

# FLUX GÉNIQUES CHEZ *ANOPHELES GAMBIAE*, VECTEUR DU PALUDISME. IMPLICATION DANS LA TRANSMISSION

SIMARD F., DIATTA M., LEMASSON J.J., LEHMANN T., COLLINS F., FONTENILLE D.

## Résumé :

L'étude de la génétique des populations des anophèles du complexe *Anopheles gambiae* s.l., principal vecteur du paludisme humain en Afrique a été entreprise au laboratoire ORSTOM de Zoologie Médicale grâce à l'utilisation de marqueurs neutres très polymorphes appelés Microsatellites. Une connaissance approfondie de la structure des populations de vecteurs et des flux de gène qui la régissent est aujourd'hui nécessaire afin de mieux comprendre et expliquer leur biologie et d'estimer avec précision l'impact des moyens de lutte actuellement mis en œuvre ainsi que l'efficacité potentielle de nouvelles stratégies de contrôle de ces populations.

Quatre populations d'anophèles ont ainsi été traitées dans cette étude. Les moustiques ont été prélevés en début et en fin de saison des pluies à Barkedji (Vallée du Ferlo) au cours des hivernages 1994 et 1995. L'ADN extrait de chaque individu a été amplifié par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) au niveau de trois loci microsatellites sélectionnés sur le génome d'*An. gambiae*. Après dépôt des amplifiats sur gel de polyacrylamide et coloration rapide au nitrate d'argent, les génotypes individuels ont pu être obtenus et les différents lots ont été comparés en termes de fréquences alléliques. Le principe de cette étude ainsi que les résultats préliminaires obtenus sont exposés ici.

## INTRODUCTION

*An. gambiae* et *An. arabiensis* sont les principaux vecteurs du paludisme humain en Afrique. L'approche entomologique de ce problème de santé publique vise à limiter l'aptitude des vecteurs à transmettre le parasite: elle nécessite donc une connaissance approfondie de l'écologie des populations vectorielles afin d'optimiser les moyens de contrôle actuellement utilisés (insecticides, moustiquaires ou destruction des gîtes larvaires potentiels).

L'utilisation massive d'insecticides tels que la deltaméthrine conduit inévitablement à l'apparition de gènes de résistance dont il est primordial d'estimer la capacité de diffusion intra- et inter-espèce. Dans cette optique, il apparaît nécessaire de connaître la génétique des populations des anophèles vecteurs. En effet, la cinétique d'invasion et la possibilité de fixation d'un gène introduit dans une population constituée de plusieurs sous-groupes seront évidemment influencées par l'existence de barrières reproductives ou d'autres types de croisements non viables entre ces différents taxons qu'il convient de mettre en évidence. Ces études de génétique des populations pourront également permettre d'estimer l'efficacité potentielle de nouveaux moyens de lutte anti-vectorielle tels que l'utilisation de moustiques transgéniques à capacité vectorielle altérée. Sur la base d'études cytologiques d'inversions chromosomiques, plusieurs «formes» chromosomiques distinctes et très structurées à l'intérieur même du taxon *An. gambiae* s.s. ont été identifiées. L'existence de barrières restreignant ou interdisant totalement un flux de gènes entre ces différents «écophénotypes» a également été démontrée (COLUZZI *et al.*, 1985).

Actuellement, l'étude du polymorphisme de petites séquences répétées d'ADN non codant appelées microsatellites représente l'outil de choix pour ce type d'investigations. L'amplification par la technique de polymérisation en chaîne (P.C.R.) de ces différents loci très répandus chez les eucaryotes et extrêmement polymorphes est très informative et bénéficie d'une mise en œuvre relativement aisée. Les différents lots de moustiques ainsi traités sont comparés en termes de fréquence allélique pour chaque locus microsatellite sélectionné. Cette technique a été appliquée au laboratoire de Zoologie Médicale de l'ORSTOM à l'Institut Pasteur de Dakar dans le but d'identifier différentes populations existant au Sénégal, d'étudier leurs interrelations et les flux de gènes possibles entre ces populations ainsi que leur évolution dans des zones à transmission discontinue.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### • Origine des moustiques testés:

