

INTRODUCTION

La biologie moléculaire a fait son entrée en force en entomologie médicale depuis 5 ou 6 ans. Depuis ces trois dernières années on assiste à une croissance exponentielle du nombre d'articles ou communications présentant des travaux d'entomologie médicale faisant appel à l'outil moléculaire,

Janvier 1991: Rapport de l'OMS «prospects for malaria control by genetic manipulations of vectors»

1992: Naissance d'une revue: «Insect Molecular Biology»

Avril 1993: Congrès de l'American Mosquito Control Association.: 10 communications d'entomologie médicale moléculaire», essentiellement en taxonomie.

La biologie moléculaire peut intervenir à deux niveaux d'utilisation en entomologie médicale:

1) En tant qu'outil de diagnostic: (détermination, taxonomie, génétique des populations,...)

2) Pour définir les bases moléculaires de la capacité vectorielle avec pour objectif final de produire des moustiques transgéniques. Seule cette seconde utilisation relève de l'entomologie moléculaire. Dans cet article nous ferons un bref survol des possibilités offertes par la biologie moléculaire et des développements probables du génie génétique en entomologie médicale.

1) UTILISATION COMME OUTIL DE DIAGNOSTIC

Ces utilisations sont maintenant extrêmement variées et doivent être utilisées chaque fois qu'elles apportent un supplément d'information. Par exemple, le laboratoire ORSTOM de zoologie médicale basé à l'Institut Pasteur de Dakar utilise, ou va utiliser, la PCR (Polymerase Chain Reaction), pour répondre à 3 questions.

Laboratoire ORSTOM de Zoologie Médicale à l'Institut Pasteur BP 1386, DAKAR, SENEGAL

Bull. liais. doc. - OCEAC Vol.26 N°2 Juin 1993

1-1 identification des espèces du complexe *An. gambiae*

La diagnose des 3 espèces du complexe *gambiae* présentes au Sénégal (*Anopheles gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*) est impossible sur les seuls arguments morphologiques. La technique PCR choisie utilise des amorces spécifiques des espèces du complexe et permettant l'amplification de fragments de 313 nucléotides pour *An. arabiensis*, 388 pour *An. gambiae* et 462 pour *An. melas* après trente cycles d'amplification. Notre étude a pour objectifs de préciser quels vecteurs (*Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. funestus*) transmettent quels Plasmodium (*P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale*), à quel taux, quand (dans l'année et dans la nuit) et où (intérieur/extérieur des maisons)? L'intérêt de la PCR sur le complexe *gambiae* par rapport aux autres méthodes (cytogénétique, étude des isoenzymes, sondes ADN, étude des hydrocarbures cuticulaires) réside dans la possibilité d'utilisation de tous les *Anopheles* capturés. Il n'y a pas de biais d'échantillonnage, pas de problème de conservation ni d'utilisation d'éléments radioactifs. La PCR peut être réalisée uniquement sur les pattes des anophèles, ce qui laisse disponible le reste du moustique pour les études d'âge physiologique, les dissections de glandes salivaires, la réalisation d'Elisa repas de sang et CSP. Malheureusement la technique est encore coûteuse et nécessite un matériel spécialisé. Enfin, pour le moment, elle ne permet pas d'atteindre la précision de la cytogénétique dans la caractérisation des populations d'*An. gambiae*.

1-2: La technique PCR-RAPD, (Random amplified polymorphic DNA) sur les moustiques et les tiques

Cette technique PCR qui utilise des amorces aléatoires d'environ 10 nucléotides semble devenir un nouvel outil dans l'étude de la génétique des populations. (Hadryset al. 1992). En complémentarité des techniques isoenzymatiques, nous envisageons de l'utiliser pour étudier les espèces et les populations de tiques du genre *Hyalomma* (vecteurs du virus

PM 253

25 MARS 1994

25 MARS 1994

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 39172 ex 1

Cpte : B

CCHF) et *Anopheles funestus*, que nous pensons constitués de complexes d'espèces, d'après des arguments comportementaux. Cette technique est encore en cours de validation (Kambhampati *et al* 1992).

1-3: Mesure des variations individuelles du taux d'inoculation de Plasmodium

On sait que chaque individu n'est pas piqué de façon équivalente par les anophèles vecteurs de *Plasmodium*. Les enfants, en particulier, semblent moins piqués que les adultes. A partir de repas de sang de moustiques capturés gorgés le matin en faune résiduelle dans des chambres, et contenant de l'ADN de leucocytes humains, nous voulons pouvoir identifier quel individu d'un village a été piqué par chaque moustique. Pour cela nous envisageons de comparer le profil de migration obtenu par PCR chez les moustiques, après amplification de séquences très polymorphiques contenant des gènes microsatellites (CAN), avec le profil des individus du village. Trois gènes, pouvant être testés en même temps, ont été retenus (insulin like growth factor, somatostatine, apolipoprotéine2). Ainsi sur les N moustiques capturés dans une chambre on devrait pouvoir dire quelle proportion a piqué chaque individu, et identifier des critères d'attractivité (âge, poids, surface corporelle, sexe). (Weber *et al.* 1989, Gokool *et al* 1992)

2) BASES MOLECULAIRES DE LA CAPACITE VECTORIELLE S.L.

