

Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Faculté des Sciences et Techniques



MEMOIRE DE D. E. A. DE BIOLOGIE ANIMALE

Présenté par

Mathurin Paul René DIATTA

Contribution à l'étude de la transmission du paludisme à Dielmo et à Ndiop (Sine Saloum- Sénégal) par l'utilisation de la biologie moléculaire.

soutenu le 31 mars 1995 devant la commission d'examen :

Président :	Mr.	Bhen Sikina	TOGUEBAYE
Membres :	MM.	Ousmane	FAYE
		Didier	FONTENILLE
		Lassana	KONATE
		Jean François	TRAPE
		Jean	TROUILLET

AVANT-PROPOS

Nous avons été accueilli au laboratoire ORSTOM de Zoologie Médicale à l'Institut Pasteur de Dakar où nous avons fait nos premiers pas dans la recherche. Notre travail a été dirigé par le Docteur Didier FONTENILLE, Responsable du laboratoire. Nos remerciements s'adressent :

au Dr. Didier FONTENILLE. Vous avez guidé nos premiers pas dans la recherche et mis à notre disposition les moyens nécessaires. Vous nous avez impressionné dès le début par votre rigueur, votre attention à notre égard, votre disponibilité instantanée à répondre à nos questions. Malgré toutes vos responsabilités, vous avez dirigé ce travail qui est le vôtre jusqu'à terme. Nous vous remercions très sincèrement ;

à notre maître le Dr. Bhen Sikina TOGUEBAYE, Chef du département de Biologie animale. Vous avez énormément participé à notre formation à l'U.C.A.D.. Vous n'avez jamais cessé de nous fasciner par votre rigueur et par la clarté de vos enseignements. Vous avez accepté de présider ce jury malgré vos nombreuses occupations. Nous vous présentons notre profonde reconnaissance ;

au Docteur Jean TROUILLET, Responsable du troisième cycle. Votre ouverture, votre générosité, vos qualités humaines et vos conseils nous ont revigoré de courage et n'ont pu nous laisser indifférent. Vous avez également dirigé ce travail. Soyez-en remercié ;

au Dr. Jean François TRAPE, Responsable du laboratoire de paludologie de l'ORSTOM. Nous avons toujours admiré le courage et la rigueur avec laquelle vous travaillez. Votre personnel a beaucoup participé à la réalisation de ce travail. C'est un grand honneur pour nous de vous compter parmi les membres du jury. Nous vous en sommes profondément reconnaissant ;

à notre maître le Dr. Ousmane FAYE. La clarté de vos enseignements et votre disponibilité à répondre à toutes nos questions ont certainement guidé notre choix. Nous sommes très honoré de vous compter parmi les membres du jury. Nous vous exprimons toute notre gratitude ;

au Dr. Lassana KONATE. Vous avez été l'une des premières personnes à nous avoir initié à l'utilisation des techniques modernes de biologie moléculaire. Vous avez également participé à la correction de ce mémoire. Vos conseils nous ont été des plus utiles. Permettez nous de vous exprimer toute notre gratitude ;

au Dr. Philip MATHIEU, Représentant de l'ORSTOM au Sénégal. Grâce à vous, notre séjour à l'O.R.S.T.O.M. a été possible et du reste a été des meilleurs ; sincères reconnaissances ;

au Dr. Jean Paul DIGOUTTE, Directeur de l'Institut Pasteur de Dakar. Vous nous avez accueilli dans votre institution où ce travail a été réalisé ; nos sincères remerciements ;

à Monsieur Xavier BERTHET. Vous nous avez énormément fait profité de vos connaissances en biologie moléculaire. Vous avez également été à nos côtés quand nous traversons des moments difficiles. Vous ne pouvez savoir combien nous vous sommes reconnaissants ;

au Dr. Vincent ROBERT. Vous avez laissé à notre disposition vos documents qui nous ont été d'un grand intérêt, merci pour tout ;

aux Dr. Laurence LOCHOUARN, Moumouni TRAORE-LAMIZANA, Jean Paul CORNET qui nous ont toujours conseillé et soutenu, profonde gratitude ;

à Abdourahmane MAIGA pour son assistance informatique ;

à Jean Jacques LEMASSON Technicien de recherche. Vous nous avez aidés dans la réalisation technique de ce travail. Nous vous exprimons notre reconnaissance ;

à toutes les équipes ayant participé à ce travail à Dielmo et à Ndiop, à tous les habitants de Dielmo et de Ndiop pour leur collaboration ;

à tous les étudiants du laboratoire de Zoologie Médicale ;

à tout le personnel de l'Institut Pasteur ;

à feu Gérard GANDOUL, à Judith TINDEN, Narcisse DIEDHIOU, à Catherine BADJI, à Nicolas BADJI, à Philomène SAMBOU, à Edwige DIATTA, à Pierre CISSE, Rose MENDY à Martin DIEDHIOU et à Daman CISSOKHO. Votre aide nous a sans doute permis de réaliser ce travail. Nous vous en remercions beaucoup ;

à Henri BADJI, Malick MBODJI, Matthieu NDONG et Jacques NGOM, à Raymond GOMIS, Mady DIATTA et Macoumba DIOUF pour leur soutien inlassable ;

à tous nos camarades et amis qui nous ont beaucoup soutenu.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous ceux que nous n'avons pas cités et qui nous ont aidé à la réalisation de ce travail.

à mes parents pour leur affection et leur soutien moral.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I. LA TECHNIQUE DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR).....	3
I.1. Historique.....	3
I.2. Principe de la PCR.....	3
I.3. Les composantes de la réaction.....	6
I.3.1. L'ADN.....	6
I.3.2. L'ADN polymérase.....	6
I.3.3. Les nucléotides	8
I.3.4. Les amorces	8
I.3.5. Le tampon - sa composition	8
I.3.5.1. Le tris HCl.....	8
I.3.5.2. Le chlorure de magnésium (MgCl ₂).....	9
I.3.5.3. Le chlorure de potassium (KCl).....	9
I.3.5.4. Les détergents et la gélatine.....	9
I.4. Les conditions de la réaction	10
I.4.1. La dénaturation.....	10
I.4.2. L'hybridation.....	10
I.4.3. L'extension	10
I.4.4. Le nombre de cycles.....	11
I.5. Détection et analyse des produits de PCR.....	11
I.5.1. L'électrophorèse	11
I.5.2. La révélation des produits de PCR.....	12
I.5.2.1. Le marquage au bromure d'éthidium	12
I.5.2.2. Le marquage au nitrate d'argent (AgNO ₃).....	12
I.5.2.3. Le marquage aux radioisotopes.....	13
I.5.3. La détermination de la taille des fragments	13
I.6. Les contaminations en PCR	13
I.7. Principe de l'extraction de l'ADN	14
I.8. Dosage des acides nucléiques	14

I.9. Effets de la congélation et de la décongélation des acides nucléiques	15
II. IDENTIFICATION DES ESPECES DU COMPLEXE ANOPHELES GAMBIAE	16
II.1. Etat des connaissances	20
II.2. Objectifs	19
II.3. Matériel et méthodes	20
II.3.1. Sites d'étude	20
II.3.2. Méthodes de capture et de dissection des moustiques	21
II.3.2.1. Méthodes de capture sur appât humain	21
II.3.2.2. Faunes matinales résiduelles	21
II.3.2.3. Dissection des moustiques	21
II.3.3. Extraction de l'ADN de moustique	22
II.3.3.1. Préparation des pattes de moustique	22
II.3.3.2. Matériel d'extraction	22
II.3.3.3. Protocole d'extraction	23
II.3.4. Identification des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> par PCR	24
II.3.4.1. Matériel de la PCR	24
II.3.4.2. Types d'amorces	25
II.3.4.3. Protocole	25
II.3.5. Détection et analyse des amplifiats de moustique par PCR	26
II.3.5.1. Matériel de détection et d'analyse	26
II.3.5.2. Visualisation des amplifiats d'ADN de moustique	27
II.3.5.3. Analyse des amplifiats de la PCR	27
II.4. Résultats	28
II.4.1. Les populations vectorielles	28
II.4.1.1. Captures sur homme	28
II.4.1.2. Les faunes matinales résiduelles	35
II.4.2. Taux d'agressivité	37
II.4.2.1. Taux d'agressivité des vecteurs	37
II.4.2.2. Taux d'agressivité par espèce	39
II.4.2.2.1. Taux d'agressivité pour <i>An. funestus</i>	39

