

INTRODUCTION

Les progrès fulgurants de la biologie moléculaire et les importants travaux réalisés sur les drosophiles ont permis d'envisager le développement de moustiques génétiquement modifiés afin de réduire ou supprimer leur capacité vectorielle pour les agents pathogènes, en particulier les *Plasmodium* du paludisme humain (Besansky *et al.* 1992, James *et al.* 1992). Cet article, après quelques rappels, présente les étapes nécessaires pour arriver à un tel objectif, tente de montrer quelles pourraient être les limites de cet ambitieux programme et situe le rôle des entomologistes médicaux de terrain dans cette recherche sur les moustiques transgéniques.

DEFINITION D'UN ANIMAL TRANSGENIQUE

Animal qui a intégré une séquence d'ADN d'intérêt (un gène) introduite dans les cellules germinales, et qui la transmet de génération en génération.

Différent d'un animal chimérique, où l'intégration du gène se fait dans des cellules déjà différenciées.

POURQUOI DES MOUSTIQUES TRANSGENIQUES ?

Objectifs:

Développer des souches de moustiques réfractaires aux parasites (s.l.), compétitifs sur le terrain en vue d'un relâcher, ayant pour but une baisse ou un arrêt de la transmission.

Le gène introduit devra si possible être dominant, ainsi les hétérozygotes seront également réfractaires.

Gènes cibles:

tous ceux impliqués directement ou indirectement dans la transmission

exemples:

Hormones de développement, neuropeptides «Système immunitaire» des moustiques (mélanisation sous contrôle de la prophénoloxydase,

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

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

cecropin, attractin, reconnaissance ou non des sporozoïtes)

Gènes impliqués plus directement dans la capacité vectorielle: récepteurs et enzymes au niveau de la membrane péritrophique, de la paroi de l'estomac, des glandes salivaires, etc....

Gènes liés au comportement (préférences trophiques,...).

**COMMENT INTRODUIRE, ET FAIRE EXPRI-MER, UN GENE DANS UN INSECTE ?
L'EXEMPLE DE LA DROSOPHILE :
LES TRANSPOSONS**

Définition des transposons

Ils existent chez les bactéries et les eucaryotes. Ce sont des séquences d'ADN, codant généralement pour une protéine, pouvant se déplacer d'un site à un autre sur le chromosome, sans disparition de l'information du site original, selon un mécanisme proche de la réplication des rétrovirus. Ils possèdent généralement une séquence inversée-répétée (IR) et parfois une séquence LTR (long terminal repeat).

Le P élément de la drosophile

Certaines drosophiles possèdent un transposon de 2900 paires de bases, avec 4 cadres de lecture dont un codant pour une transposase. Il n'y a pas de LTR mais une séquence IR. Ce transposon appelé P élément a été très étudié. En raison des possibilités de déplacement de ces séquences sur le génome on a pensé à l'utiliser comme vecteur de gènes.

La méthodologie à appliquer est la suivante:

Utilisation d'un vecteur de clonage: plasmide bactérien, type pBR 322, contenant le P élément sans le gène de la transférase + polylinker + promoteur + marqueur de clonage.

Clonage du gène d'intérêt dans P élément.

Microinjection du plasmide dans l'embryon de drosophile (oeuf) avec un plasmide helper exprimant la transposase en trans mais ne pouvant pas lui même transposer (IR terminale incomplète).

25 MARS 1994

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire 83
N° : 39 173 ex 1
Date : 13

PM 253

Sélection des insectes transgéniques (par marqueur ex Rosy, Adh, Neo,...).

Expression du gène dans la souche transgénique.

LE DEVELOPPEMENT DE MOUSTIQUES TRANSGENIQUES

Historique:

Collins *et al.* (1986) obtiennent par sélection une souche d'*An. gambiae* réfractaire aux *Plasmodium*.

Miller *et al.* (1987) réussissent la première intégration stable (8 générations) d'un gène étranger chez *An. gambiae* (plasmide pUC hs néo, avec IR de P élément de drosophile + promoteur de hsp70 + gène de la résistance à néomycine).

McGrane *et al.* (1988) réussissent une intégration stable sur *Ae. triseriatus*.

