

INTERET DE L'UTILISATION DES OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS L'ETUDE DE LA TRANSMISSION DU PALUDISME : L'EXEMPLE DES PROGRAMMES CONDUITS AU SENEGAL

D. FONTENILLE, M. DIATTA, L. KONATE, L. LOCHOUARN, J.-J. LEMASSON, N. DIAGNE, J.-F. MOLEZ, C. ROGIER, J.-F. TRAPE, O. FAYE

RESUME - Certaines informations sur la transmission du paludisme, jusqu'à présent difficiles à obtenir, peuvent maintenant l'être grâce à l'utilisation des outils de biologie moléculaire, en particulier la PCR. Au Sénégal, nous utilisons cet outil pour résoudre deux types de problèmes :

- L'identification des espèces du complexe *Anopheles gambiae* : l'intérêt majeur de la technique PCR par rapport aux autres méthodes de diagnostic (cytogénétique, sondes ADN, etc.) est l'identification rapide de tous les anophèles capturés, et ce seulement à partir de l'ADN contenu dans les pattes. Le reste du moustique est utilisé pour la recherche de l'antigène CSP et la détermination des repas de sang. Ces données permettent de préciser la répartition, les cycles, les préférences trophiques et le rôle vecteur respectif d'*Anopheles gambiae*, d'*Anopheles arabiensis* et d'*Anopheles melas*.

- L'identification de l'individu piqué dans un repas de sang de moustique : l'objectif est d'évaluer les facteurs d'attraction d'un individu pour un anophèle (poids, âge, sexe, localisation dans un village, etc.). Un typage génétique est réalisé à partir de l'ADN des leucocytes des habitants et des leucocytes contenus dans les repas sanguins des moustiques capturés parmi la faune résiduelle des chambres. Grâce au polymorphisme élevé de trois séquences contenant des marqueurs microsatellites (AAAG)_n, nous espérons pouvoir rattacher chaque repas de sang à un individu. L'analyse statistique permettra d'identifier les facteurs d'attraction et de définir de façon plus proche de la réalité le taux moyen d'inoculation pour chaque groupe d'individus que les classiques captures sur homme adulte volontaire.

MOTS-CLES - *Anopheles gambiae*, paludisme, PCR, Sénégal.

THE USE OF MOLECULAR TOOLS FOR THE STUDY OF MALARIA TRANSMISSION. THE EXAMPLE OF RESEARCH PROGRAMMES CARRIED OUT IN SENEGAL.

ABSTRACT - Some informations about malaria transmission, which has until now difficult to get, can be obtained thanks to the use of molecular biology tools, PCR mainly. In Senegal, we use that technique to solve two kinds of problems :

- Identification of species of the *Anopheles gambiae* complex : PCR technique is useful compared to other diagnostic methods (chromosome pattern, DNA probes, etc.) because it enables quickly and simply identification of captured anophèles from the DNA contained in their legs. The rest of the mosquito is tested by circumsporozoite protein antigen ELISA and blood meal ELISA. The data obtained are used to determine distribution, cycles, trophic preferences and comparative vectorial capacities of *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles melas*.

- Identification in a mosquito blood meal of the individual bitten : we propose to evaluate factors (weight, age, sex, location of bedroom, etc.) which could explain why individuals are more, or less, bitten by a *Plasmodium* vector. Genetic typing is used on inhabitants' leukocytes DNA and on the leukocyte DNA extracted from the blood meal of resting anophèles. Through the high degree of polymorphism of three (AAAG)_n microsatellites markers, we hope, using PCR, to attribute each blood meal to one individual. Statistical analysis will be used to identify attractivity factors and to determine more precisely the inoculation rates for each group rather than the classical rate calculated with male adults volunteers.

KEY WORDS - *Anopheles gambiae*, malaria, PCR, Senegal.

- Travail des Laboratoires de Zoologie médicale et de Paludologie de l'ORSTOM, Dakar (D.F., MD PhD ; M.D., biologiste ; L.L., biologiste ; J.-J. L., biologiste ; N.D., biologiste ; J.-F. M., MD ; J.-F. T., MD PhD), du Département de Biologie animale, Université Cheik Anta Diop, Dakar (I.K., biologiste ; O.F., biologiste) et de l'Institut Pasteur de Dakar, Sénégal (C.R., médecin des armées).

- Correspondance : Didier FONTENILLE, ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.