II.4.2.2.2. Taux d'agressivité pour <i>An. arabiensis</i>	39
II.4.2.2.3. Taux d'agressivité pour <i>An. gambiae</i>	42
II.4.3. Densités au repos des femelles dans les chambres	42
II.4.3.1. Densités au repos d' <i>An. funestus</i>	42
II.4.3.2. Densités au repos d' <i>An. arabiensis</i>	45
II.4.3.3. Densités au repos d' <i>An. gambiae</i>	45
II.4.4. Cycle d'agressivité	45
II.4.4.1 Cycle d'agressivité des vecteurs.....	45
II.4.2.2. Cycle d'agressivité par espèce.....	47
II.4.2.2.1. Cycle d'agressivité pour <i>An. funestus</i>	47
II.4.2.2.2. Cycle d'agressivité pour <i>An. arabiensis</i>	47
II.4.2.2.3. Cycle d'agressivité pour <i>An. gambiae</i>	47
II.4.5. Taux de parturité	50
II.4.6. Préférences trophiques	53
II.4.7. Indices sporozoïtiques (IS).....	53
II.4.8. Indice circumsporozoïtique (ICSP).....	55
II.4.9. Taux d'inoculation	58
II.4.9.1. Taux d'inoculation entomologique	58
II.4.9.2. Taux d'inoculation immunologique	60
II. 5. Discussion	60
II.5.1. Les populations de vectorielles	60
II.5.2. Densités agressives.....	61
II.5.3. Le taux de parturité	63
II.5.4. Les préférences trophiques	64
II.5.5. Les indices sporozoïtiques et circumsporozoïtiques.....	65
II.5.6. La transmission.....	66

III. ETUDE DES FACTEURS D'ATTRACTIVITE DES MOUSTIQUES - MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE..... 69

III.1. Etat des connaissances.....	69
III.2. Objectifs.....	69

III.3. Matériel et méthodes	70
III.3.1. Extraction de l'ADN d'homme à partir de lymphocytes selon la méthode phénol-chloroforme	70
III.3.2. Extraction de l'ADN d'homme chez les anophèles, d'après Coulson <i>et al.</i> (1990).....	71
III.3.3. Premier essai	72
III.3.3.1. Amplification de l'ADN d'homme et visualisation sur gel d'agarose	73
III.3.4.2. Visualisation avec du [³⁵ S]dATP	73
III.3.3.2.1. Amplification	74
III.3.3.2.1. Révélation sur gel polyacrylamide dénaturant à 6%	75
III.3.4. Deuxième essai.....	76
III.4.4.1. Amplification d'ADN d'homme et visualisation sur gel d'agarose	76
III.3.4.2. Visualisation par coloration au nitrate d'argent	76
III.4. Résultats	77
III.4.1. Résultats du premier essai.....	77
III.4.2. Résultats du deuxième essai	77
III.5. Discussion	80
 CONCLUSION	 81
 BIBLIOGRAPHIE	 82

INTRODUCTION

Le paludisme menace directement une grande partie de la population vivant sous les tropiques. Plus de 100 millions de nouveaux cas sont signalés chaque année à travers le monde dont 80% en Afrique tropicale où le paludisme fauche plus de 1 million de vies humaines (OMS, 1992). Cette maladie, due à des protozoaires, les *Plasmodium*, est transmise à l'homme par des anophèles à l'occasion d'un repas de sang indispensable à la maturation des œufs de la femelle. Les accès palustres, très violents, sont souvent fatals. Les enfants et les femmes enceintes sont les plus vulnérables.

La lutte antipaludique a été menée depuis des millénaires. Elle a été intensifiée avec le programme d'éradication du paludisme des années 1950 - 1970, ayant pour armes la chloroquine et le DDT dirigés respectivement contre le *Plasmodium* et les anophèles. Ce programme ayant échoué, les espoirs sont maintenant tournés vers la mise au point d'un vaccin antipaludique. Mais face aux mécanismes d'échappement immunologique du *Plasmodium* dus à un polymorphisme très élevé, la mise au point d'un vaccin s'avère laborieuse. Pour atteindre un tel objectif, les Instituts Pasteur de Dakar et de Paris, l'Université C. A. Diop de Dakar et l'ORSTOM travaillent depuis 1990 à Dielmo dans le Sine Saloum, zone de paludisme holoendémique, où sont effectuées des études clinique, parasitologique, pharmacologique, immunologique et entomologique. Depuis 1993, les mêmes travaux sont effectués à Ndiop situé à 5 Km de Dielmo en zone de paludisme mésoendémique, en vue de comparer les résultats obtenus dans les deux sites d'étude.

Dans ce mémoire sont détaillés le principe général de la technique PCR (réaction de polymérisation en chaîne) et le rôle des réactifs nécessaire à la réalisation de la PCR, afin de servir de référence aux futurs utilisateurs, et de gagner du temps dans la recherche bibliographique. Nous présentons les résultats entomologiques obtenus mensuellement entre avril 1992 et mars 1994 dans les deux sites, après utilisation de la technique PCR comme méthode d'analyse. La PCR permet d'obtenir certaines informations sur la transmission du paludisme, jusque-là d'accès difficile par les méthodes d'étude classiques. Les résultats d'une tentative de mise au point d'un protocole d'étude des facteurs d'attractivité de l'homme pour les anophèles, utilisant la PCR, sont également présentés. Ce travail s'inscrit dans une large collaboration, en particulier avec d'autres entomologistes de l'U.C.A.D. (Konaté, Diagne, Sokhna, Faye

et Bâ) et de l'O.R.S.T.O.M., et avec des parasitologistes et immunologistes de l'O.R.S.T.O.M. et de l'Institut Pasteur de Dakar.

I. LA TECHNIQUE DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR)

I.1. Historique

C'est une technique d'amplification élective d'une séquence d'ADN flanquée par deux amorces (primers en anglais) de séquence connue. Elle fut l'œuvre de Mullis K. B. en 1983 (Mullis, 1990). Ce dernier voulait retrouver une mutation ponctuelle. Pour cela, il se proposa de réaliser une réaction proche du séquençage en utilisant des didésoxynucléotides (ddNTP) marqués radioactivement. L'expérience devait se faire dans quatre tubes. Chacun des tubes devait contenir de l'ADN polymérase, des amorces oligonucléotidiques et un des 4 ddNTP. Ainsi, après fixation du ddNTP, il était possible après autoradiographie, d'identifier le nucléotide adjacent à l'amorce. Pour rendre son test plus fiable, Mullis se proposa d'utiliser une deuxième amorce complémentaire du second brin parental. S'étant rendu compte de la présence de dNTP (désoxynucléotides) en de très faibles quantités dans les solutions d'ADN, il a voulu les éliminer en faisant réagir l'ADN polymérase dans un premier temps. Cette réaction devait allonger certaines amorces. Ces amorces allongées auraient perturbé les résultats selon Mullis. Mais ayant poursuivi son raisonnement il se rendit compte que ces fragments néoformés n'auraient été rien d'autre que les copies des deux brins initiaux. Il y aurait eu duplication des séquences d'ADN initiales. Les travaux ont montré que l'amplification était effective. A partir d'un fragment, on aurait théoriquement 2^n fragments après n cycles. La PCR était née. C'est une méthode simple et rapide. Elle connaît diverses applications et de nombreux protocoles adaptés à différents matériaux sont mis au point. De nombreux laboratoires l'utilisent aujourd'hui.

I.2. Principe de la PCR

Dans la cellule, la duplication a lieu juste avant la mitose. L'enzyme qui intervient dans cette duplication est l'ADN polymérase. Cette enzyme ne sait qu'allonger des chaînes de nucléotides. Après la séparation des deux brins de la molécule d'ADN (on parle de dénaturation), des fragments d'ARN appelés amorces s'apparient (ou s'hybrident) à leur séquence complémentaire au niveau de chaque brin d'ADN. L'ADN polymérase les allonge par ajout de nucléotides aboutissant à la formation

d'une copie complémentaire de chaque brin d'ADN. On obtient ainsi deux nouvelles molécules identiques à la molécule de départ (Darnel *et al.*, 1988). Il y a eu polymérisation.

La PCR est basée sur ce même principe mais elle utilise deux amorces qui sont sous forme d'ADN simple brin. Elle comporte trois étapes principales :

- la dénaturation, pendant laquelle l'ADN est dénaturé par une élévation de la température supérieure à la T_m (la T_m est la température de fusion, c'est à dire la température pour laquelle 50% de l'ADN se trouve sous la forme de simple brin). Cette T_m s'obtient en faisant des mesures de densité optique de solutions d'ADN en fonction de la température (Darnel *et al.*, 1988, Singer & Berg, 1992). En fait, plus la température est élevée, plus le nombre de molécules d'ADN sous forme de simple brin est grand. Cette température de dénaturation varie entre 90 et 97 °C (De Bruijn, 1988, Innis & Gelfand, 1990). La dénaturation dure 15 à 30 s en fonction de la longueur de la séquence,

- l'hybridation, qui a lieu lors du refroidissement jusqu'à la température d'hybridation des amorces. Les amorces s'hybrident à leur séquence complémentaire sur l'ADN cible. Leur température d'hybridation varie entre 50 et 72 °C. Elle dépend de la séquence et du nombre de nucléotides de l'amorce,

- l'extension, au cours de laquelle chaque amorce fixée sur l'un des deux brins va s'étendre à partir de son côté 3' par une juxtaposition de nucléotides par l'ADN polymérase. L'extension des deux amorces se fait en sens opposés en intercalant la séquence à amplifier (Figure 1). Durant cette étape la température est portée à 72 °C. Cette température permet aux ADN polymérases thermostables d'effectuer une synthèse plus rapide. Ces trois étapes sont en général répétées 20 à 35 fois (Saiki *et al.*, 1988 ; Tosi & Acuto, 1992) selon les quantités d'ADN au départ.

