étude

La collecte des triatomes a été faite dans la région de « Bosques secos interandinos » qui s'étend tout au long de la chaîne andine orientale jusqu'au sud du pays. Cette écorégion qui est constituée de beaucoup de forêts sèches dégradées traverse les départements de La Paz, Cochabamba, Chuquisaca et Tarija en Bolivie. La carte 1 situe les différentes zones de collecte dans les départements de La Paz et de Cochabamba (voir chapitre résultats).

2. Échantillonnage

2.1. Département de La Paz

Dans le département de La Paz, les insectes proviennent de deux vallées "Rio de La Paz" et "Rio Luribay" qui sont sous contrôle vectoriel depuis 2003. Ces vallées présentent des problèmes de ré-infestation par *T. infestans*, après traitements aux insecticides. Les spécimens des zones péri-domiciliaires ont été capturés par les agents du Programme National Chagas PNCH qui effectuent régulièrement des recherches actives au sein des communautés. Les insectes proviennent de 2 communautés dans la zone "Rio Luribay" (COM 02 et COM 17) et 4 dans la zone "Rio de La Paz" (COM 06, COM 07, COM 13 COM14).

Les populations sauvages ont été collectées avec des pièges attractifs décrits par Noireau *et al.* (2000) à une distance qui varie entre 50 à 500 m des habitations les plus proches. Dans la vallée du Rio de La Paz, les échantillons proviennent de deux zones, l'une autour du village de Tahuapalca (TUN 002, RUI 001 AGP et 001) et l'autre en amont dans la vallée, un champ de figes de barbarie situé à la sortie du village de Huyhuasi (TUN 001). Dans la vallée du "Rio Luribay" les triatomines proviennent d'un seul site (CAC 003) qui est un espace rocailleux avec des épineux et quelques plants de figes de barbarie à 50 m de deux maisons isolées du village de Palca.

2.2. Département de Cochabamba

Dans le département de Cochabamba les populations péri-domiciliaires proviennent d'un quartier périphérique de la ville de Cochabamba (Cbba), où les triatomes ont été collectés par une recherche active des agents du PNCH.

Les populations sylvestres ont été capturées par pièges attractifs (Noireau *et al.*, 2000) dans 3 endroits: dans des affleurements rocheux situés sur une colline dans un quartier périphérique de la ville de Cochabamba où se développe une nouvelle urbanisation (code 20 OCT), sur les collines proches du village de Cotapachi, zone rurale (BSIA 14) à 10 km de la ville de Cochabamba et, une zone rocailleuse située à proximité (2 km) du village de Mataral (Province d'Aiquile) situé à environ 140 km de la ville de Cochabamba (MAT).

Tous les insectes collectés en milieu péri-domestique ont été utilisés pour les analyses. Par contre, pour les sites sylvestres, un sous échantillonnage a été réalisé en prenant soin de sélectionner des insectes issus de pièges différents.

3. Méthodes moléculaires d'analyse

3.1. Extraction d'ADN

Le matériel biologique utilisé pour l'extraction ADN est constitué des pattes de *T. infestans* conservées dans l'alcool à 70% pour le transport jusqu'au laboratoire. L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant la méthode de CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) proposée par Edwards JK, (1998) et légèrement modifiée. Après extraction, les échantillons ont été dilués dans 20 µl d'H₂O stérile et stockés à -20°C. La qualité de l'ADN extrait a été visualisée par électrophorèse et l'ADN quantifié par lecture de la densité optique à 260 nm sous UV au spectrophotomètre.

3.2. Réaction d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR)

3.2.1. Principe de la PCR

La « Polymerase Chain Reaction » (PCR) est une méthode *in vitro* d'amplification de séquences spécifiques d'ADN. Le principe a été décrit en 1983 par Mullis. Elle est composée de 3 phases: (i) Séparation des brins d'ADN par chauffage entre 90°C et 95°C, (ii) fixation des amorces sur l'ADN monobrin à la température d'hybridation requise (entre 55°C et 68°C, et (iii) synthèse du brin complémentaire à partir de l'amorce par la Taq polymérase en utilisant les nucléotides (dNTP), ce qui permet de doubler l'ADN cible à 72°C. Chaque cycle ainsi répété permet d'aboutir à l'ADN cible multiplié exponentiellement par 2ⁿ (n= nombre de cycles).

3.2.2. Choix des marqueurs, amorces et conditions de la PCR

Dans cette étude, 4 marqueurs ont été sélectionnés. Un gène ribosomal (ITS2), deux gènes mitochondriaux, le cytochrome oxydase I (COI) et le cytochrome b (Cytb) marqueurs recommandés pour l'étude de la génétique des *Triatominae* au niveau espèces, sous-espèces et intra espèce (Mas-Coma et Bargues, 2009). L'analyse de marqueurs microsatellites (Garcia

et al., (2004) serait plus adaptée pour discriminer en intra espèce des populations et leur relation génétique ainsi que l'analyse des flux de gènes.

Les amorces et les conditions de la PCR utilisées pour l'amplification du COI, Cytb et ITS2 ont été désignées à partir des travaux de Colombo *et al.*, (2005), Monteiro *et al.*, (1999) et Marcilla *et al.*, (2001). Ces amorces ont été synthétisées chez Eurogentec SA (Belgique). Les 8 paires d'amorces utilisées pour l'amplification des loci microsatellites ainsi que les conditions de la PCR ont été choisies en raison de la qualité des allèles qu'elles ont produites antérieurement (Garcia *et al.*, 2004 et Richer *et al.*, 2006). Pour l'analyse de ces marqueurs microsatellites, un des couples d'amorces est marqué au fluorochrome. Après la PCR, les produits amplifiés des gènes et des loci microsatellite ont été contrôlés sur un gel d'agarose à 1,5% et photographiés sous rayons ultra violets et traités comme ci-dessous.

3.3. Séquençage de gènes mitochondriaux (COI, Cytb) et ribosomal (ITS2)

3.3.1. Purification des produits amplifiés

Après la PCR, les produits amplifiés sont purifiés avant le séquençage par la méthode AMPure® (Beckman – Coulter, France).

3.3.2. Réaction de séquence

Le principe de séquençage est basé sur la méthode de Sanger. Celle-ci repose sur la synthèse d'un brin complémentaire à la matrice simple-brin avec une seule amorce. La polymérase recopie la matrice et s'arrête après incorporation d'un didésoxynucléotide (ddNTP) portant un fluorochrome et ne possédant pas l'hydroxyle en 3'. La réaction de séquence permet ainsi d'obtenir de nombreux fragments différant d'une base. Lorsqu'on va faire migrer les fragments d'ADN fluorescent à travers un capillaire, ils vont se séparer en fonction de leur taille. Les signaux sont collectés et analysés par un ordinateur sur un séquenceur 3130XL d'Applied Biosystems.

3.3.3. Purification des réactions des séquences

Ces fragments sont purifiés par la méthode CleanSeq® (Agencourt-Beckman, France) avant séquençage.

3.3.3. Correction et analyse de séquences

Les séquences obtenues ont été corrigées à l'aide du logiciel Seq Scape 3.1 (Applied Biosystems, France) puis exportées pour l'alignement et l'analyse réalisée au moyen des logiciels MEGA v. 4 (Kumar *et al.*, 2008) et DnaSP v. 4.10.9. (Librado et Rozas *et al.*, 2009) afin de déterminer les distances et la différenciation génétiques entre les populations considérées.

3.4. Genotypage des microsatellites

3.4.1. Préparation des échantillons

Cette partie consiste à déterminer la taille des fragments d'ADN de 8 loci microsatellites amplifiés selon le protocole de Garcia *et al.*, (2004). Ainsi, pour un échantillon donné, un mélange a été préparé à partir de 0,15µl de marqueur de taille GeneScan -500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, France) et 9,85µl de Hi-Di formamide (Applied Biosystems, France) et 1µl de produits PCR marqués et dilués au 1/200.