Morris *et al.* (1989) réussissent une intégration stable sur *Ae. aegypti*;

Dans tous les cas l'intégration est aléatoire, indépendante du P élément, et très insuffisante, de l'ordre de 0,1%

Conclusion: le P élément de la drosophile ne se comporte pas comme un transposon, et ne peut pas être utilisé comme vecteur de gène pour les moustiques.

AM Fallon (1991): expériences réussies de transfection avec polybrène ou Phosphate de Ca, de cellules C6-36 et lipofection d'ADN via pUCHsneo dans des cellules germinales d'*Aedes triseriatus* et dans des lignées cellulaires, mais le taux d'intégration reste faible.

Développement

I- Il faut trouver un vecteur de gène performant permettant l'intégration dans l'ADN du moustique

Les approches actuelles semblent être les suivantes:

1) recherche de transposons de moustiques, du type P élément ou rétrotransposons (Bezansky s'intéresse à la question sur *An. gambiae* et Crampton sur *Ae. aegypti*, Mouchès sur *Culex* (1991)). Depuis quelques mois les recherches se portent sur les «Mariner transposable elements» présents en particulier chez *An. gambiae* (Kidwell 1993, Robertson 1993). L'objectif est la recherche de séquences moyennement répétées chez les moustiques, puis la comparaison avec des séquences déjà connues chez d'autres animaux.

2) Vecteurs viraux (Xiong *et al.* 1989) ex: virus Sinbis recombinant avec promoteur + gène bactérien (CAT). L'expression a été obtenue sur C6-36 et sur *Ae. triseriatus* mais pas il n'y a pas eu intégration. L'expression était transitoire, maximum à J4 chez les adultes.

3) Vecteurs bactériens (type *Wolbachia*, responsable de l'incompatibilité cytoplasmique chez les *Culex*, transmis par les femelles, Curtis 1992 a et b)

4) FLP-FRT du plasmide 2microns de la levure
FRT: 2 séquences inversées, site de recombinaison, FLP: recombinase qui reconnaît ces sites

Morris (1991): expression possible chez *Ae. aegypti* mais pas d'intégration dans le moustique.

II- Il faut trouver des **promoteurs et enhancers** efficaces et si possible endogènes: bonne expression, éventuellement spécifique de stades ou tissus.

Type hsp70, promoteur très fort de la drosophile. Ce promoteur peut, par ailleurs, en partie servir de marqueur d'intégration car les moustiques transgéniques l'ayant intégré survivent mieux que les autres après un choc thermique à 41°C

Evaluation des promoteurs des métallothioneines des drosophiles dans des cellules C6-36.

III- Il faut trouver les **gènes d'intérêt** agissant sur la transmission

- sélectionner, repérer des souches d'Anophèles «réfractaires s.l.» aux *Plasmodium*

- rechercher le gène responsable (devient possible grâce à cartographie)

Exemples: Collins (1986) mélanisation des oocystes sous control de la prophénoloxydase.

IV- Il faudra trouver des **marqueurs de l'intégration** du gène, si possible bien identifiables pour sélection (couleurs des yeux ?, ...)

V- Il faudra étudier et résoudre les **problèmes de lâcher sur le terrain**

Curtis signale un seul cas de succès de lâcher l'Anophèles modifiés: mâles stériles d'*An. albimanus*

Il va se poser de très nombreux problèmes. La liste suivante, non exhaustive, en présente quelques uns: **lés aux moustiques**

* Faudra-t-il chercher à réduire le nombre de moustiques infectés ou le nombre de sporozoïtes par moustiques (dans le cas du paludisme)? Le problème posé est le même que pour une lutte chimique, et la solution dépendra du niveau et de la périodicité de la transmission dans la zone «traitée».

* Compétitivité des moustiques sur le terrain : peut-être évitable si utilisation de transposons endogènes (c'est à dire de transposons présents dans la population de moustique de la zone à «traiter»)
Liés aux agents pathogènes

* Une modification des vecteurs pourrait entraîner une sélection des *plasmodium* échappant aux mécanismes bloquant la transmission.