#### - Zone d'étude

Le village de BARKEDJI dans la vallée du Ferlo, vaste région sous-peuplée du Nord du Sénégal (domaine sahélien) a été sélectionné en raison de sa courte saison des pluies (300 à 400 mm de pluie de juillet à octobre) et de l'existence de gîtes à anophèles bien identifiés (mares temporaires autour du village qui se remplissent avec les pluies et s'assèchent complètement aux environs du mois de Janvier).

#### - Méthodologie

Les spécimens d'*Anopheles gambiae* et d'*Anopheles arabiensis* ont été prélevés soit par captures nocturnes sur appâts humains volontaires, soit par pulvérisation de pyrèthrinoides dans les chambres. Différents lots ont ainsi été constitués en début et en fin de saison des pluies au cours des hivernages 1994 et 1995. Après identification morphologique à la loupe sur le terrain, les moustiques du complexe *An. gambiae* sont soumis à l'identification spécifique par PCR selon le protocole décrit par SCOTT *et al.*, 1993.

### • Méthode d'investigation: la technique PCR

#### - Description des primers utilisés

Les caractéristiques des 3 loci microsatellites sélectionnés sur le génome d'*An. gambiae* sont présentées dans le tableau 1.

#### - Extraction de l'ADN à partir des pattes de moustiques

L'ADN est extrait à partir des pattes de moustiques par la méthode au Chelex® 100 d'après le protocole de WALSH *et al.* modifié.

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : B \* 15445 Ex : 1

\* ORSTOM, BP 1386, Dakar

\*\* Div. parasitic diseases, CDC, Atlanta, USA

Fonds Documentaire ORSTOM



010015445

**- Paramètres de la PCR**

La PCR est réalisée sur Perkin-Elmer 9600 thermal cycler dans un volume réactionnel de 25 µl. Le milieu réactionnel est constitué de tampon de PCR Perkin-Elmer, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 1 unité de Taq polymérase (AmpliTaq® DNA Polymerase Perkin Elmer) par tube et 20 ng par tube de chaque amorce.

Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes: dénaturation à 94°C 5 minutes, suivie de 30 cycles composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 25 secondes, d'appariement à 55°C pendant 28 secondes et d'élongation à 72°C pendant 30 secondes. La dernière étape d'élongation est prolongée par un maintien à 72°C pendant 10 minutes.

**- Electrophorèse**

Les amplifiats sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide à 10% et l'électrophorèse est réalisée en conditions non dénaturantes à 50 mA par gel en tampon TBE (Tris-Borate-EDTA, pH=8,9). Les bandes sont révélées par coloration rapide au nitrate d'argent. Trois types de marqueurs de taille sont utilisés: deux marqueurs Pharmacia 100 paires de bases (pb) et 20 pb respectivement et une «échelle interne 4 pb» réalisée au laboratoire par pool de plusieurs amplifiats sélectionnés permettant de déterminer précisément la taille des fragments observés.

**• Traitement des données**

Les résultats obtenus pour chaque lot et pour chaque locus sont analysés grâce au programme informatique GENEPOP (version 1.2) écrit par Raymond et Rousset (1995). L'équilibre d'Hardy-Weinberg est ainsi testé dans chaque cas (Weir 1990) et les fréquences alléliques sont comparées pour tous les lots deux à deux grâce à l'analyse par F-statistics (Wright 1978, Weir and Cockerham 1984).

**RÉSULTATS**

Les résultats présentés ne concernent que les moustiques prélevés en début de saison des pluies pour les années 1994 et 1995 que nous avons testés pour les loci 29C1, 119 et 24D.

**• Résultats par locus**

Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 1, 2, et 3, respectivement pour les loci 29C1, 119 et 24D et dans le tableau 2.