3.4.2. Genotypage et analyse

Le mélange est dénaturé et déposé sur un séquenceur automatique 3130XL (Applied Biosystems, France). Les tailles des allèles ont été obtenues à l'aide du logiciel GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems, France). Des paramètres de la variabilité génétique (polymorphisme de loci et hétérozygotie) ont été calculés et les principaux tests décrits ci-dessus ont été effectués à l'aide des logiciels Genepop (v3.4) et Fstat (v2.9.3.2).

3.4.3. Quelques tests

- Test de conformité à l'équilibre d'Hardy-Weinberg

Les données de fréquences alléliques et génotypiques de chaque population ont été analysées afin de vérifier leur conformité à l'équilibre d'Hardy-Weinberg supposant l'hypothèse nulle « H0 union aléatoire des gamètes ». Les fréquences génotypiques observées ont donc été comparées aux fréquences génotypiques estimées à partir des fréquences alléliques. Pour chaque test, plusieurs valeurs ont été fournies notamment la probabilité « P-value » et l'indice F_{IS} qui évalue l'écart de la population par rapport à la panmixie ($F_{IS} = 1 - H_o/H_e$) selon la méthode de Weir et Cockerham (1984).

-Test de déséquilibre de liaison

Ce test évalue l'indépendance entre locus. L'hypothèse nulle est: «le génotype à un locus est indépendant du génotype à un autre locus». Un test de probabilité (méthode de Fisher) a été réalisé pour chaque paire de locus à travers toutes les populations.

-Test de différenciation des populations

Ce test est basé sur la distribution des allèles dans les différentes populations, l'hypothèse nulle est : « la distribution allélique est identique entre les populations ». L'analyse de la différenciation génétique entre différentes populations a été réalisée en calculant les valeurs de F_{ST} selon la méthode de Weir et Cockerham (1984). Au cours des analyses, le niveau de significativité des tests multiples a été ajusté selon la méthode de Bonferroni.

III. RESULTATS

1. Séquençages des gènes du Cytb, du COI et de l'ITS2.

Le tableau 6 résume la distribution des haplotypes (Carte 1) obtenus pour les gènes du cytochrome b et du cytochrome oxidase I. Les triatomés ont été capturés dans les départements de La Paz et de Cochabamba (écorégion de « Bosques Secos Interandinos »). Au total, les séquences ont été déterminées à partir de 215 échantillons d'ADN de pattes de *T. infestans* dont 51 domestiques et 64 sylvestres du département de La Paz et 30 domestiques et 70 sylvestres de celui de Cochabamba.

1.1. Cytochrome b (Cytb)

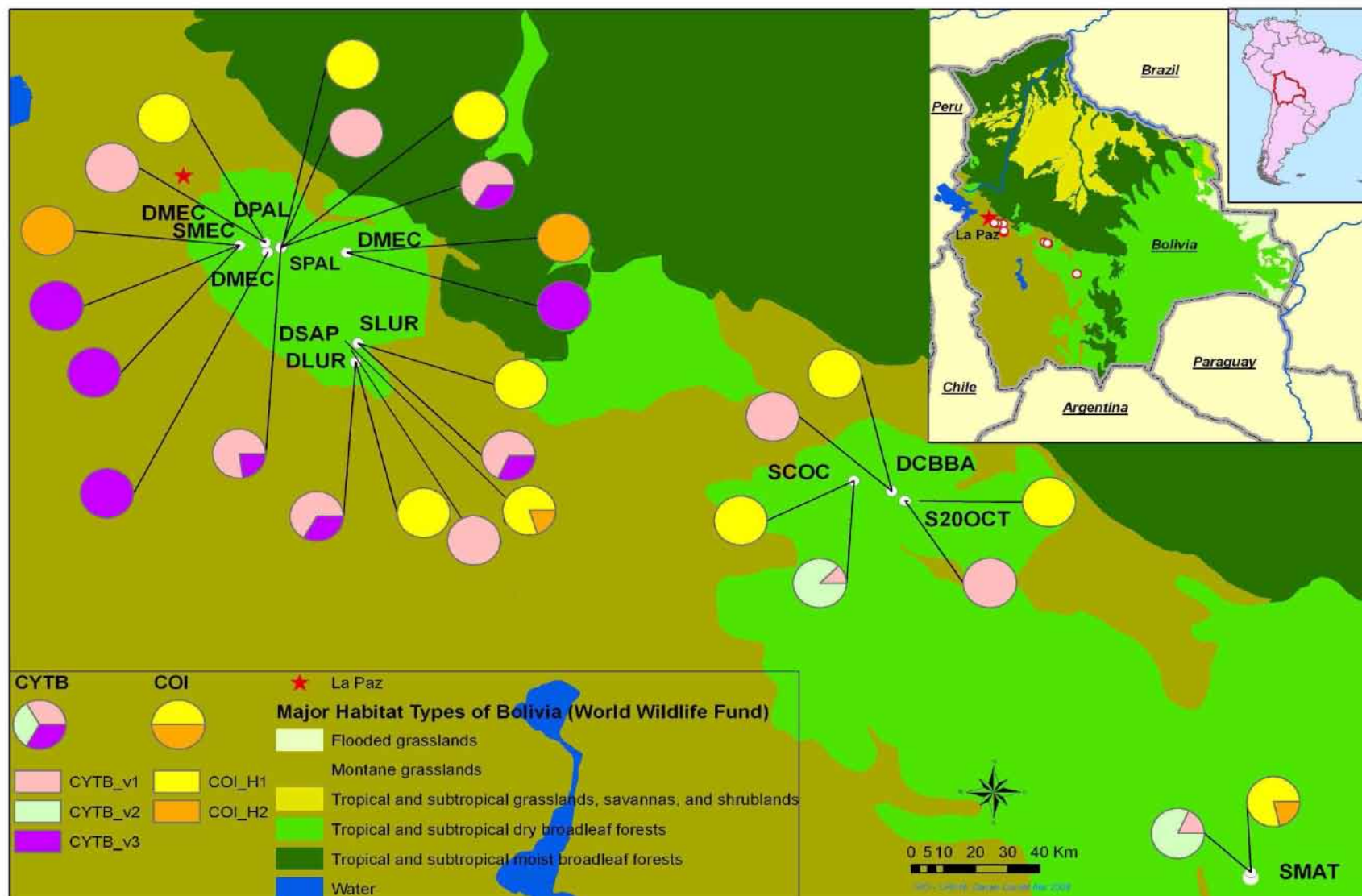
La taille des produits d'amplification est semblable (Carte 1) à celle décrite antérieurement par Giordano *et al.*, (2005) et Richer *et al.*, (2007) et un fragment unique a été observé pour tous les échantillons. Après séquençage, l'alignement a été résolu sur une longueur de 445 pb incluant 151 échantillons (Tableau 1).

Tableau 1: Distribution des haplotypes déterminés après séquençage du Cytb et du COI, au sein des populations.