Liés à l'homme

* Production

* Problèmes d'éthique : sécurité des souches transformées, interactions entre pathogènes, contrôle des souches transgéniques. Attention à ne pas être de nouveaux apprentis sorciers!

* Dans le cas de moustiques compétitifs, où et comment les utiliser ? Zones hypo/hyper-holo endémiques (mêmes questions que pour lutte chimique, vaccins,...).

CONCLUSION: INTERVENTIONS POSSIBLES DES EQUIPES DE RECHERCHE DE TERRAIN (OCEAC, OCCGE, ORSTOM,...)

La route est encore longue jusqu'au contrôle d'une maladie à transmission vectorielle par l'utilisation d'insectes issus du génie génétique. Cependant il y a peu de doute que d'ici quelques années des laboratoires ne «mettent sur le marché» ce type de «produit». A mon avis, la partie clonage, séquençage éventuel des gènes, devrait être faite dans des laboratoires de biologie moléculaire/génétique ayant déjà une grande expertise dans ce domaine, et avec lesquels les équipes de recherche de terrain pourraient collaborer étroitement. La connaissance du terrain, le fait d'être sur place, en situation, fait des entomologistes médicaux de terrain des maillons incontournables de la recherche sur les moustiques transgéniques. Leur participation se situe en amont et en aval de la recherche strictement moléculaire, en intervenant par exemple dans les domaines suivants:

En amont

- Sélection de souches réfractaires de terrain (élevages, tests)
- Identification de transposons sur des souches sauvages.
- Etudes de terrain avant intervention (génétique population, flux géniques, niveau de transmission, incidence palustre, morbidité..)
- Production de masse des moustiques
- Lâcher

En aval

- Suivi des populations de moustiques après lâcher (Bioécologie dont comportement résistance aux insecticides., génétique population, évolution du gène d'intérêt, niveau transmission,...)

- Suivi des populations humaines (morbidité, parasito, immuno,...)

- Taux de reproduction de base, modélisation ?

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- Collins, F.H., Sakai, R.K., Vernick, K.D., Paskewitz, S., Seeley, D.C., Miller, L.H., Collins, W.E., Campbell, C.C. and Gwadz, R.W., 1986. Genetic selection of a *Plasmodium-refractory* strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science*, 234: 607-610.
- Curtis, C.F., 1992a. Selfish genes in mosquitoes. *Nature*, 357: 450.
- Curtis, C.F., 1992b. Making mosquitoes harmless. *Parasitology Today*, 8 (9): 305.
- Fallon, A.M., 1991. DNA-mediated gene transfert: applications to mosquitoes. *Nature*, 352: 828-829.
- James A.A., 1992. Mosquito molecular genetics: the hands that feed bite back. *Science*, 257:37-38
- Kidwell, M.G. and Ribeiro, J.M.C., 1992. Can transposable elements be used to drive disease refractoriness genes into vector populations?. *Parasitology Today*, 8 (10): 325-329.
- Kidwell, M.G., 1993. Voyage of an ancient mariner. *Nature*, 362: 202;
- McGrane, V, Carlson, J.O., Miller B.R. and Beaty, B.J., 1988. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39 (5): 502-510.
- Mouchès, C., Agarwal, M., Campbell, K., Lamieux, L. and Abadon, M., 1991. Sequence of a truncated Line-like retroposon dispersed in the genome of *Culex* mosquitoes. *Gene*, 106: 279-280.
- Miller, L.H., Sakai, R.K., Romans, P., Gwadz, R.W., Kantoff, P. and Coon, H.G., 1987. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 237: 779-781.
- Morris, A.C., Eggleston, P. and Crampton, J.M., 1989. Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by microinjection of DNA. *Med. Vet. Entomol.*, 3: 1-7.
- Morris, A.C., Schaub, T.L. and James, A.A., 1991. FLP-mediated recombination in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Nucl. acids Res.*, 19 (21): 5895-5900.
- Robertson, H.M., 1993. The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature*, 362:242-245.
- Xiong, C., Levis, R, Shen, P., Schlesinger, S., Rice, C.M. and Huang, H.V., 1989. Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science*, 243:1188-1190.