Le nombre, la répartition et la fréquence des différents allèles est très variable suivant le locus considéré.

Le locus 29C1 ne présente que deux allèles de tailles respectives 145 et 148pb. L'allèle 145pb est très représenté chez *An. arabiensis* alors qu'il est beaucoup plus rare chez *An. gambiae*. L'allèle 148pb est quant à lui majoritaire chez *An. gambiae* et très peu présent chez *An. arabiensis* (fig 1).

Le locus 119 montre, quelque soit l'échantillon considéré, une répartition des fréquences alléliques en courbe de Gauss sur un maximum de 9 allèles de 173 à 189pb. L'allèle majoritaire varie suivant le lot considéré (fig 2, tableau 2).

Nous avons détecté 7 allèles pour le locus 24D sur l'ensemble des moustiques testés, migrant de 103 à 123pb. Pour chaque population testée, on observe deux pics de fréquence allélique: l'un autour de l'allèle 105pb, majoritaire quelque soit l'échantillon considéré et le second autour de l'allèle 121pb (fig 3).

L'équilibre d'Hardy-Weinberg est respecté dans tous les cas ( $p.HW \gg 0,05$ ) bien qu'on constate souvent un excès ( $Fis > 0$ ) ou un déficit ( $Fis < 0$ ) en hétérozygotes observés par rapport à la fréquence théorique (tableau 2).

**• Comparaison deux à deux des différents échantillons (tableau 3)**

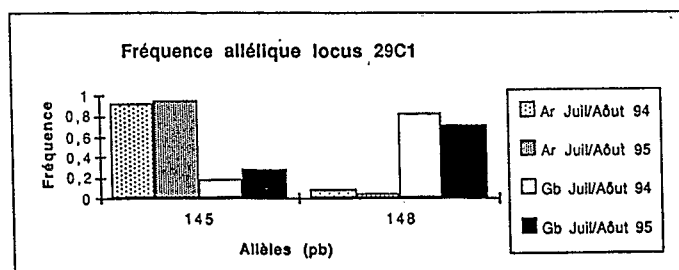
Pour chaque locus, le programme GENEPOP (version 1.2) nous a permis de comparer deux à deux les paramètres répertoriés dans le tableau 2 pour chacun des lots de moustiques testés.

Les loci 29C1 et 119 discernent de façon très significative les populations d'*An. gambiae* des populations d'*An. arabiensis* ( $P < 0,05$ ) mais ne mettent pas en évidence de sous-populations distinctes à l'intérieur de ces deux espèces. Ils sont spécifiques d'espèce et s'avèrent donc de mauvais marqueurs pour le type de travail entrepris.

Le locus 24D, quant à lui, bien que reconnaissant la spéciation *An. arabiensis* / *An. gambiae* uniquement dans le cas des échantillons prélevés en 1995 ( $p=0,014$ ) semble néanmoins capable de différencier les deux populations d'*An. gambiae* testées, mais avec une probabilité qui reste à la limite de la signification ( $p=0,047$ ).

**Tableau 1 :**  
Description des trois loci microsatellites sélectionnés chez *An. gambiae*

Locus	Localisation chromo-somique	Motif répété	Primer L	Primer R	Nb Allèles	pb
119	III 119	GT	ATGCCAGCGGATACGATTCCG	GGTTGATGCTGAAGAGTGGG	9	180
29C1	IIIR 29C	TGA	TGTTGCCGGTTTGTTCGTGA	ATGTTCCAGAGACGACCCAT	2	148
24D	X. 24 D	CT	GGCCGACGAGTTCATCAAGT	CGTCTGGAAGTTCGTTGAG	6	110