	Vallées	Municipalité	Code de la zone		CYTB			T*	COI		T*
					H1	H2	H3		H1	H2	
LA PAZ	Rio Luribay	LURIBAY	COM 017	DLUR	4	0	2	6	6	0	6
		SAPAHAQUI	COM 002	DSAP	7	0	0	7	4	1	5
		LURIBAY	CAC 003	SLUR	13	0	6	19	16	0	16
	Ro La Paz	MECAPACA	COM 013	DMEC	0	0	1	1	0	0	0
			COM 014		0	0	2	2	0	0	0
		MECAPACA	COM 006	0	0	9	9	0	14	14	
		PALCA	COM 007	DPAL	4	0	0	4	5	0	5
		PALCA	RUI 001	SPAL	4	0	2	6	4	0	4
			AGP 001		2	0	0	2	0	0	0
		PALCA	TUN 002	10	0	3	13	5	0	5	
MECAPACA	TUN 001	SMEC	0	0	11	11	0	10	10		
COCHABAMBA	COCHABAMBA		20-oct	S20OCT	21	0	0	21	31	0	31
	AIQUILE		MAT	SMAT	2	9	0	11	11	3	14
	QUILLACOLLO		BSIA 14	SCOC	3	21	0	24	20	0	20
	COCHABAMBA		CBBA	DCBBA	15	0	0	15	18	0	18
Total					85	30	36	151	120	28	148

* Nombre total d'insectes

Carte 1 : Distribution des haplotypes par zone d'échantillonnage



1.1.1. Caractérisation des séquences du cytochrome b

L'alignement des séquences et l'analyse à l'aide du programme MEGA v.4.1 et DnaSp v.4.0 a permis d'identifier 3 haplotypes (Tableau 1) incluant 14 sites variables qui sont tous partagés par au moins deux insectes (mutations parcimonieusement informatives). La recherche en banque de séquences (www.ncbi.nih.gov) a permis d'identifier les 2 haplotypes H1, H2 qui correspondent respectivement à HC (AY702020), HD (AY702021); ces deux haplotypes présentent 100% d'identité avec les séquences déposées en banque et un nouvel haplotype H3 identifié. Par ailleurs, la traduction en protéine des séquences d'ADN montrent que toutes les mutations sont silencieuses : les séquences codent pour la même séquence protéique quelque soit l'haplotype.

1.1.2. Distribution des haplotypes en fonction des populations

Sur le total de l'échantillonnage, l'haplotype H1 est majoritaire (56,3%). Dans le département de La Paz, 2 des 3 haplotypes (H1 et H3) sont identifiés alors que dans le département de Cochabamba, l'haplotype H3 est absent et H1 et H2 ont été identifiés. De façon générale, dans le département de La Paz, H1 et H3 sont présents dans les villages (populations domestiques) comme en milieu sylvestre. La distribution détaillée de ces haplotypes tend à montrer une certaine structuration spatiale puisque dans la vallée du Rio Luribay, les deux haplotypes sont présents dans les sites COM 017 et CAC 003 qui sont peu éloignés l'un de l'autre (environ 10 km) alors que seul l'haplotype H1 est présent dans COM 002, village située dans une vallée adjacente. On observe aussi une certaine structuration spatiale dans la vallée du Rio La Paz puisqu'un seul haplotype (H3) est détecté dans les sites TUN 001, COM 013 et COM 014 COM 006 qui sont également séparés que de quelques km. Les deux haplotypes (H1 et H3) sont observés plus en aval dans la vallée dans les sites RUI 001 et TUN 002 qui sont tous les deux à proximité du même village de Tahuapalca.

Dans le département de Cochabamba l'haplotype H3 n'est pas identifié. La distribution des deux autres haplotypes marque aussi une structuration géographique plutôt qu'une structuration entre écotopes car l'haplotype H1 est le seul haplotype identifié chez les triatomes capturés dans les maisons d'un quartier périphérique de Cochabamba (CBBA) et dans des affleurements rocheux de la même zone (20OCT) alors que le deuxième haplotype (H2) est présent en même temps que H1 dans les sites de Quillacollo BSIA14 et Mataral MAT éloignés respectivement de 10 et 150 km du précédent.

1.1.3. Distances génétiques entre populations

Les valeurs de distance génétique (D) entre les populations comparées 2 à 2 varient entre 0,001 et 0,035 (Tableau 2). Les populations sylvestres (TUN 001) et domestiques

(COM 013 et COM 014) de Mecapaca présentent la distance la plus élevée aux autres populations variant de 0,027 à 0,035 et sont semblables entre elles puisqu'elles partagent le même haplotype H1.

Tableau 2: Distance génétique (sous la diagonale) obtenue par comparaison 2 par 2 des populations et les erreurs standard (au dessus de la diagonale) du Cytb

Village	SLUR	DLUR	DMEC	SMEC	SPAL	DPAL	DSAP	S2OCT	DCBBA	SCOC	SMAT
SLUR		0,004	0,006	0,006	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004
DLUR	0,015		0,006	0,006	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004
DMEC	0,024	0,024		0,000	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
SMEC	0,024	0,024	0,000		0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
SPAL	0,014	0,014	0,027	0,027		0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003
DPAL	0,011	0,012	0,035	0,035	0,008		0,000	0,000	0,000	0,003	0,003
DSAP	0,012	0,012	0,035	0,035	0,009	0,001		0,000	0,000	0,003	0,003
S2OCT	0,011	0,012	0,035	0,035	0,008	0,000	0,001		0,000	0,003	0,003
DCBBA	0,011	0,012	0,035	0,035	0,008	0,000	0,001	0,000		0,003	0,003
SCOC	0,014	0,015	0,035	0,035	0,012	0,005	0,004	0,005	0,005		0,001
SMAT	0,014	0,015	0,035	0,035	0,012	0,004	0,004	0,004	0,004	0,001	

1.2. Cytochrome Oxydase I (COI)

L'ADN du COI a été amplifié par PCR pour 148 échantillons (Tableau 1). Les produits d'amplification obtenus sont d'environ 800 pb et 720 pb ont été retenus pour l'analyse des séquences.

1.2.1. Caractérisation des séquences COI

L'alignement des séquences à l'aide du programme MEGA (v4.1) a permis de détecter 83 sites variables tous parcimonieux et d'identifier 2 haplotypes (Tableau 1). Le premier haplotype (H1) présente 100% d'identité avec l'haplotype HC de *T. infestans* déposé dans la banque de gène par Cortez *et al.*, (2007). Le deuxième haplotype non décrit antérieurement présente une forte ressemblance (87% d'identité) avec *Triatoma sordida*, séquence déposée par Garcia et Powell (1998) alors qu'il existe 88% d'identité entre les deux haplotypes H1 et H2. On a pu noter 97% de similitude entre la séquence de *T. sordida Bra.* et *T. sordida Arg.*

1.2.2. Distribution des haplotypes en fonction des populations

L'haplotype H1 est largement majoritaire (81,1%) et se distribue dans les deux départements chez des populations sylvestres et domestiques. L'haplotype H2 n'est détecté que chez certaines populations et confirme en partie la structuration spatiale détectée par l'étude du cytochrome b. En effet, dans le département de La Paz, il différencie les populations TUN 001 et COM 006 des autres populations où cet haplotype n'est identifié que

chez un seul individu (COM 002). De même, dans le département de Cochabamba, l'haplotype H2 n'est détecté que dans la population de Mataral (MAT) alors qu'il est absent dans les autres (Tableau 1).

1.2.3. Distances génétiques entre populations

Les valeurs de distance génétique entre populations varient entre 0,000 et 0,18 (Tableau 3). De même que pour le cytochrome b, les populations de Mecapaca (TUN 001 et COM 006) sont celles qui présentent les plus fortes distances aux autres populations.

Tableau 3: Distance génétique (sous la diagonale) obtenue par comparaison 2 par 2 des populations et les erreurs standard (au dessus de la diagonale) du COI.

village	SMAT	DCBBA	S20OCT	DPAL	SCOC	SPAL	SLUR	DLUR	DSAP	DMEC	SMEC
SMAT		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,005	0,023	0,023
DCBBA	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,005	0,023	0,023
S20OCT	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,005	0,023	0,023
DPAL	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,004	0,000	0,005	0,023	0,023
SCOC	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,004	0,000	0,005	0,023	0,023
SPAL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,004	0,000	0,005	0,023	0,023
SLUR	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029		0,004	0,007	0,019	0,019
DLUR	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029		0,005	0,023	0,023
DSAP	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037	0,054	0,037		0,018	0,018
DMEC	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183	0,154	0,183	0,146		0,000
SMEC	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183	0,154	0,183	0,146	0,000	

1.3. Analyse de séquence d'ITS2

Un fragment de 800 bp a été obtenu après amplification. Une séquence partielle exploitable de 450 bp a été prise en compte pour l'analyse de 102 échantillons. L'analyse de séquence n'a mis en évidence aucun polymorphisme.