(Med. Trop. 1995 ; 55 : 52S-55S)

Depuis quelques années, des outils de biologie moléculaire simples, tels que la PCR (réaction de polymérisation en chaîne), sont disponibles pour compléter les outils de l'entomologiste et l'aider à mieux comprendre la transmission du paludisme par les anophèles.

Au Sénégal nous utilisons la PCR pour identifier les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et tâcher d'identifier le ou les individus piqués par un moustique donné.

Fonds Documentaire ORSTOM
Cote : B* 5108 Ex : 1



IDENTIFICATION DES ESPECES DU COMPLEXE ANOPHELES GAMBIAE

Intérêt de l'utilisation de la PCR

Les anophèles du complexe *Anopheles gambiae* sont, avec *Anopheles funestus*, les vecteurs majeurs du paludisme en Afrique. Trois espèces de ce complexe ont été signalées au Sénégal : *Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae* et *Anopheles melas*.

La détermination précise de l'espèce ne peut pas être faite morphologiquement. Les principales méthodes utilisées sont l'étude cytogénétique des chromosomes (1), l'analyse d'isoenzymes (2), l'analyse des hydrocarbures cuticulaires (3), les sondes ADN (4) et depuis peu la technique PCR (5, 6). Quatre amorces de 20 nucléotides distinguant des différences spécifiques d'espèces dans les séquences d'espacement non traduites des gènes ribosomiaux très répétés (*Ribosomal DNA intergenic spacers*) sont utilisées (6) (Fig. 1).

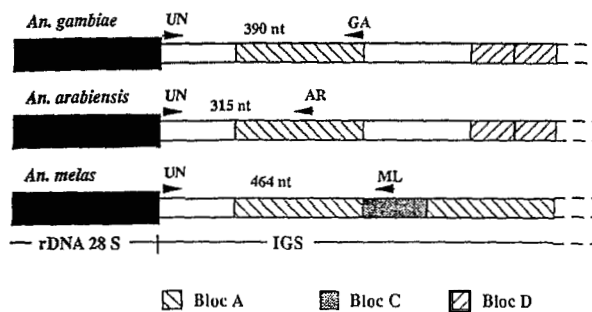


Figure 1 - Emplacement des amorces diagnostiques d'*Anopheles gambiae*, d'*Anopheles arabiensis* et d'*Anopheles melas* (d'après SCOTT et coll.).

Une ou plusieurs pattes sont broyées et le DNA extrait est ajouté au milieu réactionnel contenant le tampon de réaction, des dNTPs, les amorces, la Taq polymérase. L'amplification se fait selon les conditions suivantes : 5 minutes à 94°C suivies par 30 cycles (dénaturation pendant 1 minute à 94°C, hybridation pendant 50 secondes à 50°C et élongation à 72°C pendant 50 secondes) et 5 minutes à 72°C. Les échantillons amplifiés subissent une électrophorèse sur gel d'agarose. La taille des fragments obtenus est respectivement de 315, 390 et 464 paires de bases pour *Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae* et *Anopheles melas*.

L'intérêt majeur de la technique PCR est l'identification de tous les anophèles du complexe *gambiae* capturés, et ce seulement à partir des pattes, contrairement à l'étude cytogénétique qui nécessite d'avoir des femelles semi-gravidées et une grande expérience pour l'interprétation (7). Le reste du moustique est utilisé pour la recherche par ELISA de l'antigène *circumsporozoite protein* (CSP) et l'analyse par ELISA des repas sanguins. Pour la PCR, le moustique est conservé simplement dans un tube avec un dessiccateur. La technique est simple mais encore onéreuse, 2 US\$ par moustique, et elle nécessite un matériel adapté (*Thermocycler*, matériel d'électrophorèse).

La PCR alliée aux autres techniques classiques de l'entomologie médicale (dissection, ELISA) permet

de préciser quels vecteurs transmettent quels *Plasmodium*, où, quand et à quel taux ils transmettent. La technique PCR pour *Anopheles gambiae* est maintenant utilisée en routine pour l'ensemble des études entomologiques réalisées au Sénégal, sur les anophèles capturés sur homme et dans les faunes résiduelles. L'exemple choisi pour illustrer l'intérêt de la technique concerne les études réalisées à Dielmo dans le Sine Saloum.