**Figure 1 :**  
Répartition des fréquences alléliques pour le locus 29C1

Tableau II :  
Résultats obtenus par locus et par lot de moustiques testés

Pop	N	Nb Allèles	% Allèle majoritaire	Taille (pb)	pHW (Coef. erreur)	Fis (Weir, 1984)	
2 9 C 1	Ar Juil/Août 94	12	2	0,917	145	1 (0,000)	-0,048
	Gb Juil/Août 94	12	2	0,818	148	0,28 (0,003)	0,429
	Ar Juil/Août 95	11	2	0,955	145	1 (0,000)	0,000
	Gb Juil/Août 95	7	2	0,714	148	0,44 (0,002)	0,368
1 1 9	Ar Juil/Août 94	12	6	0,375	175	0,34 (0,019)	0,111
	Gb Juil/Août 94	12	8	0,250	179/181	0,99 (0,002)	-0,076
	Ar Juil/Août 95	12	4	0,375	177	0,23 (0,006)	-0,021
	Gb Juil/Août 95	12	7	0,292	177	0,16 (0,016)	0,000
2 4 D	Ar Juil/Août 94	12	4	0,458	105	0,33 (0,009)	0,069
	Gb Juil/Août 94	11	6	0,500	105	0,35 (0,019)	0,250
	Ar Juil/Août 95	12	4	0,667	105	1 (0,000)	-0,285
	Gb Juil/Août 95	12	3	0,292	105	1 (0,000)	-0,055

N = Effectif de l'échantillon testé

pHW = Probabilité que la population testée réponde à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (significatif si  $P > 0,05$ ). Fis : quantifie le déficit en hétérozygote par population pour chaque locus.

Ar = *Anopheles arabiensis* ; Gb = *Anopheles gambiae* s.s.

Tableau III :  
Comparaison des différents lots testés deux à deux par Genepop (Populations différentes si  $p < 0,05$ )

	Locus 29 C1	Locus 119	Locus 24D
Ar Juil/Août 94 et Gb Juil/Août 94	0,000	0,023	0,142
Ar Juil/Août 94 et Ar Juil/Août 95	1,000	0,294	0,065
Ar Juil/Août 94 et Gb Juil/Août 95	0,001	0,002	0,118
Gb Juil/Août 94 et Ar Juil/Août 95	0,000	0,019	0,623
Gb Juil/Août 94 et Gb Juil/Août 95	0,676	0,150	0,047
Ar Juil/Août 95 et Gb Juil/Août 95	0,000	0,001	0,014