L'étude des bases moléculaire de la capacité vectorielle se fait en plusieurs étapes, dont nous présentons quelques exemples.

1ère étape: Cartographie du génome

* détermination de la taille du génome. De très nombreux travaux ont été réalisés sur de nombreux genres et de nombreuses espèces depuis 1987. Le génome d'*An. gambiae* contient près de $2,6 \times 10^8$ paires de bases, alors que celui d'*Aedes albopictus* en contient de 8×10^8 à 13×10^8 selon les souches (Rao et Rai, 1987).

* Le génome d'*An. gambiae* a été cartographié en 46 segments (Zheng *et al.*, 1991)

2ème étape: Identification du ou des gènes codant pour un paramètre intervenant dans la transmission. = base moléculaire des interactions hôte-parasite

Les gènes qui interviennent dans le fait qu'un insecte donné soit, ou non, vecteur d'un pathogène donné sont naturellement très nombreux. Ils peuvent par exemple intervenir aux niveaux suivants (non exhaustif):

- Hormone de développement, neuropeptides
- comportement trophique des anophèles
- exflagellation et fécondation (MEF: mosquito exflagellation factor)
- Membrane périthroïque (MP)(rôle de N acétylglucosamine dans attachement, Chitinase contre chitine de la MP)
- épithélium de l'estomac: récepteurs ?, protéases ?, rôle de la trypsine, mécanisme de l'encapsulation: mélanisation sous contrôle de prophénoloxydase.
- Migration des sporozoïtes. Pourquoi les sporozoïtes ne sont-ils pas reconnus et détruits par le système immunitaire du vecteur (rôle des protéines de surface type CSP)

-

Les articles de Brey (1991), James (1992), Besansky et Collins (1992) font le point des données actuelles sur ce thème.

3ème étape: moustiques transgéniques

C'est l'intégration de gènes dans le moustique, induisant un arrêt ou une baisse de la capacité vectorielle. Ce thème est développé dans un autre article de ce numéro. En bref la production de moustiques transgéniques se fera en deux étapes:

* recherche de vecteurs de clonage, de promoteurs, de marqueurs d'intégration.

* production de souches transformées.

4ème étape: essais sur le terrain

Cette dernière étape sera probablement la plus délicate à mettre en oeuvre, dans l'hypothèse où des moustiques transgéniques à capacité vectorielle nulle (ou réduite) seraient obtenus. Les problèmes seront liés aux moustiques (compétitivité des nouvelles souches), aux parasites (sélections de mutations permettant l'échappement), et surtout à l'homme (choix des situations épidémiologiques où utiliser ces souches transgéniques et problèmes d'éthique). Ces points sont développés dans un autre article de ce numéro.

CONCLUSION

La route est encore longue jusqu'au contrôle génétique, pour ne pas parler d'éradication, des arthropodes vecteurs de maladies. Cependant le développement de la biologie moléculaire a permis de mettre sur le marché de nombreux outils, d'utilisation souvent simple, qui permettent de répondre à des questions parfois sans réponse jusqu'alors. C'est en particulier le cas en taxonomie et en génétique des populations, et, en dehors de toute mode, ce serait une erreur scientifique de ne pas utiliser ces perfectionnements techniques chaque fois que nécessaire et économiquement possible.

BIBLIOGRAPHE

La revue «*Insect Molecular Biology*» Blackwell scientific publications, ed JM Crampon & AA James
Besansky NJ and Collins FH, 1992, The mosquito genome: organisation, evolution and manipulation. *Parasitology today*, 8 (6): 186-192.
Brey P.T., 1991. The taming of the Anopheles: current trends in malaria vector research, Forum in Immunology, in *Research in immunology*: 8: 712-722.

Gokool, S., Smith, D.F. and Curtis, C.F., 1992. The use of PCR to help quantify the protection provided by impregnated bednets. *Parasitology today* 8(10): 347-350.
Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B., 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology*, 1: 55-63.
James A.A., 1992, Mosquito molecular genetics: the hands that feed bite back. *Science*, 257:37-38
Kambhampati, S., Black IV, W.C. and RAI, K.S., 1992. Random Amplified Polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.* 29(6): 939-945.
Rao, P.N. and Rai, K.S., 1987. Inter and intra species variation in nuclear DNA content in Aedes mosquitoes. *Heredity*, 59:253-258.
Weber, L.J. and May, P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
Zheng, L., Saunders, R.D.C., Fortini, D., Della Torre, A., Coluzzi, M., Glover, D.M. and Kafatos, F.C., 1991. Low-resolution genome map of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11187-11191.