Le rendement de l'amplification est différent de 100% car il peut y avoir une hybridation des amorces avec d'autres séquences qui ne sont pas ciblées ou un défaut d'hybridation des amorces. En plus l'extension n'est pas toujours complète. Ce qui fait que ce rendement est compris entre 70 et 85 % (De Bruijn, 1988).

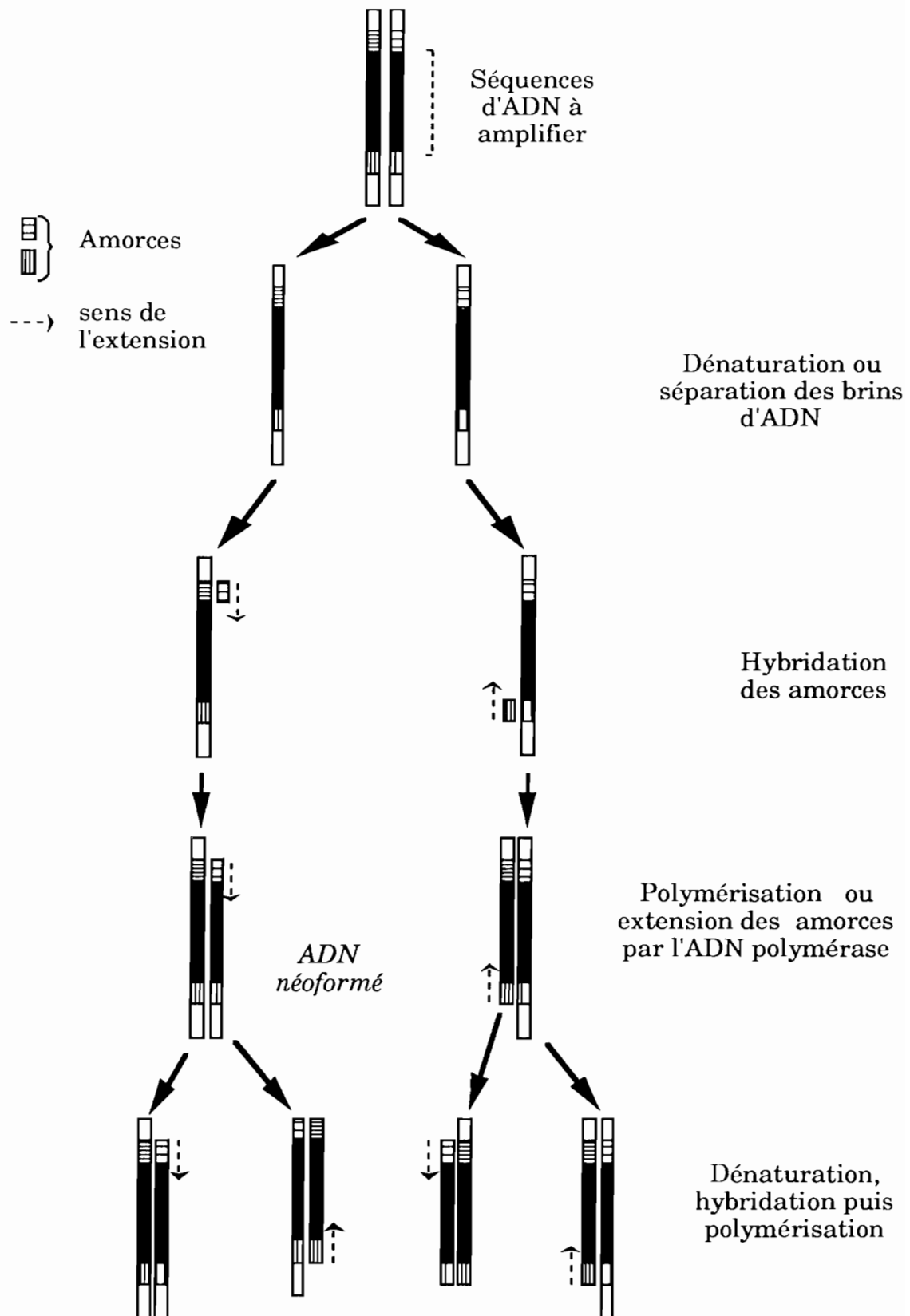


Figure 1 : Schéma du principe de la PCR

I.3. Les composantes de la réaction

I.3.1. L'ADN

Il constitue la cible à partir de laquelle se feront les copies. Il doit pour cela être pur, c'est à dire être débarrassé des protéines qui lui sont associées. Ces impuretés peuvent conduire à des amplifications parasites dues aux ARN ou à une baisse du rendement par le fait des protéines associées comme les histones (Kaplan & Delpech, 1993).

Les origines de cet ADN peuvent être multiples : tissus frais, tissus conservés à l'état sec, tissus secs conservés à -70 °C, tissus conservés dans de l'alcool, dans du Carnoy, etc (Scott *et al.*, 1993). De l'ADN peut être également extrait de tissus préparés à l'haematoxiline et à l'éosine (Jackson *et al.*, 1993). L'ADN ne doit pas comporter de rupture au niveau des séquences à amplifier.

L'ADN peut être associé à des produits qui sont des inhibiteurs de la *Taq* polymérase soit lors de son extraction (Phénol et/ou SDS) soit lors de sa conservation (EDTA). Des lavages au chloroforme permettent d'éliminer le phénol. Des dilutions de solutions d'ADN permettent de réduire l'effet de ces produits (Ju et Charron, 1992 ; Jackson *et al.*, 1993 ; Paskewitz *et al.*, 1993).

I.3.2. L'ADN polymérase

La plus utilisée est la *Taq* polymérase. Cette enzyme est extraite d'une Archéobactérie, *Thermus aquaticus* qui vit dans les sources thermales entre 80 et 90 °C (Kaplan & Delpech, 1993). Son ADN polymérase (la *Taq* polymérase) est thermostable (Saiki *et al.*, 1988). Elle supporte la température de dénaturation de l'ADN. Son activité est optimale entre 65 et 72 °C (Taylor, 1993), une température relativement élevée et à laquelle la spécificité de la duplication est accrue. A cette température la *Taq* polymérase est capable de juxtaposer 100 nucléotides par seconde et par molécule. Les faibles températures ainsi que les fortes ont pour effet de diminuer l'activité de la *Taq* polymérase. Le pH influe également sur l'activité de cette enzyme. Les meilleurs résultats sont obtenus pour des valeurs comprises entre pH 8,2 et pH 9,0 à 25 °C. Une augmentation ou une diminution du pH par rapport à ces valeurs entraîne une baisse de l'activité de la *Taq* polymérase (Innis & Gelfand, 1990 ; Taylor, 1993).

Les concentrations en enzyme varient généralement entre 1 et 2,5 unités par 100 µl si les autres paramètres sont à leur valeur optimale. Il est à noter que lorsque les *Taq* polymérases ont des origines différentes, elles se comporteront différemment (Innis & Gelfand, 1990 ; Meunier & Grimond, 1993). Ce fait très important est à prendre en compte si l'on veut utiliser la technique PCR.

La *Taq* polymérase présente néanmoins des imperfections. Etant dépourvue d'exonucléase, il n'y aura donc pas de correction des erreurs d'incorporation (Kaplan & Delpech, 1993 ; Lawyer *et al.*, 1989). Selon Saiki *et al.*, 1988, elle fait une erreur toutes les 400 bases.

Certains auteurs préfèrent ajouter la *Taq* polymérase après le premier cycle de dénaturation pour avoir un rendement maximum (Kaplan & Delpech, 1993). Cela est pratique si le nombre d'échantillons à traiter est petit, si ce n'est pas le cas il est préférable de mélanger la *Taq* polymérase à la mixture ("mix").