L'exemple de la transmission à Dielmo

La détermination par PCR des anophèles membres du complexe *Anopheles gambiae* permet de connaître la part respective de chaque espèce dans les captures selon le lieu, la méthode de capture et la période de l'année. Ainsi à Dielmo *Anopheles arabiensis* a été beaucoup plus capturé en 1993-1994 que l'année précédente (Fig. 2).

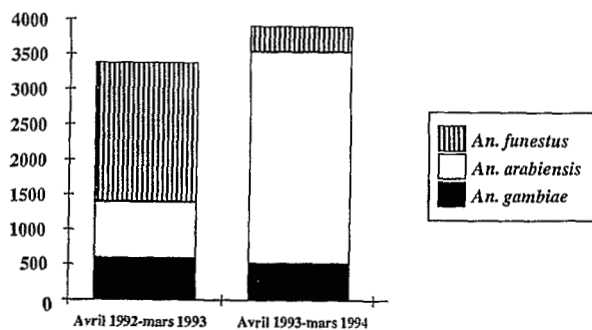


Figure 2 - Nombre de moustiques d'espèces vectrices capturés par an (144 hommes/nuits) sur homme à Dielmo.

Anopheles gambiae est proportionnellement plus représenté dans les captures de la faune résiduelle que dans les captures sur homme (Fig. 3).

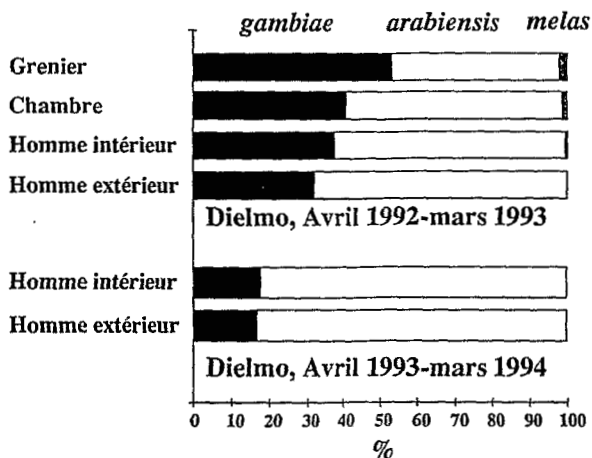


Figure 3 - Proportions des espèces du complexe *Anopheles gambiae* en fonction de la méthode et du lieu de capture.

Or les enquêtes utilisant la méthode cytogénétique étudient généralement la population endophile alors que les données sur la transmission sont plutôt obtenues à partir des captures sur homme. Si *Anopheles gambiae*

est un meilleur vecteur qu'*Anopheles arabiensis*, on risque donc de surestimer la transmission en ne s'intéressant qu'aux échantillons de la faune résiduelle. Les différences parmi les espèces du complexe *Anopheles gambiae* sont encore plus nettes si on analyse les variations au cours du temps (Fig. 4).

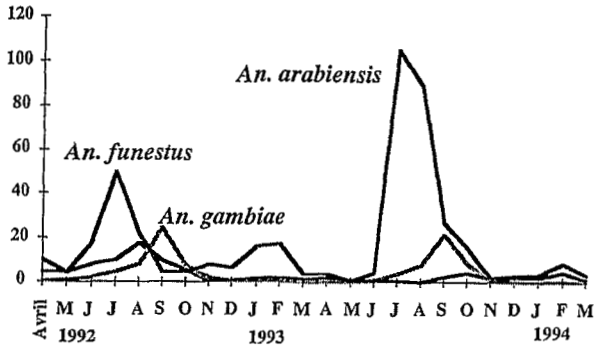


Figure 4 - Nombre de piqûres par homme par nuit à Dielmo selon le mois pour *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus*.