P = Probabilité d'homogénéité des fréquences alléliques entre deux populations

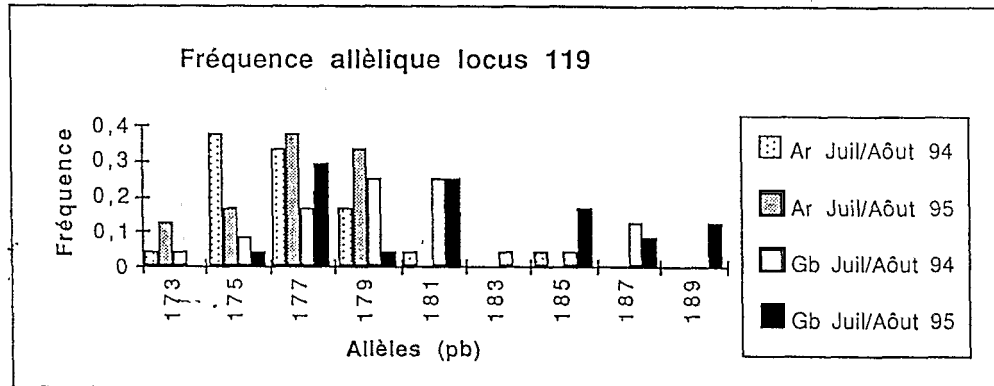


Figure 2 :  
Répartition des fréquences alléliques pour le locus 119

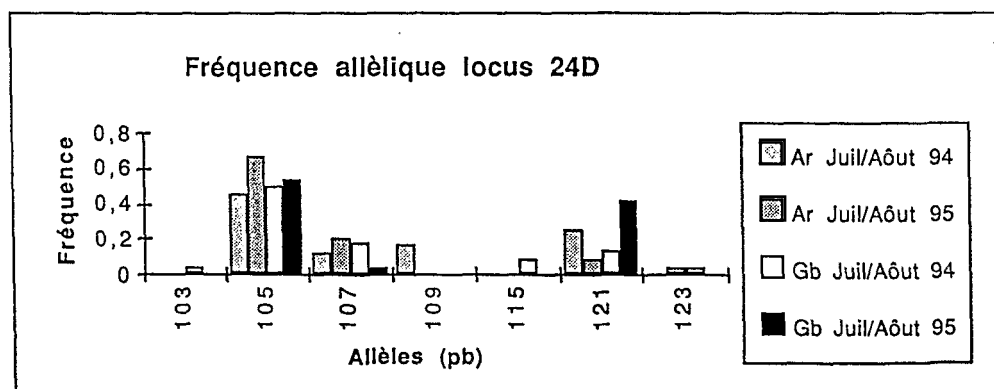


Figure 3 :  
Répartition des fréquences alléliques pour le locus 24 D

## DISCUSSION

La comparaison dans l'espace et dans le temps de différents lots de moustiques appartenant à la même espèce dans le but d'observer des différences au niveau de l'organisation génétique est une étude nécessaire pour mieux comprendre et expliquer les différences comportementales observées sur le terrain chez les populations vectorielles ainsi que les relations entre ces différents vecteurs du paludisme. La mise en évidence de sous-populations fixées à l'intérieur d'une même espèce et la compréhension des lois qui régissent leurs interrelations sont primordiales. L'étude qualitative et quantitative des flux de gènes qui existent entre les vecteurs est très informative en ce qui concerne le suivi de la diffusion des gènes de résistance aux insecticides et la cinétique d'invasion des différentes sous-populations par un gène donné. Dans l'optique d'une lutte anti-vectorielle par lâcher de mâles stériles ou par l'intermédiaire de moustiques transformés génétiquement à capacité vectorielle altérée, la mise en évidence d'éventuelles barrières reproductives à l'intérieur d'une même espèce est d'une importance capitale.

La comparaison dans l'espace des différents profils obtenus au niveau de loci très polymorphes permet d'évaluer le taux de migration des moustiques, d'étudier leur diffusion spatiale, de quantifier l'importance des échanges géniques entre populations et éventuellement de corrélérer à l'adaptation à un certain biotope, une organisation génétique particulière.

L'étude des variations de la fréquence allélique dans le temps trouve son application surtout dans les zones à transmission discontinue (alternance saison sèche / saison des pluies avec présence uniquement de gîtes temporaires) dans la mesure où elle pourra apporter des éléments sur le devenir des moustiques en saison sèche. Par comparaison des profils des populations prélevées, il devrait être possible d'opter soit pour un phénomène de colonisation et recolonisation de ces sites à chaque hivernage par de nouvelles femelles fondatrices chaque année, soit pour un phénomène de descendance directe d'une année sur l'autre des populations vectorielles peuplant ces sites. La sauvegarde de la population serait dans ce cas due à l'hivernation des femelles pendant la saison sèche ou à la persistance des oeufs jusqu'à la première remise en eau des mares temporaires.

Les résultats préliminaires exposés ici ne nous ont pour l'instant pas permis de distinguer différentes sous-populations au sein des deux espèces du complexe *An. gambiae* que nous avons étudiées. Les loci que nous avons sélectionnés sur la base d'un important polymorphisme (locus 119 et 24D) ou d'une bonne différenciation *An. gambiae*/*An. arabiensis* (locus 29C1) se sont avérés peu informatifs au niveau de la détection de sous-populations et ne permettent donc aucune interprétation en termes de génétique des populations. La déviation non significative observée par rapport à l'équilibre théorique d'Hardy-Weinberg (valeur de Fis) est liée au faible effectif des échantillons testés. Il apparaît maintenant nécessaire d'augmenter la quantité de données concernant le locus 24D qui semble capable de souligner une spéciation à l'intérieur de l'espèce *Anopheles gambiae* s.s. Mais, le fait qu'il ne mette pas en évidence de différences significatives entre les espèces *An. gambiae* et *An.*

*arabiensis* collectées en 1994 nous pousse à vérifier la valeur du précédent résultat. D'autres loci microsatellites spécifiques du complexe *An. gambiae* sont actuellement testés au laboratoire dans le but de sélectionner de nouveaux marqueurs plus informatifs.