Il existe d'autres polymérases thermostables comme celles extraites de *Bacillus steatothermophilus*, de *Thermus thermophilus*, de *Thermococcus litoralis*. Cette dernière, appelée la "Vent DNA polymérase" est pourvue d'une activité exonucléasique (Kaplan & Delpech, 1993 ; Kong *et al.*, 1993 ; Taylor, 1993) et doit être une enzyme de choix pour les séquençages.

I.3.3. Les nucléotides

Ils sont stocké à -20 °C pendant plusieurs mois. Les solutions de travail sont constituées d'un mélange équimolaire des quatre désoxynucléosides dATP, dTTP, dGTP et dCTP (on les regroupe sous le terme général de dNTP). Ce type de mélange équimolaire permet d'éviter les erreurs d'incorporation par la *Taq* polymérase (Innis & Gelfand, 1990). Les solutions de travail sont divisées en de petits aliquotes et gardées à -20 °C. La concentration généralement utilisée est de 1,5 mM. Il est préférable d'utiliser les faibles concentrations en nucléotides car elles ont pour effet de minimiser les mauvais appariements des amorces à des sites non ciblés. Théoriquement 20 µmole de chaque dNTP sont suffisants pour synthétiser 2,6 µg ou 10 pmole d'ADN à 400 paires de bases (Innis *et al.*, 1988).

I.3.4. Les amorces

Il s'agit de courts fragments d'ADN sous forme de simple brin de 17 à 30 bases chacun (Innis & Gelfand, 1990 ; Kocher & Wilson, 1993). Il existe des amorces plus courtes de 10 bases utilisées en RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990 ; Kambhampati *et al.*, 1992). Ces amorces doivent avoir des quantités de G + C, A + T sensiblement égales afin d'éviter la formation de structures secondaires comme les boucles (Innis & Gelfand, 1990 ; Taylor, 1993), mais aussi des températures d'hybridation trop élevées qui diminuent la spécificité. Une des deux amorces ne doit pas être complémentaire de l'autre pour éviter l'hybridation des amorces entre elles (Taylor, 1993). Généralement, la concentration des amorces est de l'ordre de 0,2 mM. A cette concentration, l'hybridation se fait en quelques secondes. Pour les solutions de travail des amorces, il faut de petits aliquotes de façon à éviter de les congeler et de les décongeler très souvent. Les fortes concentrations doivent être évitées car elles entraînent des amplifications de séquences non ciblées (Innis & Gelfand, 1990).

I.3.5. Le tampon - sa composition

Il existe toute une variété de tampons. Les tampons sont optimisés en fonction des paramètres de la PCR. Ils se composent en général de tris-HCl (tris[hydroxyméthyl]aminométhane), de chlorure de magnésium ($MgCl_2$), de chlorure de potassium (KCl), de gélatine, et de détergents. Il est possible de préparer des solutions tampon à 100 X et de les conserver à la température ambiante (Taylor, 1993)

I.3.5.1. Le tris HCl

Le tris-HCl régule le pH de la réaction. Ce pH joue un rôle très important dans la réaction car il intervient au niveau de l'activité de la *Taq* polymérase. Le pH du tris-HCl décroît de 0,03 unité par degré lorsqu'on augmente la température, permettant ainsi d'obtenir à 72 °C la valeur d'activité optimale de la *Taq* polymérase (Innis & Gelfand, 1990 ; Kocher & Wilson, 1993) .

I.3.5.2. Le chlorure de magnésium (MgCl_2)

Il fournit les ions Mg^{2+} qui affectent pratiquement tous les autres paramètres de la réaction : hybridation, dénaturation, spécificité, formation de dimères d'amorces (primer dimers) ; ces ions sont nécessaires à l'activité et à la fidélité de la *Taq* polymérase. Il peut interagir avec les nucléotides, mais aussi, avec les chélatants comme l'EDTA. De ce fait, il devient inaccessible à la *Taq* polymérase qui est alors inhibée, entraînant ainsi une baisse du rendement de la synthèse. Sa concentration (0,2 à 2,5 mM) dans le milieu d'incubation doit être supérieure à celle des nucléotides de quelques millimoles (Innis & Gelfand, 1990 ; Kaplan & Delpech, 1993 ; Kocher & Wilson, 1993). Les protéines et les acides nucléiques peuvent également fixer le MgCl_2 (Elie, 1993), le rendant inaccessible par la *Taq* polymérase, d'où l'intérêt d'éviter les très fortes concentrations en ADN cible.

I.3.5.3. Le chlorure de potassium (KCl)

Les sels ne sont pas indispensables à la réaction. Ils ont une action inhibitrice sur la *Taq* polymérase. Cependant ils ont un rôle très important car ils facilitent l'hybridation des amorces. Il convient donc d'optimiser la concentration du KCl dans le milieu d'incubation (Innis & Gelfand, 1990 ; Kocher & Wilson, 1993 ; Kaplan & Delpech, 1993).

I.3.5.4. Les détergents et la gélatine

En solution aqueuse, la *Taq* polymérase fortement hydrophobe a tendance à précipiter. Pour cette raison les détergents tels que le Triton X-100, le NP 40 ou le Tween 20 sont parfois ajoutés dans le milieu pour stabiliser la *Taq* polymérase et lui conférer le maximum d'activité (Innis & Gelfand, 1990 ; Kocher & Wilson, 1993). Les protéines stabilisent également la *Taq*. polymérase ; la gélatine a l'avantage de supporter les températures de dénaturation.

I.4. Les conditions de la réaction

I.4.1. La dénaturation

La dénaturation se fait entre 94 °C pendant 30 s à 1 mn et 97 °C pendant 15 s (Innis & Gelfand, 1990 ; Paskewitz & Collins, 1990 ; Taylor, 1993). Les mauvaises amplifications peuvent résulter d'une dénaturation incomplète. Pour cette raison, une première phase de dénaturation assez longue de 5 mn est incluse. Elle ne se répète pas tout au long de l'amplification. Elle permet de s'assurer que tout l'ADN cible se trouve sous la forme de simple brin. Avec des temps de dénaturation très longs, on assiste à une baisse du rendement puisque l'effet de plateau est très vite atteint. L'effet de plateau se traduit par une inactivation d'une grande partie de la *Taq* polymérase, une raréfaction des nucléotides et des amorces.

I.4.2. L'hybridation

L'hybridation a lieu lors du refroidissement jusqu'à une température inférieure de 5 °C à la T_m des amorces. La T_m des courtes séquences est donnée par la formule (Wallace *et al.*, 1979) :

$$T_m = 2 \times (\text{nombre de A + T}) + 4 \times (\text{nombre de C + G}).$$

La vraie température optimale d'hybridation s'obtient expérimentalement. L'hybridation dure moins d'une seconde. Le refroidissement doit se faire le plus rapidement possible afin d'éviter la renaturation de l'ADN cible c'est-à-dire la réassociation des deux brins de l'ADN cible, et de permettre aux amorces qui sont en très fortes concentrations de s'hybrider à leur séquence complémentaire sur l'ADN cible. Une augmentation de la température d'hybridation des amorces a pour conséquence d'accroître la spécificité donc de réduire les amplifications parasites. Le temps mis pour étendre les amorces dépend de la longueur de la séquence à amplifier et de la température.

I.4.3. L'extension

L'extension est optimale à 72 °C. Lorsque les séquences à amplifier sont longues, il est nécessaire d'allonger le temps d'extension de 1 à 3 mn. Une phase d'extension plus longue (5 à 10 mn) a lieu après le dernier cycle. Elle permet d'obtenir une meilleure amplification après une raréfaction de

substrats (nucléotides et amorces) et une saturation de la *Taq* polymérase qui a été inactivée pour une grande partie par la chaleur (effet de plateau). En fait le nombre de nucléotides incorporés dépend non seulement du tampon mais aussi de la concentration en sel et de la concentration en ADN (Innis *et al.*, 1988 ; Saiki & Gelfand, 1989).

I.4.4. Le nombre de cycles

Le nombre de cycles dépend de la concentration d'ADN cible au départ. Le tableau suivant proposé par Innis & Gelfand (1990) permet de se faire une idée du nombre de cycles en fonction de la quantité d'ADN.

Nombre de molécules	Nombre de cycles
3×10^5	25 à 30
$1,5 \times 10^4$	30 à 35
1×10^3	35 à 40
50	40 à 45

d'après Innis & Gelfand, 1990.

I.5. Détection et analyse des produits de PCR

I.5.1. L'électrophorèse

L'électrophorèse est la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

Dans un milieu liquide, les acides nucléiques se déplacent à la même vitesse (Charltonet & Rivat, 1990) donc ils ne peuvent y être séparés en fonction de leur taille. Les milieux utilisés sont ceux qui freinent les molécules en fonction de leur taille, c'est le cas des gels.