3. Etude de la structure génétique de *T. infestans* avec les marqueurs microsatellites

Huit loci microsatellite (Garcia *et al.*, 2004) ont été utilisés pour estimer les niveaux de flux de gènes entre 9 populations de *T. infestans*, dont 3 domestiques et 6 sylvestres, collectées dans 4 localités distantes de 50 à 140 km et situées entre 1730 m et 3070 m d'altitude. Les loci ont été considérés comme indépendants en accord avec l'étude de Richer *et al.* (2003). Trois loci (C02, E12 et G03) sur les huit ont été exclus des analyses parce qu'ils n'ont pas été amplifiés avec succès dans toutes les populations. Les autres 5 loci, à l'exception d'A02 à Mecapaca TUN001 et Palca TUN002, étaient polymorphes avec une richesse allélique sur toutes les populations variant de 2,259 pour le locus A02 à 4,584 pour le locus F03. La diversité génétique (richesse allélique et hétérozygotie attendue) était faible et non comparable entre les populations ($P < 0,05$). Elle était plus élevée dans les populations

de Cochabamba et de Mataral, et plus faible mais similaire entre les populations de La Paz et Luribay.

Lorsque les populations ont été groupées comme appartenant à une seule unité panmictique, tous les loci ont montré une déviation à l'équilibre de Hardy-Weinberg, associée à des valeurs de Fis (Tableau 4) positives suggérant un déficit en hétérozygotes. Ces déficits en hétérozygotes étaient tous significatifs après application de la correction de Bonferroni. Le même schéma a été observé lorsque les populations ont été groupées soit par zones géographiques soit par écotopes (domestique ou sylvestre). Lorsque chaque échantillon a été considéré comme une population à part, l'équilibre de Hardy-Weinberg a été restaurée à tous les loci et dans toutes les populations sauf au locus A02. Le fait que ce locus ne soit pas en équilibre dans toutes les populations suggère qu'il serait sous sélection ou alors que les allèles nuls y sont présents.

Tableau 4 : Estimation de la Richesse allélique et des valeurs de Fis de toutes les populations

Locus		CBBA	20 OCT	CAC 004	COM 17	CAC 003	TUN 001	TUN 002	COM 006	Mataral	Toutes les populations
C09	Ra	3,557	2,927	2,882	2,796	1,987	2,000	2,569	2,000	5,383	2,900
	Ha	0,618	0,532	0,598	0,353	0,326	0,464	0,280	0,478	0,802	0,495
	Fis	0,293*	0,434*	0,238	-0,143	0,269	-0,082	-0,103	-0,565*	0,311**	0,020
D09	Ra	5,568	7,417	3,203	4,400	2,980	2,000	2,974	2,000	6,000	4,060
	Ha	0,730	0,796	0,496	0,653	0,595	0,454	0,454	0,452	0,863	0,610
	Fis	0,244*	0,199	-0,009	0,085	-0,150	0,000	0,412	-0,444	0,245*	0,013
F03	Ra	5,556	6,158	4,006	3,768	2,770	4,169	4,814	2,887	7,128	4,584
	Ha	0,733	0,820	0,600	0,595	0,473	0,467	0,785	0,286	0,891	0,628
	Fis	0,092	0,132	0,130	-0,189	0,300	-0,176	-0,185	-0,095	0,192	0,022
A02	Ra	4,431	2,884	1,966	1,968	1,978	1,000	1,000	1,993	3,107	2,259
	Ha	0,740	0,588	0,274	0,189	0,294	NA	NA	0,341	0,563	0,427
	Fis	0,668**	0,666**	1,000**	1,000**	1,000**	NA	NA	1,000**	0,629**	0,852
E02	Ra	3,661	4,259	3,657	2,000	2,348	2,000	2,615	1,444	3,815	2,867
	Ha	0,625	0,743	0,479	0,442	0,527	0,233	0,520	0,056	0,662	0,476
	Fis	-0,169	0,332**	-0,081	0,100	-0,245	-0,077	0,117	0,000	0,041	-0,039
Tous les loci	Ra	4,555	4,729	3,143	2,986	2,413	2,234	2,794	2,065	5,0866	
	Ha	2,805	2,791	1,977	1,448	2,042	0,975	1,069	1,232	0,7562	
	Fis	0,239**	0,327**	0,187*	0,062	0,142*	-0,085	0,039	-0,087	0,269**	

* P<0.05 ; ** P<0.01 ; Ra : Richesse Allélique calculée sur la base de 8 individus diploïdes pour chaque population ; Ha : Hétérozygotie Attendue calculée sans biais (Nei, 1978); en gras P significatif après correction de Bonferroni.

Des forts taux de différenciation génétique et très significatifs ont été observés entre toutes les populations avec des valeurs de Fst variant de 0,026 à 0,510 (P < 0,01, Tableau 5). La plus faible différenciation génétique a été obtenue pour les sites les plus proches situés à

Cochabamba, mais appartenant à des écotopes différents (CBBA versus 20OCT). Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée entre les valeurs de F_{st} entre populations et les distances géographiques qui les séparent ($P > 0,05$). Ces résultats suggèrent une importante structuration des populations de *T. infestans*, même à l'échelle micro-géographique, avec une restriction des flux de gènes.

Tableau 5 : Valeurs de différenciation génétique des toutes les populations

	DCBBA	S20OCT	SCAC004	DCOM17	CAC003	TUN001	TUN002	DCOM006
DCBBA	-							
S20OCT	0.026**	-						
SCAC004	0.189**	0.226**	-					
DCOM17	0.166**	0.187**	0.402**	-				
CAC003	0.206**	0.237**	0.387**	0.075**	-			
TUN001	0.207**	0.267**	0.448**	0.190**	0.200**	-		
TUN002	0.208**	0.245**	0.415**	0.087**	0.046**	0.133**	-	
DCOM006	0.384**	0.367**	0.510**	0.275**	0.240**	0.510**	0.342**	-
Mataral	0.103**	0.117**	0.242**	0.211**	0.216**	0.221**	0.207**	0.370**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; en gras : P significatif après correction de Bonferroni

IV. DISCUSSION

1. Structuration des populations à l'aide des gènes *Cytb*, *COI* et *ITS2*

Les séquences partielles des deux gènes mitochondriaux étudiés dans ce travail avaient été antérieurement analysées chez des populations de *T. infestans* récoltées en milieu domestique et péri-domestique dans le département de Chuquisaca par Giordano *et al.*, (2005) et seulement quelques insectes sylvestres et domestiques du département de Cochabamba par Monteiro *et al.*, (1999). La présente étude est étendue à plusieurs populations capturées en milieu sylvestre et domestique des deux départements de Cochabamba et du département de La Paz. Les populations sylvestres de ce département n'ont été identifiées qu'en 2008 et n'ont donc pas été analysées antérieurement. Dans cette étude, nous avons augmenté significativement l'échantillonnage analysé en diversifiant l'origine géographique et environnemental des insectes. De manière générale les deux gènes, cytochrome b et cytochrome oxidase I n'ont pas révélé un fort degré de polymorphisme puisque peu d'haplotypes ont été détectés contrairement aux travaux antérieurs.

En ce qui concerne le cytochrome b, deux des trois haplotypes identifiés avaient été déjà trouvés dans le département de Chuquisaca (Giordano *et al.*, 2005) en environnement péri domestique. L'haplotype H1 qui correspond à l'haplotype HC de Giordano *et al.*,(2005) est majoritaire et commun à presque toutes les populations étudiées. Il avait également été identifié par Monteiro *et al.*, (1999) qui l'avait défini comme l'unique haplotype andin

collecté dans les aires domestiques et sylvestre de Cochabamba. L'analyse actuelle diffère des antérieures sur deux points principalement. D'une part, on observe moins de diversité génétique sur une plus vaste aires géographique (départements de La Paz et Cochabamba) que dans l'étude de Giordano *et al.*, (2005) qui a identifié sept haplotypes différents dont cinq avec seulement un spécimen par haplotype. Et d'autre part, nous avons trouvé plus d'haplotypes que Monteiro *et al.*, (1999) qui n'avait identifié qu'un seul haplotype andin. Une des hypothèses qui expliquerait ce profil serait l'existence d'une zone géographique originelle de grande diversité génétique dans le département de Chuquisaca. Cette zone serait à l'origine de la dispersion de *T. infestans* vers un nombre limité de nouvelles aires dans les départements de Cochabamba et La Paz où du fait d'un effet fondateur, la diversité génétique serait plus restreinte. La colonisation des villages d'après plusieurs auteurs aurait été principalement assurée à travers le transport des triatomes par l'homme de villages en village créant aussi une diminution de la variabilité génétique par effet fondateur puis dérive génétique. Le cas de Mecapaca où seul l'haplotype H3 qui est trouvé présente près de 97% de similitude avec l'Haplotype E (Giordano *et al.*, 2005) est en accord avec l'hypothèse ci-dessus.