La proportion relative d'*Anopheles gambiae* est plus élevée en saison des pluies qu'en saison sèche (53 % en août-septembre 1992 et 27 % en août-septembre 1993, contre 4 % en janvier-février 1993 et 16 % en janvier-février 1994). La PCR associée à l'analyse des repas sanguins par ELISA a également permis de préciser les préférences trophiques des vecteurs : en 1992-1993 à Dielmo, le taux d'anthropophilie des *Anopheles gambiae* capturés dans les chambres était de 74 %, celui d'*Anopheles arabiensis* de 70 % et celui d'*Anopheles funestus* de 86 %. Cette technique permet de connaître les cycles annuels d'agressivité pour chaque espèce (Fig. 4). Les pics d'abondance d'*Anopheles funestus*, d'*Anopheles arabiensis* se succèdent au cours du temps. A Dielmo, *Anopheles funestus* a été l'espèce dominante en 1992-1993, alors que c'était *Anopheles arabiensis* en 1993-1994. Cependant, l'observation du taux d'agressivité n'est pas une donnée suffisante pour évaluer la transmission : seul le taux d'inoculation entomologique calculé à partir de l'agressivité et de l'indice sporozoïtique permet de déterminer la part prise par chaque espèce dans la transmission. Ainsi en 1992-1993, *Anopheles funestus* qui était abondant et qui présentait un indice sporozoïtique de 3,0 % a assuré l'essentiel de la transmission toute l'année. Parmi les espèces du complexe *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* bien que légèrement plus abondant, mais avec un indice sporozoïtique de 0,7 %, a joué un rôle moindre dans la transmission qu'*Anopheles gambiae* qui avait un indice sporozoïtique de 2,9 %. Inversement, en 1993-1994 la transmission a été assurée essentiellement par *Anopheles arabiensis* en raison de sa très grande abondance par rapport aux autres vecteurs.

IDENTIFICATION DE L'INDIVIDU PIQUE DANS UN REPAS DE SANG DE MOUSTIQUE

On sait que chaque individu n'est pas piqué de façon équivalente par les anophèles vecteurs de *Plasmodium* (8). Les enfants, en particulier, semblent moins

piqués que les adultes (9, 10). Or le développement de l'immunité est lié au nombre de piqûres infectantes que reçoit un individu. De plus, en zone d'holo-endémicité, on n'a pas encore estimé précisément l'impact des piqûres infectantes sur la parasitémie, la survenue d'accès palustres et les réponses immunitaires, selon les classes d'âge. Chez les enfants en particulier on ne connaît pas la proportion de piqûres infectantes qui aboutit à une parasitémie et/ou à un accès palustre. Dans les études classiques de mesure de la transmission, le nombre moyen de piqûres infectantes par homme par période de temps (nuit, mois ou année) est toujours calculé à partir de captures sur adultes, généralement des hommes volontaires. Seule la détermination du nombre de piqûres reçues au niveau individuel peut permettre de contourner ce biais important et d'estimer plus précisément les effets parasitologiques, cliniques et immunologiques des piqûres infectantes. Les premières études sur ce sujet avaient utilisé le polymorphisme très limité des groupes sanguins (11). Depuis peu, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, il est possible de retrouver à partir de l'étude par PCR de gènes microsatellites de l'ADN des leucocytes contenus dans le repas de sang, l'individu qui a été piqué (12, 13, 14).

Notre étude, qui n'en est qu'à son début, se propose d'identifier les facteurs influençant l'agressivité des vecteurs de *Plasmodium* selon les individus (poids, âge, surface corporelle, sexe, nature de l'habitation, localisation dans le village, etc). Une «carte génétique» individuelle est réalisée, en même temps à partir de l'ADN des leucocytes des habitants et des leucocytes humains contenus dans

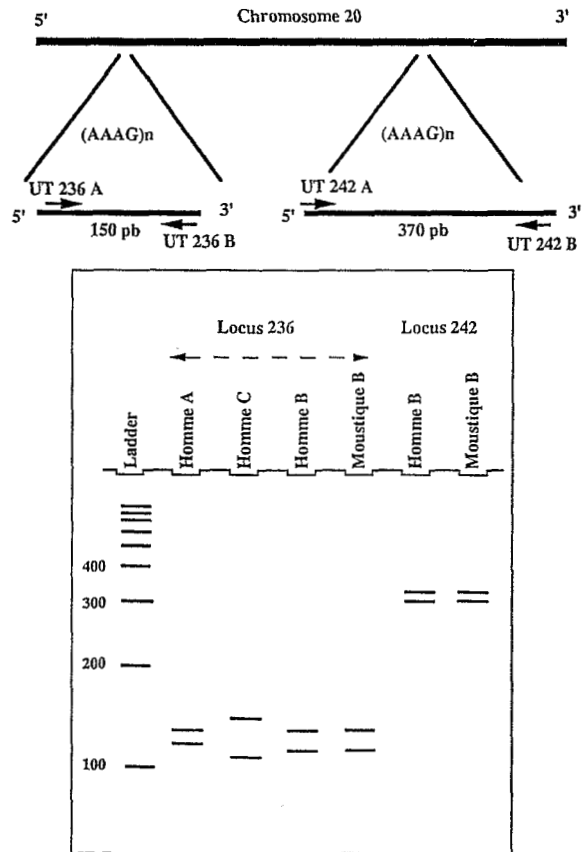


Figure 5 - Exemple d'identification de l'individu piqué dans un repas de sang de moustique.