En PCR les fragments obtenus sont analysés sur des gels d'agarose et d'acrylamide. Lors de la polymérisation, ces gels définissent des mailles plus ou moins régulières entre lesquelles passent les molécules à des vitesses différentes selon leur taille. Les gels d'acrylamide sont utilisés pour séparer les fragments de petite taille. Les fragments d'ADN plus grands sont analysés sur gel d'agarose. Selon la taille des fragments à séparer, le pourcentage d'agarose ou d'acrylamide varient :

% agarose	Taille des fragments en Kb
0,6 à 0,8	1 à 20
0,9 à 1,2	0,5 à 7
1,2 à 1,5	0,2 à 5

% acrylamide	Taille des fragments en Kb
4	0,2 à 0,8
5	0,08 à 0,2
8	0,04 à 0,1
11	0,01 à 0,05

I.5.2. La révélation des produits de PCR

Les produits de PCR sont décelés après marquage. Les méthodes de marquage les plus sensibles sont celles qui utilisent soit du bromure d'éthidium, soit du nitrate d'argent (AgNO_3), soit des radioisotopes.

I.5.2.1. Le marquage au bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium est une molécule qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN double brin. Le bromure d'éthidium donne une fluorescence orange en présence de rayons ultra-violet (UV). Cette fluorescence est plus prononcée dans les zones où sont concentrées les molécules d'ADN. Le seuil de détectabilité minimum est situé entre 1 et 2 ng. Cependant il faut beaucoup d'attention lors de la manipulation du bromure d'éthidium car il est très cancérigène. Il est conseillé de toujours porter des masques et des gants pour le manipuler (Andrews, 1992).

I.5.2.2. Le marquage au nitrate d'argent (AgNO_3)

La coloration au nitrate d'argent, plus sensible que celle au bromure d'éthidium, permet de conserver le gel coloré. Elle nécessite cependant plus de temps. Après avoir fixé au méthanol, puis oxydé le gel à l'acide nitrique, le gel est introduit dans une solution de nitrate d'argent et révélé ensuite (Ju et Charron, 1992 ; Andrews, 1992).

I.5.2.3. Le marquage aux radioisotopes

Les nucléotides ou les amorces utilisées dans le "mix" sont marquées avec des radioisotopes (soufre 35 et phosphate 32). La révélation se fera par autoradiographie après avoir séché le gel. Ce dernier est mis ensuite au contact d'un film sensible aux rayonnements émis par les atomes radioactifs. Cet ensemble est enfermé dans une plaque photo en chambre noire pour le mettre à l'abri de la lumière. Un à trois jours après, on révèle le film.

I.5.3. La détermination de la taille des fragments

Elle se fait par l'introduction d'un marqueur de taille (ou de poids moléculaire) que l'on fait migrer en même temps que les échantillons. Le marqueur de taille permet de connaître la taille des différents fragments obtenus après la migration.

I.6. Les contaminations en PCR

Les premières PCR ont montré très souvent des amplifications au niveau des témoins négatifs (théoriquement dépourvus d'ADN) donnant ainsi naissance à de faux positifs. Ces faux positifs apparaissent très souvent après une longue utilisation des mêmes produits d'incubation qui ont au cours du temps été contaminés par de l'ADN pouvant provenir des aérosols lors de l'ouverture des tubes, des parois internes des pipettes ayant servi à l'extraction d'ADN ou à la distribution des produits de PCR (Kaplan & Delpech, 1993). Pour minimiser les contaminations, il est conseillé de préparer un "mix" et de réaliser les incubations dans des pièces différentes de celles où sont analysées les produits d'amplification et de celles où est extrait l'ADN. Le travail sous une hotte permet de purifier l'air ambiant du grand nombre d'aérosols contaminants qu'il contient. L'irradiation des lieux par des UV, l'aliquotage en de petits volumes de tous les produits de l'incubation, la distribution de l'ADN en dernier permettent de minimiser considérablement les contaminations. Les pipettes et la hotte sont nettoyées à l'acide chlorhydrique 1 N qui détruit l'ADN.

I.7. Principe de l'extraction de l'ADN

Les méthodes d'extraction de l'ADN sont variées. De nombreux protocoles sont utilisés en fonction du matériel à traiter et des objectifs. En pratique, ces protocoles sont tous basés sur le même principe. D'abord, il faut libérer l'ADN de la cellule. Cette libération se fera soit en jouant sur la pression osmotique pour entraîner la lyse de la cellule, soit par dénaturation des protéines membranaires en portant les cellules à ébullition dans de l'eau distillée environ 15 minutes (Jackson *et al.*, 1993) ou par attaque avec un déprotéinisant puissant tels que le phénol le chloroforme et le SDS (sodiumdodesylsulfate) (Towner, 1992) ou encore par attaque enzymatique avec de la protéinase K (Jackson *et al.*, 1993 ; Towner, 1992 ; Iverson & Taylor, 1993). L'ADN ainsi libéré doit être séparé des impuretés telles que les protéines par un système de solubilité différentielle. Après avoir précipité les protéines par l'acétate de potassium 8 M, une centrifugation permet de les éliminer par gravité. Ces dernières se déposent sous forme de culot au fond des tubes. Seule la phase supérieure aqueuse qui contient les acides nucléiques est récupérée. L'ADN qui s'y trouve est précipité par de l'éthanol en présence de KCl, ou d'isopropanol. Ces produits seront utilisés en fonction de la qualité et de la quantité de matériel attendu (Kaplan & Delpech, 1993). Une deuxième centrifugation plus longue permet de recueillir l'ADN qui se dépose sous forme de culot au fond du tube. Ce culot est lavé, séché puis resuspendu dans de l'eau distillée ou du tampon de resuspension (Tris EDTA) (Jackson *et al.*, 1993 ; Kocher & Wilson, 1993 ; Ju & Charron, 1992).

Pour les molécules d'ADN de grande taille on évitera les procédés d'extraction qui peuvent conduire à leur rupture.

I.8. Dosage des acides nucléiques

Les méthodes spectrophotométriques sont couramment utilisées pour le dosage des acides nucléiques.

Les acides nucléiques absorbent la lumière à 260 nm. Pour connaître leur concentration une mesure de la densité optique (DO) à 260 nm est effectuée. Connaissant la valeur de la concentration correspondant à une unité de DO, on en déduit la valeur de la concentration (Kaplan & Delpech, 1993). A une unité de DO, correspond une concentration de 50 µg/ml, de

35 ug/ml et de 40 µg/ml pour un ADN double brin, un ADN simple brin et un ARN respectivement.

Les protéines sont souvent associées aux acides nucléiques. Elles absorbent à 260 et 280 nm. Une mesure de la DO à 280 nm, est également effectuée. Cette mesure permet de juger de la pureté de la solution d'ADN en faisant le rapport DO à 280 nm/DO à 260 nm. Pour une solution d'ADN "pure", ce rapport doit être compris entre 1,7 et 2,0. Les grands rapports indiquent la présence en grande quantité des ARN, les faibles rapports la présence de protéines et de phénol, les phénols absorbant à 270 nm (Kaplan & Delpech, 1993).

I.9. Effets de la congélation et de la décongélation des acides nucléiques

Les congélations et les décongélation répétitives des solutions d'acides nucléiques entraînent des dommages importants au niveau des molécules d'acides nucléiques. Lors de la congélation, les molécules d'acides nucléiques sont coincées entre les molécules d'eau qui s'organisent en cristal. Il se crée alors au moment de chaque congélation, des contraintes mécaniques qui peuvent aboutir à la rupture des molécules d'acides nucléiques leur faisant perdre ainsi leurs propriétés en PCR (Kaplan & Delpech, 1993). C'est pour cette raison qu'il est conseillé de faire des aliquotes de petits volumes, surtout pour les amorces qui servent périodiquement aux incubations de PCR, chaque aliquote devant être utilisée une seule fois.