La cytochrome oxidase I a aussi présenté une plus faible variabilité que celle observée antérieurement (Piccinali *et al.*, 2006) puisque seulement 2 haplotypes ont été identifiés chez tous les individus. L'haplotype H1 est commun à toutes les populations sylvestres comme domestiques à l'exception des populations COM 006 et TUN 001 de la vallée du Rio La Paz où seul l'haplotype H2 est identifié chez tous les individus, 14 et 10 respectivement. Ces deux populations sont proches géographiquement et se différencient aussi des autres par l'analyse du cytochrome b alors que l'une est sylvestre et l'autre domestique. L'haplotype H1 correspond à l'haplotype EF483824 décrit par Cortez *et al.*,(2007) chez des populations domestiques de Mataral et EF451010 décrit par Piccinali *et al.*,(2006) chez des populations sylvestres de Cotapachi. L'haplotype H2 n'a pas été décrit antérieurement et de manière surprenante, il présente un grand nombre de mutations par rapport à H1 (83) l'identité entre les deux haplotypes étant de 88%. Le blast effectué avec la séquence de ce nouvel haplotype dans la banque de données GenBank montre une similitude de 86% avec des séquences déposées dans la banque par Garcia et Powell (1998) comme étant *Triatoma sordida* alors qu'aucun spécimen de *T. sordida* adulte n'a été collecté dans la vallée de Rio La Paz. Ces données ouvrent des perspectives d'analyse plus approfondie dans cette région.

Les séquences ITS2 analysées n'ont présenté aucun polymorphisme dans nos échantillons et l'haplotype identifié diffère par deux mutations de la séquence de *T. infestans*

de La Paz décrit par Marcilla *et al.*, (2000). Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où ce marqueur est plus résolutif dans l'étude de variabilité inter-espèces.

2. Population domestiques et sylvestres

De manière générale, pour le Cytb et le COI, les haplotypes identifiés sont communs aux populations sylvestres et domestiques. L'haplotype H1-Cytb a déjà été identifié dans les deux types d'écotopes (Monteiro, 1999; Giordano *et al.*, 2005; Richer *et al.*, 2007) comme c'est le cas pour l'haplotype H1-COI sans que ces haplotypes soient spécifiques d'une région. Toutefois l'haplotype H2-Cytb est un haplotype qui est restreint à des zones sylvestres dans notre étude. Giordano *et al.*, (2005) le décrit comme ancestral par rapport aux autres haplotypes identifiés dans son étude ce qui serait en faveur d'une origine sylvestre.

3. Les marqueurs microsatellites

3.1. Diversité génétique des populations de *T. infestans*

Des faibles valeurs de richesse allélique et d'hétérozygotie comme celles observées au cours de cette étude indiquent que les populations de *T. infestans* sont de petite taille et constitueraient de petites unités isolées et bien localisées géographiquement. Cette observation est soutenue par l'absence d'allèles de faible fréquence (allèles rares) à tous les loci et la tendance à la fixation des allèles majoritaires à certains loci. En effet dans les populations de grande taille, de nombreux allèles sont générés par mutations, et l'influence restreinte de la dérive génétique (pourtant accentuée dans les populations de petite taille) permet le maintien d'un polymorphisme important. Par ailleurs, les plus faibles diversités génétiques observées dans les populations de La Paz et de Luribay seraient dues aux opérations de lutte plus intenses menées contre les triatomes dans ces localités, qui auraient réduit significativement les densités des populations.

3.2. Structure génétique des populations de *T. infestans*

Les déviations à l'équilibre de Hardy-Weinberg observées à tous les loci lorsque les échantillons étaient groupés soit par zones géographiques, soit par écotopes étaient toutes associées à d'importants déficits en hétérozygotes. Les déficits en hétérozygotes peuvent être causés par i) le mode de reproduction (consanguinité), ii) les allèles nuls ou iii) un mélange de populations génétiquement différenciées (effet Wahlund). La consanguinité est moins probable car les triatomes ont été collectés dans des sites distants d'au moins un km, ce qui limiterait les chances de collecte des individus issus des mêmes parents. Le fait que les déviations à l'équilibre de Hardy-Weinberg soient observées à tous les loci écarte l'hypothèse des allèles nuls qui sont locus spécifiques, mais argumente plutôt en faveur d'une structuration du pool de gènes de *T. infestans*. Les valeurs de F_{st} élevées et très significatives

obtenues en comparant les échantillons deux à deux démontrent clairement que chaque échantillon constitue une unité reproductive à part entière, qui échange peu ou pas de migrants avec les autres échantillons ou populations. Les niveaux de différenciation observée dans cette étude sont comparables aux résultats d'une étude précédente menée dans la région de Cotapachi (Richer *et al.*, 2007), et sont en accord avec les données connues sur la capacité de dispersion des triatomes. En effet, il a été rapporté que les Triatomes ont une faible capacité de dispersion. En haute altitude, ces insectes ne se dispersent peu par vol, mais se déplaceraient graduellement sur des petites distances en marchant à travers un habitat continu et favorable (Gustafson et Gardner, 1996). Dans nos zones d'études la couverture végétale et le relief accidenté formé de montagnes et de vallées pourraient constituer des barrières à la migration des triatomes. De même les activités humaines telles que la construction des habitations, la création des plantations limiteraient aussi cette migration.

4. Marqueurs moléculaires

Les marqueurs ribosomiaux, mitochondriaux et microsatellites sont des outils moléculaires utiles en génétique des populations permettant de différencier des populations de triatomes comme le propose Mas-Coma et Bargues *et al.*, (2009). Comme chaque marqueur possède ses propres caractéristiques évolutives, ils sont adaptés chacun à un certain niveau de discrimination différents comme entre genres, espèces, espèces voisines et populations d'une même espèce. Dans cette étude nous voyons que le marqueur ribosomal ITS2 qui est peu variable entre populations de *T. infestans* est surtout intéressant pour discriminer des espèces alors que les gènes mitochondriaux détectent du polymorphisme parfois jusqu'au niveau de populations géographiques. Les marqueurs microsatellites qui évoluent plus rapidement que les autres, donnent généralement des informations significatives quand les populations se répartissent sur un espace limité. Dans le cas des triatomes qui sont des insectes avec un faible pouvoir de dispersion, les marqueurs mitochondriaux sont potentiellement utiles pour discriminer des populations à un niveau macro géographique alors que les microsatellites sont à réserver pour des études micro spatiales.

VI. CONCLUSION

L'absence de polymorphisme de séquence d'ITS2 observé entre toutes les populations concorde avec le fait que ce marqueur est approprié dans l'étude des taxons proches mais ayant divergé il y a au moins de 50 millions d'année alors que nous sommes ici dans des

populations ayant divergé récemment (> 40 000ans) appartiennent à une seule branche évolutive.

Les marqueurs mitochondriaux et les microsatellites nous montrent une certaine structuration géographique entre les populations qui pourrait être liée à la distance. Pour *T. infestans*, ce modèle de différenciation par la distance a été aussi proposé suite à des études isoenzymatiques. Nos résultats ne mettent pas en évidence de structuration liée aux écotopes car pris globalement, une absence de différenciation est observée entre les populations sylvestres et domestiques.