## BIBLIOGRAPHIE

- **Coluzzi M., Petrarca V., Di Deco M. 1985**  
Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*.  
*Boll. Zool.* 52: 45-63.
- **Raymond M., Rousset F. 1995.**  
Genepop (version 1.2) a population genetics software for exact tests and ecumenicism.  
*Journal of Heredity* 86: in press.
- **Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H. 1993.**  
Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction.  
*Am. J. Trop. Hyg.* 49 (4): 520-529.
- **Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. 1991.**  
Chelex® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material.  
*BioTechniques* 10 (4): 506-513.
- **Weir B.S. 1990.**  
Genetic Data Analysis.  
*Sinauer Associates Inc. Sunderland MA.*
- **Weir B.S. and Cockerham C.C. 1984.**  
Estimating F-statistics for the analysis of population structure.  
*Evolution* 38: 1358-1370.
- **Wright S. 1978.**  
Evolution and the Genetics of Populations Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations.  
*University of Chicago Press, Chicago.*

# DAKAR MEDICAL



S.G. ISSN 0049 - 1101

## Bulletin de la Société Médicale d'Afrique Noire de Langue Française

### COMMUNICATIONS

Données récentes de l'épidémiologie de la Fièvre de la Vallée du Rift (F.V.R.) au Sénégal (THIONGANE Y. et coll.)	1	La thrombose portale en milieu tropical : à propos d'une étude échographique prospective (60 cas). (KA M.M. et coll.)	31
Souches chloroquinorésistantes de <i>Plasmodium falciparum</i> : infectivité du vecteur anophélien et utilisation des antipaludéens. (MOLEZ et coll.)	7x	L'ulcère marginal de la cornée : Maladie auto-immune, Nouveaux aspects thérapeutiques. (NDIAYE M.R. et coll.)	35
Problèmes posés par les évacuations obstétricales dans un centre de référence: Quelles solutions ? (KANDJI G. et coll.)	10	Profil des cancers de l'hypopharynx au Sénégal : Expérience de la Clinique ORL du CHU de Dakar 1984-1994. (NDIAYE I. et coll.)	38
Le médicament essentiel hospitalier en Afrique. Un exemple de Recherche médico-économique. (MEILLON C. et coll.)	19	Le cancer du rein de l'adulte au CHU de Dakar (GUEYE S.M. et coll.)	42
Séro-prévalences comparées du VHB et du VHC au cours du carcinome hépato-cellulaire. (SARR A. et coll.)	21	Les complications cardiaques de l'hypertension artérielle: Etude prospective à l'hôpital Principal de Dakar. (WADE B. et coll.)	48
Particularité de l'hydatidose hépatique en Afrique Noire. A propos de 32 cas d'hydatidose observés en République du Niger. (DEVELOUX M. et coll.)	24	Flux géniques chez <i>Anopheles gambiae</i> , vecteur du paludisme. Implication dans la transmission (SIMARD F. et coll.)	51
Place de la bilharziose hépatique au cours des hépatopathies en Médecine Interne à l'hôpital National du Point "G" Bamako-Mali (TRAORE H.A. et coll.)	26	Les vecteurs du paludisme au Sénégal : une systématique en évolution. LOCHOUARN L. et coll.)	55
Tumeur carcinoïde duodénale (A propos d'un cas dakarois). KA-CISSE M. et coll.)	29	Virus des hépatites B et C dans le carcinome hépatocellulaire au Sénégal. (KA M.M. et coll.)	59

Spécial Quarantenaire 1996