II. IDENTIFICATION DES ESPECES DU COMPLEXE *ANOPHELES GAMBIAE*

II.1. Etat des connaissances

L'implication des moustiques du genre *Anopheles* (*An.*) dans la transmission du paludisme a été une découverte du docteur Ross en 1897. L'échec de la lutte antipaludique, la résistance aux insecticides observée chez certaines populations d'*Anopheles gambiae* (Davidson, 1956 in Robert *et al.* 1990) ainsi que l'hétérogénéité liée à la capacité vectorielle décelée par De Meillon (1956) in Robert *et al.*, (1990), ont fait suspecter l'existence de taxons dans le complexe *An. gambiae*. La technique des croisements avec des souches de référence a permis d'éclater le taxon *An. gambiae* responsable de la transmission du paludisme en Afrique (Davidson, 1962 in Robert *et al.*, 1990). On parle maintenant de complexe d'espèces. Un complexe d'espèces est composé d'espèces morphologiquement indifférentiables mais reproductivement isolées (Mouchet & Carnevale, 1991). Chez les moustiques vecteurs de maladies, il existe de nombreux complexes d'espèces (Robert & Carnevale, 1984, Porter & Collins, 1991, Foley *et al.*, 1993, Suguna *et al.*, 1994). Le complexe *An. gambiae* possède de redoutables vecteurs du paludisme en Afrique. On dénombre aujourd'hui six espèces appartenant à ce complexe (Davidson & Hunt, 1973). Il s'agit d'une part de *An. gambiae sensu stricto*, *An. arabiensis*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* dont les larves vivent en eau douce et d'autre part de *An. melas*, *An. merus* dont les larves vivent en eau saumâtre. Les rares hybrides qui existent entre ces espèces (Robert *et al.*, 1990 ; Petrarca *et al.*, 1991 ; Scott *et al.*, 1993) en plus des hybrides mâles qui sont toujours stériles (Coz & Hamon, 1964) traduisent un isolement reproductif presque total. On distingue également au sein de l'espèce *An. gambiae* 5 formes chromosomiques auxquelles on a donné le nom de cytotypes et qui caractérisent des groupes bien définis avec un isolement reproductif partiel. Ce sont les formes, forêt, savane, mopti, bamako, bissau (Touré *et al.*, 1983 ; Coluzzi *et al.*, 1985 ; Robert *et al.*, 1990). Toutes ces caractéristiques montrent que la spéciation est récente au sein du complexe *An. gambiae*. *An. gambiae* et *An. arabiensis*, meilleurs vecteurs du complexe, semblent plus liés phylogénétiquement (Besansky *et al.*, 1994). *An. melas*, *An. merus* et *An. bwambae* sont allopatriques entre elles, mais peuvent vivre en sympatrie avec les autres espèces d'eau douce du complexe *An. gambiae*.

A côté de *An. gambiae* et *An. arabiensis* qui sont de très bons vecteurs du paludisme, on trouve *An. melas* moins bon vecteur et *An. quadriannulatus* qui n'est pas vecteur du fait de sa zoophilie. La distribution de ces espèces est fonction des conditions bioclimatiques. Au Sénégal, seuls *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas* ont été identifiés (Diagne *et al.*, 1994). Dans les zones où coexistent ces espèces, il est important d'identifier de façon très nette les moustiques lorsqu'on étudie la transmission du paludisme. L'objectif c'est de pouvoir identifier sur le terrain les espèces à tous les stades de développement. Aucune des méthodes actuelles ne répond parfaitement à cet objectif. Toutes les méthodes présentent des avantages et des inconvénients.

La cytogénétique étudie les chromosomes polyténiques des glandes salivaires des larves de stade IV (Frizzi & Holstein, 1956) et des cellules trophocytaires de l'ovocyte de stade Cristopher III fin à IV début (Coluzzi, 1962). Elle permet une identification des moustiques jusqu'au niveau infraspécifique (Coluzzi *et al.*, 1985). Malheureusement cette technique n'est applicable qu'à un nombre limité de spécimens, biaisant du coup les résultats. En plus, elle nécessite non seulement de la qualification mais aussi beaucoup d'adresse pour l'analyse et la préparation des chromosomes.

Une autre méthode est la technique électrophorétique des isoenzymes qui ne s'applique qu'à du matériel vivant ou congelé à l'état frais (Miles, 1978).

La technique des sondes utilise le polymorphisme qui existe au niveau des ADN ribosomiaux. L'inconvénient, c'est qu'elle utilise de la radioactivité (Collins *et al.*, 1987 ; Gale et Crampton, 1987). De nouvelles sondes non radioactives sont maintenant utilisées (Hill *et al.*, 1991 ; Crampton & Hill, 1993). Malheureusement, les parties utilisées chez les moustiques pour faire ce test sont : les abdomens qui donnent des résultats moins nets, les têtes et les thorax qui devaient servir à d'autres tests.

Quant à la technique d'analyse des hydrocarbures cuticulaires, elle exige des études statistiques et semble ne pas être applicable à un nombre très petit de spécimens (Phillips *et al.*, 1988 ; Scott *et al.*, 1993).

Toutes ces méthodes exigent énormément de temps.

L'utilisation de la PCR dans l'identification des moustiques du complexe *Anopheles gambiae* a été initiée par Paskewitz & Collins (1990). La PCR et la technique des sondes utilisent de l'ADN, mais la PCR substitue les amorces aux sondes. Une amplification de fragments d'ADN suivie d'une électrophorèse sur gel permettent l'obtention de bandes très

spécifiques. C'est une technique qui s'applique à tous les stades de développement. Elle est capable de distinguer aujourd'hui les 6 espèces du complexe *An. gambiae* (Scott *et al.*, 1993 ; Townson & Onapa, 1994). En plus la sensibilité de la technique est telle que 85 à 99% des moustiques capturés sont identifiables (Scott *et al.*, 1993 ; Fontenille *et al.*, 1993). La théorie de la PCR et son application sont simples. Elle reste encore très onéreuse par le matériel qu'elle nécessite et son domaine d'identification est limité à l'espèce. Elle fait actuellement l'objet d'études qui permettront de différencier les populations par l'utilisation de gènes microsatellites. Une modification de la PCR, la RAPD (Wilkerson *et al.*, 1993 ; Favia *et al.*, 1994) est en train d'être affinée. A terme, elle pourrait même aller plus loin que la cytogénétique en faisant une discrimination entre les populations. De par sa rapidité, sa simplicité et du grand nombre d'échantillons analysables, la PCR devient un outil de choix pour les identifications entomologiques de routine lorsque la morphologie ne suffit plus.

Les études du génome chez les Diptères et plus précisément chez les moustiques ont montré que les ADN ribosomiaux (ADNr) y forment des rangées d'unités répétées en tandem. On peut trouver jusqu'à 500 répétitions par génome (Beckingham, 1982) rendant ainsi la PCR très sensible. Avec les pattes et les ailes il est possible d'extraire de l'ADN en quantité suffisante pour réaliser environ 15 PCR (Fontenille *et al.*, 1993). Chaque unité répétée est formée dans l'ordre de 5' vers 3' d'un espace transcrit externe (ETS), des régions codant pour les ARN ribosomiaux 18 S et 28 S qui sont séparées par un espace transcrit interne (ITS) contenant la région codant pour les ARN ribosomiaux 5,8 S. Ces motifs sont séparés entre eux par les espaces intergéniques (IGS) (Beckingham, 1982) selon la figure 2.

L'étude de ces différentes parties des ADNr chez les moustiques du complexe *An. gambiae* a montré au niveau des IGS des variations interspécifiques et intraspécifiques. A côté des IGS très polymorphiques, on trouve les régions qui codent et qui sont très bien conservées chez toutes les espèces du complexe (Beckingham, 1982 ; Mclain & Collins, 1989). Des régions bien conservées se retrouvent également dans les régions non codantes (Scott *et al.*, 1993). Pour la réalisation de la PCR au niveau du complexe *An. gambiae*, le choix des amorces se fait de la façon suivante : une amorce doit s'hybrider sur un site bien conservée soit sur la partie codante (Paskewitz & Collins, 1990) ou sur la partie conservée (Scott *et al.*, 1993) de l'IGS commune à toutes les espèces du complexe (amorce UN, pour universelle), l'autre spécifique à chaque espèce s'hybride à sa

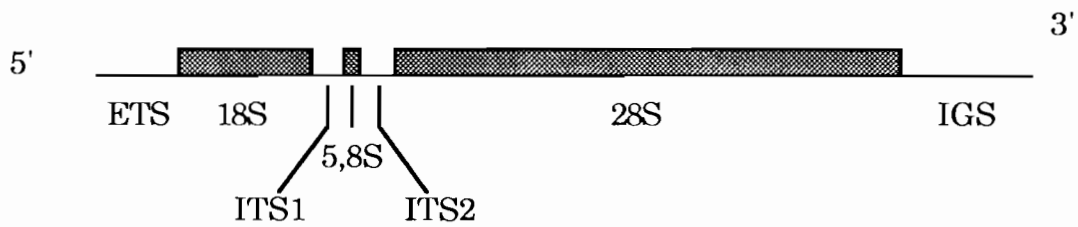


Figure 2 : Organisation générale des gènes des ARN ribosomiaux chez les Eukaryotes. (d'après Kumar et Rai, 1993).