En ce qui concerne les marqueurs mitochondriaux nous avons confirmé la présence de certain haplotypes déjà décrits mais identifiés aussi de nouveaux. Les populations de la municipalité de Mecapaca dans la vallée de Rio La Paz serait assez distincte des autres et la plus divergente. Des compléments d'études en augmentant les nombres d'individus et des populations le long de cette vallée donneraient des informations supplémentaires sur la dynamique de ce vecteur.

Dans le cas des analyses microsatellite, chaque population est en équilibre d'Hardy-Weinberg signifiant que chaque population est bien une unité panmictique. Toutefois, il existe une très forte structuration géographique puisque à l'exception de certaines populations géographiquement séparées de quelques centaines de mètre toutes les populations sont génétiquement différenciées les unes des autres. Ces résultats montrent que ce marqueur dans le cas de *T. infestans* est adapté à des études microspaciales et peu utiles à plus grande échelle.

Nous pouvons conclure que étant donné la très forte structuration des populations de *T. infestans*, la capacité de dispersion naturelle de ce vecteur est faible ce qui serait en faveur d'un faible risque de ré-infestations du milieu domestique par des populations sylvestres sauf dans le cas où les foyers sylvestres sont adjacents aux habitations. Cependant les transferts passifs de triatomes à travers l'activité humaine est à considérer avec attention car ils pourraient jouer un rôle majeur. Une autre conséquence de cette « super » structuration sur les stratégies de contrôle est de pouvoir traiter tout foyer de façon isolée dans la mesure où les mouvements des insectes sont faibles.

VI. BIBLIOGRAPHIE

Avalos JW, 1965-1967. Educación sanitaria y participación de las comunidades en la erradicación de la enfermedad de Chagas-

Mazza, Segundas Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas, Ministerio de Bienestar Social de Argentina, 2: 93-96.

- Bacigalupo A, Segura JA, Garcia A, Hidalgo J, Galuppo S, Cattan P, 2006. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Region Metropolitana, Chile. *Rev. Med. Chil.* Oct;134(10):1230-6.
- Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S, 2002. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. In: Baker, J. (Ed.), Douglas Baker Supplement. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (Suppl. 1); 159–164.
- Chuit R, Paulone I, Wisnivesky-Colli C, Bo R, Pérez A, Sosa-Estani S, Segura EL, 1992. Results of a first step toward community-based surveillance of transmission of Chagas disease with appropriate technology in rural areas. *Am. J. of Trop. Med. Hyg.* 46: 444-450.
- Ceballos LA, Piccinalli RV, Berkunsky I, Kitron U, Gürtler RE, 2009. First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. *J. Med. Entomol.* Lanham, MD, USA: *Entomol. Soc. America.* ISSN 0022-2585
- Colombo P, Cigliano MM, Sequeira AS, Lange CE, Vilardi JC and Confalonieri VA, 2005. Phylogenetic relationships in *Dichroplus* Stål 1 (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) inferred from molecular and morphological data: testing karyotype diversification, *Cladistics* 21: 375-389.
- Cortez MR, Emperaire L, Piccinalli RV, Gürtler RE, Torrico F, Jansen AM, Noireau F, 2007. Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta. Trop.* Apr;102(1):47-54.
- Dias JCP, 1963. Re-Infestation of the district of Bambui, MG. by triatomids, vectors of Chagas' Disease. En Proc Seventh Int Congress *Trop. Med. Malaria, Rio de Janeiro*, 2: 255-256.
- Dias JCP, 1987. Control of Chagas Disease in Brazil. *Parasitology Today*. 3 (11): 336-341
- Dias JCP, 1988. Controle de vetores da doença de Chagas no Brasil e riscos de reinvasão domiciliar por vetores secundarios. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. Supl. 1, 83: 387-391.
- Dujardin JP, Cardozo L, Schofield CJ, 1996. Genetic analysis of *Triatoma infestans* following insecticidal control interventions in central Bolivia. *Acta Trop.* 61: 263-266.
- Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield C.J, Tibayrenc M, 1997. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol.* 34: 544-551.
- Dujardin JP, CJ Schofield and M Tibayrenc, 1998. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med. Vet. Entomol.* 12: 20-29.
- Edwards JK, 1999. Miniprep procedures for the isolation of plant DNA: *In molecular tools for screening biodiversity*. Edited by Angela Karp, Peter G. Issaac and David S. Ingram. Published in 1998 by Chapman & Hall, London: P22-24.
- García BA, Zheng LB, De Rosas ARP and Segura EL, 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mol Ecol Notes* 4: 568–571.
- García BA and Powell JR, 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences *J. Med. Entomol.* 35 (3): 232-238
- Giordano R, Pizarro Cortez JC, S Paulk and L Stevens, 2005. Genetic diversity of *Triatoma infestans*, (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz* 100:753-760.
- Gorla DE and Schofield CJ, 1985. Analysis of egg mortality in experimental populations of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Bull. of the Soc. of Vector Ecol.* 10: 107-117
- Gorla DE, 2002. La reconstrucción de la distribución geográfica de Triatominae en base a información de variables ambientales. Proceedings of the 4th International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, Cartagena de Indias, Colombia. *CIMPAT, Bogota*. pp.167-173
- Gualtieri JM, Ríos CH, Cichero JA, Vázquez R, Carcavallo RU, 1984. Ensayo de campo con Decametrina en su formulación líquido emulsionable y floable en el control de *Triatoma infestans* en la Provincia de Córdoba. Chagas (Argentina). I: 17-20.
- Gürtler RE, Petersen RM, Cecere MC, Schweigmann NJ, Chuit R, Gualtieri JM, Wisnivesky-Colli C, 1994. Chagas disease in north-west Argentina: risk of domestic reinfestation by *Triatoma infestans* after a single community-wide application of deltamethrin. *Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 88: 27-30
- Gürtler RE, Cohen JE, Cecere MC, Chuit R, 1997. Shifting host choices of the vector of Chagas disease *Triatoma infestans* in relation to the availability of hosts in houses in north-west Argentina. *J. Applied Ecol.* 34: 699-715.
- Gürtler RE, Canale DM, Spillman C, Stariolo R, Salomon OD, Blanco S, Segura EL, 2003. Effectiveness of residual spraying of peridomestic ecotopes with deltamethrin and permethrin on *Triatoma infestans* in rural western Argentina: a district-wide randomized trial. *Bull WHO* 82: 196- 205

- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA 3: integrate software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Lent H and Wygodzinsky P, 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' Disease. *Bull. Am. Museum of Natural, New York.* 163: 127-520.
- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S, 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol. Phylogene. t Evol.* Jan; 18(1):136-42.
- Monteiro FA, Perez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C and Beard CB, 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of T. Melanosoma, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 94 Suppl 1: 229-38.
- Librado P and Rozas J, 2009. DnaSPv5 A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data *Bioinformatics* 25: 1451 -1452.
- Mas-Coma S, Bargues MD, 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop.* May-Jun;110 (2-3):112-36. Epub 2008 Nov 25
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F, 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other wild triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 23–27
- Noireau F, Cortez MR, Monteiro FA, Jansen AM, Torrico F, 2005. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol.* 21: 7–10.
- Oliveira Filho, AM., Santos C E, Melo TMV, Figueiredo M J, Silva EL, Dias JC.P, 1986. Field trial of insecticidas in an area of high levels of infestation and dispersion of *Triatoma infestans*. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz.* 81 (Suppl.): 171.
- Paulone I, Chuit R, Pérez A, Wisnivesky-Colli C, Segura EL, 1988. Field research on a epidemiological surveillance alternativa of Chagas' Disease transmission: The Primary health care (PHC) strategy in rural areas. *Rev. Argentina de Microbiol.* 20 (Suppl.): 103-105.
- Piccinali RV, Marcet PL, Noireau F, Gürtler RE, Kitron U, Dotson EM, 2007. Genetic variability, population structure and phylogeography of Argentinian and other Southamerican *Triatoma infestans* populations based on COI. *ASTMH 55th Ann. Meet.*, Atlanta, GA.
- Pinchin R, Oliveira Filho AM., Fanara DM, Gilbert B 1980. Ensaio de campo para avaliagão das possibilidades de uso da decametrina (OMS 1998) no combate a triatomineos. *Rev. Bras. Malar. e Doenças Tropicais.* 3 2: 36-41.
- Rabinovich JE, 1972. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. *J. Med. Entomol.* 9: 331-370.
- Richer W, Kengne P, Cortez M, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Noireau F, 2007. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 2007;12(6):759-64.
- Rocha et Silva EO, Ferreira Guarita O, Kenge Ishihata G, 1979. Doença de Chagas: actividades de controle dos transmisores no estado de São Paulo, Brasil. *Congreso Internacional sobre Doenças de Chagas.* Rio de Janeiro. SUCEN p.1-18.
- Segura EL, Sosa Estani S, Esquivel ML, Gomez A, Salomón D, 1999. Grupo de Desarrollo y Aplicación Operativa. Control de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 59: 91-96.
- Schmunis GA, Zicker F, Moncayo A, 1996. Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. *Lancet* 348: 1171.
- Schofield CJ, 1980. Density regulation of domestic populations of *Triatoma infestans* in Brazil. *Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 74: 761769
- Schofield CJ, Dias JCP, 1998. The southern cone initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 42, 1–27.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP, 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl.1): 375-378
- Torrico RA, 1946. Hallazgo de *Eratyrus mucronatus*, infestación natural de "vinchucas" de cerro y *Eutriatoma sordida* en Cochabamba. *An. Lab. Central Cochabamba* 1, 19–23.
- World Health Organization, 1991. Control of Chagas' disease. *Technical Report Series* No. 811. Geneva: WHO.
- Weir BS and Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.
- Wisnivesky-Colli C, Gürtler RE, Solarz ND, Salomón DO, Ruiz AM, 1982. Feeding patterns of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) in relation to transmission of American Trypanosomiasis in Argentina. *J. Med. Entomol.* 19: 645-1

BACTÉRIES SYMBIOTES DE *Triatoma infestans* OUTIL POTENTIEL DE LUTTE ANTIVECTORIELLE

I. INTRODUCTION

Un intérêt croissant s'observe dans la recherche de nouveaux moyens de contrôle des insectes vecteurs. Ces études s'orientent sur le développement d'organismes génétiquement modifiés qui se propagent à travers les populations d'insectes d'importance médicale ou économique (Sinkins et Godfray, 2004). C'est pour cette raison que, depuis qu'il est possible d'insérer des gènes étrangers chez les bactéries, il a été proposé d'utiliser les symbiotes comme véhicules de gènes d'intérêt chez des insectes transmetteurs d'agents pathogènes des maladies vectorielles (Beard *et al.*, 1992). C'est le cas de la maladie de Chagas dont l'agent pathogène, *Trypanosoma cruzi* est transmis par des insectes hématophages de la sous-famille des Triatominae où jusqu'à présent, les stratégies de contrôle employées pour la lutte, sont basées principalement sur l'utilisation d'insecticides qui, s'ils permettent de réduire le nombre de vecteurs, créent souvent des problèmes de sélection de populations résistantes (Duvarsula *et al.*, 2008). *Triatoma infestans*, le principal vecteur dans les pays du Cône Sud, a été la cible de diverses stratégies de contrôle. Cependant, les programmes sont confrontés à des situations de recolonisation de *T. infestans* dans plusieurs régions comme celle du Gran Chaco en raison de l'émergence de résistance des insectes aux insecticides et d'une baisse de la capacité opérationnelle des programmes de lutte après la phase d'attaque (Gürtler *et al.*, 2005). D'autres méthodes alternatives doivent être développées pour lutter contre cette maladie comme la production d'individus paratransgéniques de *T. infestans* incapables de transmettre le parasite mais avec une capacité de reproduction plus élevée que les populations sauvages. Pour ce faire, on a envisagé d'utiliser des bactéries symbiotes génétiquement modifiées capables d'interférer sur la compétence vectorielle (Douglas, 2007). Des études antérieures ont rapporté que des bactéries symbiotes associés à *T. infestans* (Goodchild, 1955; Figueiró *et al.*, 1995) dont les genres *Nocardia*, *Corynebactéria* et *Streptococci* toutes isolées de l'intestin, jouent un rôle dans le développement et la survie de l'insecte en synthétisant des nutriments nécessaires aux nymphes (Dascha *et al.*, 1984). Une autre étude a signalé la présence de bactéries gram-négatives endocytobiontes dans le tractus intestinal et dans les gonades de l'insecte (Hypsa, 1993). Chez *Rhodnius prolixus*, principal vecteur de la maladie en Amérique Centrale, il a été possible de produire des lignées paratransgéniques qui expriment le peptide cecropine A dans la bactérie symbiote *Rhodnococcus rhodnii* à une concentration qui élimine le parasite *T. cruzi* (Durvarsula *et al.*, 1997). Egalement,

l'expression de fragments anticorps actifs via la modification génétique des symbiotes *R. rhodniis* chez *R. prolixus* et *Corynebacterium* chez *T. infestans* a été établie démontrant ainsi la faisabilité du développement de symbiotes producteur d'anticorps qui infèrent avec le parasite (Durvarsula *et al.*, 1999). De plus, il a été montré sous conditions contrôlées que ces bactéries modifiées peuvent être diffusées dans les populations de nouvelles nymphes émergentes de *R. prolixus* grâce à leur comportement de coprophagie (Durvarsula *et al.*, 1999).

Ces résultats nous encouragent à approfondir les études des bactéries symbiotes de *T. infestans* en identifiant les espèces impliquées chez les population naturelles, en recherchant le rôle exact qu'ils jouent dans la vie de l'insecte et en analysant s'il existe une relation importante avec l'agent pathogène. Cette nouvelle voie représente un espoir de lutte contre la maladie.

II. MÉTHODOLOGIE

Le travail pourrait être organisé en Bolivie pour toute la partie collecte des populations naturelles, isolement des symbiotes, identification biochimique, typage génétique et bioessais au sein de l'UR 16 (IRD) en collaboration avec les partenaires boliviens de L'INLASA (département d'entomologie, La Paz) et de l'Université de San Simon (Cochabamba). Ces laboratoires possèdent des insectariums et plusieurs colonies de triatomes et des laboratoires de biologie moléculaire adaptés au typage des organismes. La partie protéomique et construction de plasmide serait effectuée à Montpellier en collaboration avec des chercheurs de l'UR 16 et du GEMI.

1. Capture des spécimens de *T. infestans* - La collecte de spécimens s'effectuera en Bolivie dans les maisons et les périodomiciles des régions ayant un fort indice d'infestation intradomiciliaire et dans des zones « sauvages » où la présence de *T. infestans* est établie (Bermudez *et al.*, 1993; Noireau *et al.*, 1997, 2000). En milieu naturel (sauvage) les triatomes seront capturés en employant les pièges décrits par Noireau *et al.*, (1999).

2. Isolement des bactéries - Avant dissection les parasites seront recherchés par microscopie dans les fèces de chaque triatomes. Le type de souche de *T. cruzi* auquel sont associés les symbiotes sera spécifiée via l'analyse génétique de certains gènes du parasite au moyen d'une PCR et séquençage faite à partir d'un échantillon de fèces (O'Connor *et al.*, 2007). Pour chaque groupe, les gonades, glandes salivaires et intestins seront broyés en conditions stériles dans une solution de PBS à 10% et une partie de la solution seraensemencé sur un milieu de culture solide LB pour entérobactéries. Ensuite, une monoculture sera faite à partir de chaque colonie bactérienne pour l'extraction d'ADN.

3. Identification biochimique des bactéries - La batterie d'épreuves (21 tests au total) API20E qui est un système d'identification rapide pour bactéries de la famille Enterobacteriaceae et d'autres bactéries Gramme négatif sera appliquée à chaque colonie.