les repas de sang de moustiques gorgés capturés dans la faune résiduelle des chambres. Grâce au polymorphisme élevé de trois séquences contenant des marqueurs micro-satellites (AAAG)_n situés sur le chromosome 20 (15), nous espérons, par PCR et comparaison des profils électrophorétiques obtenus, pouvoir rattacher chaque repas de sang à un individu (Fig. 5).

L'analyse statistique devrait permettre d'identifier les facteurs d'attractivité et de définir de façon beaucoup plus proche de la réalité le taux moyen d'inoculation pour chaque groupe d'individus que ne le permettent les classiques captures sur homme adulte volontaire.

CONCLUSION

L'utilisation des techniques PCR dans l'évaluation de la transmission du paludisme, en complément des méthodes plus classiques, permet de répondre à des questions jusqu'alors sans réponse. Ces techniques ne sont pas un but en soi, mais un outil supplémentaire pouvant être utilisé dans la plupart des pays du Sud. Si le coût en est encore relativement élevé, la méthodologie est généralement simple et les informations attendues considérables.

Remerciements - Ces études sont financées par le Ministère Français de la Coopération et du Développement (Appel d'offres Paludisme) et l'Institut Français de recherche scientifique pour le développement en coopération (ORSTOM).

REFERENCES

- 1 - COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V., DI DECO M.A. - Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1979 ; 73 : 483-497.
- 2 - MILES S.J. - A biochemical key to adult member of the *Anopheles gambiae* group of species (Diptera : culicidae). *J. Med. Entomol.* 1979 ; 15 : 297-299.
- 3 - CARLSON D.A., SERVICE M.V. - Identification of mosquitoes of the *Anopheles gambiae* species complex A and B by analysis of cuticular components. *Science* 1980 ; 207 : 1089-1091.
- 4 - GALE K.R., CRAMPTON, M.C. - DNA probes for species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Med. Vet. Entomol.* 1987 ; 1 : 127-136.
- 5 - PASKEWITZ S.M., COLLINS F.H. - Use of polymerase chain reaction to identify mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. *Med. Vet. Entomol.* 1990 ; 4 : 367-373.
- 6 - SCOTT J.A., BROGDON W.G., COLLINS F.H. - Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993 ; 49 : 520-529.
- 7 - FONTENILLE D., FAYE O., KONATE L., SY N., COLLINS F.H. - Comparaison des techniques PCR et cytogénétique pour la détermination des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Sénégal. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1993 ; 68 : 239-240.
- 8 - BURKOT T.R. - Non-random host selection by anopheline mosquitoes. *Parasitology today* 1988 ; 4 : 156-162.
- 9 - CARNEVALE P., FREZIL J.L., BOSSENSO M.F., LE PONT F., LANCIEN J. - Etude de l'agressivité d'*Anopheles gambiae* A en fonction de l'âge et du sexe des sujets humains. *Bull. OMS.* 1978 ; 56 : 147-154.
- 10 - PORT G.R., BOREHAM P.F.L. - The relationship of host size to feeding by mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera : Culicidae). *Bull. ent. Res.* 1980 ; 70 : 133-144.
- 11 - BRYAN J.H., SMALLEY M.E. - The use of ABO blood groups as markers for mosquito biting studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1978 ; 72 : 357-360.
- 12 - COULSON R.M.R., CURTIS C.F., READY P.D., HILL N., SMITH D.F. - Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Med. Vet. Entomol.* 1990 ; 4 : 357-366.
- 13 - GOKOOL S., SMITH D.F., CURTIS C.F. - The use of PCR to help quantify the protection provided by impregnated bednets. *Parasitology today* 1992 ; 8 : 347-350.
- 14 - WEBER J.L., MAY P.E. - Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 1989 ; 44 : 388-396.
- 15 - MELIS R., BRADLEY P., ELSNER T., ROBERTSON M., LAWRENCE E., GERKEN S., ALBERTSEN H., WHITE R. - Polymorphic SSR (simple-sequence-repeat) markers for chromosome 20. *Genomics* 1993 ; 16 : 56-62.