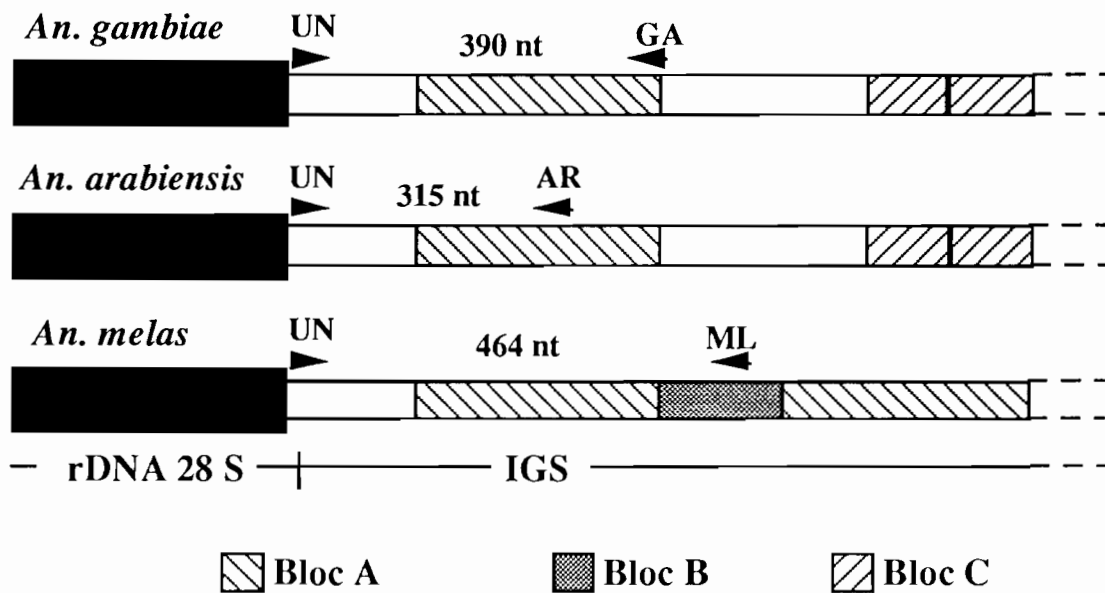


Figure 3 : Emplacement des amorces diagnostiquées d'*An. gambiae*, d'*An. arabiensis*, et d'*An. melas*. (d'après Scott *et al.*, 1993).

séquence complémentaire au niveau de la partie très polymorphique des IGS. L'amplification pourra donc se faire selon la figure 3.

II.2. Objectifs

A Dielmo coexistent trois espèces du complexe *An. gambiae*. Notre objectif est de déterminer pour chaque espèce du complexe *An. gambiae* :

- le rôle qu'elle joue dans la transmission du paludisme, et vérifier si les variations saisonnières de la transmission du paludisme par les espèces du complexe *An. gambiae* notées à Dielmo (Konaté, 1991 ; Diagne, 1992 ; Sokhna, 1994) sont dues à des changements spécifiques de la population, *An. gambiae* étant reconnu comme le meilleur vecteur du paludisme, (Coz et Brengues, 1967 ; White & Rosen, 1973 ; Gillies & Coetzee, 1987 ; Petrarca *et al.*, 1987),

- le lieu de piqûres (à l'extérieur ou à l'intérieur des chambres) et le taux d'agressivité, données importantes pour une meilleure connaissance des cycles de transmission du paludisme par espèce,

- les espèces plasmodiales et le taux auquel elles sont transmises, ce qui nous permettrait d'avoir plus d'informations concernant le lien entre une espèce plasmodiale et une espèce du complexe *An. gambiae*,

- le lieu de repos et les préférences trophiques en vue de mieux comprendre l'écologie des adultes, au cours de deux années de suivi (avril 1992 à mars 1994). Le même travail est effectué à Ndiop entre 1993 et 1994.

II.3. Matériel et méthodes

II.3.1. Sites d'étude

Il s'agit de deux villages de la région de Fatick situés près du littoral et distants de 5 kilomètres :

- Dielmo (13° 45' Nord, 16° 25' Ouest) est situé au bord d'une rivière d'eau douce permanente (la Néma) qui constitue un gîte permanent pour les larves d'anophèles.

- Ndiop (13° 41' Nord, 16° 23' Ouest) est caractérisé par la présence à environ un kilomètre du village de deux bas fonds qui se remplissent d'eau en saison des pluies constituant ainsi deux grands gîtes saisonniers auxquels on peut ajouter les nombreux gîtes secondaires pour les larves de moustiques.

Ces deux villages appartiennent à la zone climatique savane soudanienne de la Petite Côte et du Saloum (Trape *et al.*, 1994, Konaté *et al.*, 1994).

II.3.2. Méthodes de capture et de dissection des moustiques

II.3.2.1. Méthodes de capture sur appât humain

Des habitants de chaque village sont formés pour ce travail. Ils sont répartis en 4 équipes (4 postes) de deux captureurs qui se relayent toutes les heures de 19 heures à 7 heures. Pour chaque poste, une équipe effectue les captures à l'intérieur d'une habitation, l'autre à l'extérieur. Les captureurs travaillent dans l'obscurité et disposent de lampe qu'ils allument dès qu'un moustique se pose sur leurs jambes nues. Le moustique est emprisonné dans un tube à hémolyse bouché immédiatement avec du coton. Le tube est ensuite introduit dans un sachet plastique qui porte l'heure et le lieu de capture. A la fin de la tranche horaire, les équipes ramènent directement les moustiques frais à la station et sont relayés par une autre équipe. Les captures mensuelles ont lieu toutes les premières semaines de chaque mois, au cours de 3 nuits, soit 12 hommes-nuits par mois. De plus, des captures dites hebdomadaires, sont effectuées les lundi des autres semaines. Seules les captures mensuelles ont fait l'objet d'étude à Dielmo. A Ndiop les moustiques de captures hebdomadaires ont été testé pour l'étude des indices circumsporozoïtiques.

II.3.2.2. Faunes matinales résiduelles

Des concessions choisies sont soumises à une pulvérisation matinale d'un pyréthrianoïde après avoir fermé les portes et les issues par lesquels peuvent s'échapper les moustiques. Après une dizaine de minutes d'attente, les moustiques qui tombent sur les draps blancs préalablement étalés dans la pièce sont recueillis à l'aide de pinces souples dans un gobelet portant le numéro de la chambre et de la concession.

II.3.2.3. Dissection des moustiques

Après avoir déterminé et dénombré les espèces de moustique, les anophèles sont ensuite classés selon l'état de réplétion de leur abdomen, puis une partie des vecteurs potentiels est soumise à la dissection des

glandes salivaires et des ovaires. Les repas de sang éventuels sont gardés sur papier filtre pour des analyses ultérieures et le reste de chaque moustique disséqué est gardé dans un tube contenant un dessiccateur. Les moustiques disséqués et non disséqués sont rapportés à Dakar.

Toute cette partie du travail est effectuée par les équipes présentes sur le terrain.

II.3.3. Extraction de l'ADN de moustique

II.3.3.1. Préparation des pattes de moustique

Le manipulateur doit se laver proprement les mains pour éviter d'ajouter au matériel des fragments de tissu exogène. Les moustiques sont sortis de leur tube de conservation et déposés sur les feuilles de papier. Les pattes et les ailes sont séparées du reste du corps de l'animal avec les pinces fines et introduites dans des tubes neufs portant chacun le numéro du moustique correspondant. Le reste du moustique est remis dans les anciens tubes de conservation pour d'autres utilisations (ELISA¹ CSP² et PCR). Les pinces sont ensuite nettoyées avec le bout de papier. La dissection du moustique suivant nécessite une nouvelle feuille de papier pour éviter les contaminations possibles. En effet, un tout petit fragment de patte peut donner de l'ADN suffisant pour être à l'origine d'une contamination.

Lorsque ailes et pattes sont perdues au cours des manipulations, un petit fragment d'abdomen est prélevé et l'extraction se fera à partir de celui-ci. Ce même procédé est utilisé lorsque des PCR ont été négatives et doivent être refaites.

II.3.3.2. Matériel d'extraction

On dispose pour cela :

- de tubes "Treff" de 1,5 ml sur lesquels on portera les numéros des moustiques,
- des pipettes Gilson P1000, P200, P100 et P20 et de cônes stériles éjectables ; ces pipettes très précises permettent également d'éviter une

¹Enzyme-linked immunosorbent assay

²Circumsporozoite protein

réutilisation de cône ayant servi auparavant à l'extraction de l'ADN d'un moustique,

- d'un broyeur électrique permettant de fragmenter les moustiques très finement et de faciliter la lyse des cellules,- des mouchoirs en papier blancs qui servent à essuyer le piston du broyeur,
- d'un portoir de glace en polystyrène,
- d'une centrifugeuse allant jusqu'à 13.500 tours par minute,
- d'un dessiccateur "Speed Vac",
- d'un pH mètre,
- d'une balance électronique de grande précision,
- d'un agitateur magnétique pour homogénéiser les solutions,
- d'un appareil à "vortexer" qui permet d'agiter très vigoureusement les microtubes afin d'en homogénéiser le contenu,
- d'un bain-Marie sec.