4. Typage moléculaire des bactéries - L'ADN bactérien sera extrait de chaque colonie à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN génomique (QIAamp, Quiagen®). Les amorces universelles utilisées ont été choisies dans la région 16S du rDNA, 16F (5' - GCTTAACACATGCAAG-3) et 16R (5' ACGGGCAGTGTGTACAAGACC - 3'). La PCR sera effectuée selon la procédure décrite par (Hypsa et Dale, 1997). Après purification des produits de PCR, le gène sera séquencé sur un séquenceur Applied Biosystems 3130xl HITACHI Genetic Analyzer puis les séquences corrigée avec le logiciel SeqScape. Les espèces de bactéries seront identifiées selon le niveau d'identité des séquences des gènes 16S rDNA avec les séquences déposées en banque (BLASn et Ribosomal Data Base Projet).

6. Bioessais - Pour les expériences il est nécessaire que les insectes soient des aposymbiontes, c'est-à-dire qu'ils ne contiennent pas de bactéries. Les œufs de *T. infestans* nés au laboratoire seront stérilisés avec une solution d'iode et transférés dans un environnement jusqu'à l'émergence, comme le propose Beard *et al.*, (1992).

6. 1. Infection bactérienne - Les insectes aposymbiontes émergents (nymphe de premier stade) seront infectés en les nourrissant, à travers une membrane, d'une suspension du symbionte préalablement incluse dans du sang défibré de lapin. Deux groupes d'insectes seront constitués pour chaque épreuve : un groupe de spécimens nourris avec la solution du symbionte, l'autre (groupe témoin) composé de spécimens nourris de la même solution sanguine sans symbionte. Sera pris en compte la cinétique de développement des différents stades; sera aussi noté tout type de changements physiologiques comme la fréquence de défécation, la capacité de copulation des adultes et la quantité d'œufs pondus. Les colonies seront maintenues dans le laboratoire et nourries chaque 15 jours avec du sang du lapin.

6. 2. Insectes infectées avec *T. cruzi* - La même procédure expérimentale que précédemment sera suivie après identification et détection les bactéries symbiontes associées à *T. cruzi*. Ici après l'émergence des triatomes, ceux-ci seront infectés avec *T. cruzi* en présence ou en absence des bactéries. Les groupes témoins suivant seront aussi introduits : triatomes non infectés avec symbionte et sans symbiontes.

7. Rôle du symbionte bactérien dans la sur- ou sous-expression de facteurs protéiques : analyse protéomique - Le processus de l'analyse a été structuré selon Gibson et Muse (2004) et Libler D., (2002).

7. 1. Extrait protéique à partir des organes des triatomés - Les organes du système digestif de l'insecte (glandes salivaires, estomac et intestin) seront broyés et homogénéisés en solution aqueuse appropriée à base de « Tween » pour solubiliser les protéines et les séparer des lipides.

7. 2. Séparation des protéines par électrophorèse 2D - Une analyse par électrophorèse 2D sera effectuée sur les extraits protéiques. L'électrophorèse 2D permet de séparer les protéines présentes dans les échantillons. Par comparaison des profils de migration des protéines totales sur gels 2D entre les deux groupes d'échantillons, la sur ou sous-production de quelques substances relatives à l'infection "symbiote" et "symbiote-parasite" seront déterminées.

7. 3. Identification des protéines par spectrométrie de masse - Les séquences peptidiques des protéines d'intérêt seront obtenues par spectrométrie de masse. La recherche à partir de leur masse et/ou charge (m/z) dans la banque de séquences GenBank permettra leur identification.

8. Sélection d'un gène candidat pour la construction du plasmide et la production de triatome paratransgénique - Une fois établi le rôle de la bactérie en tant que symbiote de l'insecte et identifié un facteur protéique d'intérêt (pronostic vital des insectes, résistance à l'infection), nous procéderons à la modification des insectes. Nous réaliserons la construction du plasmide associé à un marqueur de résistance aux antibiotiques comme le thiostrepton utilisé pour identifier et sélectionner les symbiotes génétiquement modifiés (Beard *et al.*, 2001). Les plasmides seront les transporteurs des séquences modifiées des protéines d'intérêt. Après modification des bactéries, elles seront insérées dans une nouvelle colonie d'insectes aposymbiotes pour vérifier les résultats.

III. RESULTATS ATTENDUS

- Identification de la flore bactérienne des populations des *T. infestans* sauvages et domestiques, ainsi que celle des insectes infectés par *T. cruzi*. L'expectative est qu'ils présentent une flore bactérienne différente qui nous permettra de sélectionner les symbiotes intéressants pour la construction de vecteurs paratransgéniques.
- Trouver de nouvelles bactéries symbiotes associées à la présence du parasite montrant un rôle dans certains processus fondamentaux du métabolisme de l'insecte.
- Selon les résultats antérieurs choisir un symbiote et un facteur protéique qui ont un rôle de premier plan afin que les insectes infectés par ces bactéries présentent une absence ou faible compétence vectorielle.

IV. PERSPECTIVES

- Trouver une méthode alternative de lutte contre les vecteurs avec la mise en œuvre de triatomes porteurs de bactéries génétiquement modifiées, qui seront distribués dans les foyers ou les maisons traités avec des insecticides.
- Trouver une méthode appropriée de distribution des symbiotes génétiquement modifiés sur le terrain en se basant sur le comportement de coprophagie des nymphes de premiers stades.

V I. BIBLIOGRAPHIE

- Beard CB, Mason PW, Aksoy S, Tesh RB, Richards FF, 1992. Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Ame. J. trop. Med. and Hyg*; 46(2):195-200.
- Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV, 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *Int. J. Para .* ; 31(5-6):621-7.
- Bermudez H, Balderrama F, Torrico F, 1993. Identification and characterization of wild foci of *Triatoma infestans* in Central Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49 (Suppl.), 371.
- Dasch GA, Weiss E, Chang K, 1984. Endosymbionts of insects. In: Krieg NR. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 811–833.
- Douglas AE, 2007. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Tren. in bio.*, 25(8):338-42.
- Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, Richards FF, Beard CB, 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Pro. the Nat. Aca. Scis. (USA)* 94, 3274–3278.
- Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Taneja J, Kang A, Cordon-Rosales C, Richards FF, Whitham R, Beard CB, 1999. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Med. and Vet. Ent.* 13, 115–119.
- Durvasula RV, Sundaram RK, Kirsch P, Hurwitz I, Crawford CV, Dotson E, Beard CB, 2008. Genetic transformation of a Corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Exp. Para.*, 119(1):94-8.
- Figueiro AR, Nunes ZG, Silvia AAL, Giordano-Dias CMG, Conra JR, Hofer E, 1995. Isolation of microorganisms of triatomines maintained in artificial and sylvatic conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) 90, 228.
- Gibson G and Muse S, 2004. *A primer of Genome Science*, Third Edition, Sinauer Associates. North Carolina.
- Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Petersen RM, Canale DM, Castañera MB, Chuit R, Segura EL, Cohen JE, 2005. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *Ame. J. Trop. Med. and Hyg.* 73, 95–103.
- Goodchild AJP, 1955. The bacteria associated with *Triatoma infestans* and some other species of Reduviidae. *Par.* 45441448.
- Hypsa V, 1993. Endocytobionts of *Triatoma infestans*: distribution and transmission. *J. Inv. Pathol.* 61:32-38.
- Hypsa V and Dale C, 1997. In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus arsenophonus triatominarum*,” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1140-1144.
- Liebler D, 2002. *Introduction to proteomics, Tools for new Biology*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Noireau F., Flores R., Gutierrez, T., Dujardin, J.P., 1997. Detection of wild dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 583–584
- Noireau F, Flores R, Vargas F, 1999. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93,13–14.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F, 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other wild triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 23–27.
- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF, 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infect Genet Evol.* 7(5):587-93. Epub May 6.
- Sinkins SP and Godfray HC, 2004. Use of wolbachia to drive nuclear transgenes through insect populations. *Proc R Soc B* 271: 1421-1426.