II.3.3.3. Protocole d'extraction

L'extraction se déroule de la façon suivante :

-01 - Préparation des tampons

Tampon d'homogénéisation dans 100 ml d'eau distillée

0,1 M NaCl	soit 0,59 g
0,2 M Sucrose	soit 6,84 g
0,01 M EDTA	soit 0,37 g
0,03 M Tris-HCl	soit 0,36 g
pH = 8,0	

Tampon de lyse dans 50 ml d'eau distillée

0,25 M EDTA	soit 4,64 g
2,5% (w/v) SDS	soit 0,94 g
0,5 M Tris-HCl	soit 3,015 g
pH = 9,2.	

Tampon de broyage :

4 volumes de tampon d'homogénéisation + 1 volume du tampon de lyse soit 100 ml du Tampon d'homogénéisation + 25 ml du Tampon de lyse.

Garder les tampons à +4 °C.

-02 - Broyer le moustique (pattes et ailes) dans 100 µl de tampon de broyage

-03 - Mettre le tube 20 à 40 mn à 65 °C dans le bain sec allumé 30 mn à l'avance, pour inhiber l'activité de la DNase pendant 20 mn au moins (Collins *et al.*, 1988).

-04 - Ajouter 14 µl d'acétate de potassium (ou de sodium) à 8 M pour précipiter les protéines. "Vortexer" fort.

-05 - Mettre dans la glace pour 30 mn.

-06 - Centrifuger 10 mn à 13.500 t/mn.

-07 - Garder le surnageant dans un nouveau tube numéroté de 1,5 ml en évitant de prendre le précipité. Si c'est le cas, reprendre la centrifugation.

-08 - Ajouter 200 µl d'éthanol à 95° à -20 °C, puis mettre au congélateur au moins 20 mn. A ce stade les échantillons peuvent être stockés.

-09 - Centrifuger 20 mn à 13.500 t/mn. Pipeter l'éthanol à 95° garder le culot à peine visible. Changer de pointe à chaque fois.

-10 - Ajouter 200 µl d'éthanol à 70° à -20 °C.

-11 - Centrifuger 10 mn à 13.500 t/mn.

-12 - Vider l'éthanol à 70° en pipetant délicatement. Changer de pointe à chaque fois.

-13 - Ajouter 200 µl d'éthanol à 95° à -20 °C.

-14 - Centrifuger 10 mn à 13.500 t/mn.

-15 - Vider l'éthanol à 95° en pipetant délicatement. Changer de pointe à chaque fois.

-16 - Mettre dans le "Speed Vac" chauffage "médium", pendant 20 mn

-17 - Reconstituer dans 100 µl d'eau distillée, vortexer.

Après plusieurs essais la phase d'extraction peut maintenant être court-circuitée. En effet, on peut introduire directement les pattes sans extraction dans le "mix" et lancer la PCR. Cependant pour une bonne réussite, les moustiques doivent avoir été récoltés récemment et parfaitement conservés à sec avec un dessiccateur et congelés.

II.3.4. Identification des espèces du complexe *Anopheles gambiae* par PCR

II.3.4.1. Matériel de la PCR

- des tubes "Treff" de 1,5 ml ou des cryotubes de "Nunc" de 1,8 ml pour contenir les "mix" , des microtubes "Eppendorf" de 0,5 ml où se fera l'incubation ;

- des pipettes Gilson P1000, P200, P20 et des cônes éjectables. Elles doivent être différentes de celle qu'on utilise pour les extractions ;
- un amplificateur génique "Techne PHC 3" ou "Perkin Elmer 9600";
- un onduleur qui permet à l'amplificateur génique de fonctionner pendant un certain moment en cas de coupure d'électricité ;
- une hotte à flux laminaire pour travailler le plus stérilement possible.

II.3.4.2. Types d'amorces

La taille et la séquence des amorces sont résumés dans le tableau suivant :

Amorces	séquences	Tm en °C
UN	GTGTGCCCCCTTCCTCGATGT	58,3
GA	CTGGTTTGGTCGGCACGTTT	59,3
ML	TGACCAACCCACTCCCTTGA	57,2
AR	AAGTGTCCTTCTCCATCCTA	47,4

d'après Scott *et al.*, 1993

II.3.4.3. Protocole

- 01 - Préparation du tampon *Taq* 10 X,
- 02 - Numéroté 28 (ou 40) microtubes "Eppendorf" "safe lock" de 0,5 ml si possible avec du papier collant de couleur. Faire des séries de 24 (ou de 36) moustiques + 1 moustique témoin négatif (par exemple un *Culex* ou de l'eau distillée) et 3 moustiques témoins positifs (témoin *An. gambiae*, témoin *An. arabiensis* et témoin *An. melas.*),
- 03 - Préparer le "mix" dans un cryotube tube "Nunc" de 1,8 ml ou un tube "Treff" 1,5 ml. Mettre des gants,

Mix	volume/tube (µl)	Volume pour n tubes (µl)
H ₂ O	12,275	(n x 12,275)
Tampon <i>Taq</i> 10 X	2,5	(n x 2,5)
dNTP	0,075	(n x 0,075)
UN 20 ng/µl	1	(n x 1)
GA 20 ng/µl	1	(n x 1)
AR 20 ng/µl	1	(n x 1)
ML 20 ng/µl	1	(n x 1)
<i>Taq</i> pol. (5 unités/µl)	0,15	(n x 1,5)

(n = nombre de tubes + 5% de marge de manœuvre),

-04 - Agiter le "mix" et distribuer 19 µl par tube (s'il s'agit d'une solution d'ADN) ou 25 µl par tube Eppendorf de 0,5 ml (s'il s'agit d'une patte de moustique : dans ce cas le volume occupé par la solution d'ADN est remplacé par un égal volume d'eau distillée directement ajouté au "mix"),

-05 - Ajouter 6 µl de l'ADN du moustique correspondant. Changer de pointe après chaque moustique. Prendre des pointes cotonnées pour minimiser les contaminations,

-06 - Ajouter 2 gouttes d'huile minérale dans chaque tube avec la P1000,

-07 - Lancer la PCR sur l'appareil "Techne PHC 3"

1^{er} programme : 1 cycle (programme 1)

5 mn à 94 °C

2^{ème} programme 32 cycles (programme 2)

1 mn à 94 °C

1 mn à 50 °C

1 mn à 72 °C

3^{ème} programme 1 cycle (programme 3)

5 mn à 72 °C

II.3.5. Détection et analyse des amplifiats de moustique par PCR

II.3.5.1. Matériel de détection et d'analyse

- un appareil pour électrophorèse de type "Hoefer HE 99",
- des peignes avec 15 dents de 1 mm d'épaisseur,
- une pipette Gilson P20,
- un four micro-onde,

- des gants de vinyle,
- un statif de photographie sous UV et des films Polaroid 667,
- un casque pour se protéger contre les UV.

II.3.5.2. Visualisation des amplifiats d'ADN de moustique

Préparer un gel d'agarose à 1,5 % dans un erlenmeyer de 500 ml
 2,25 g d'agarose,
 150 ml de TBE 1 X (soit 135 ml de TBE 10 X + 15 ml d'eau distillée)

TBE 10 X

Tris HCl	108 g
Acide borique	75 g
EDTA	9,3 g
(pH 8,0)	

mettre 3 mn au four micro-onde,
 laisser refroidir (environ 50 °C),
 ajouter 6 µl de bromure d'éthidium,
 couler le gel après avoir scotché les bords du moule et mettre les
 peignes attendre 20 mn,
 mettre le gel dans le bac à électrophorèse contenant du tampon
 TBE 1X,
 distribuer 10 µl de chaque amplifiat par puits, avec du bleu de charge,
 charger les marqueurs de taille (ΦX 174 ou "100 bp ladder") dans les
 premiers puits de chaque colonne,
 faire migrer pendant 1 h 15 mn à 140 volts,
 observer sous UV et photographier.

II.3.5.3. Analyse des amplifiats de la PCR

Comparer les différentes bandes obtenues à celles du marqueur de
 taille, ceci permettant de déterminer la taille des différents fragments
 après la PCR et d'en déduire les espèces obtenues.

La séquence correspondant à *An. arabiensis* possède 315 nucléotides,
 celle de *An. gambiae* 390 nucléotides et celle de *An. melas* 464 nucléotides
 (Scott *et al.*, 1993).

Les résultats sont saisis sur l'ordinateur.

II.4. Résultats

II.4.1. Les populations vectorielles

Entre avril 1992 et mars 1993, 36 séances de capture sur homme ont été effectuées à Dielmo et 105 chambres visitées pour les récoltes de faunes matinales résiduelles.

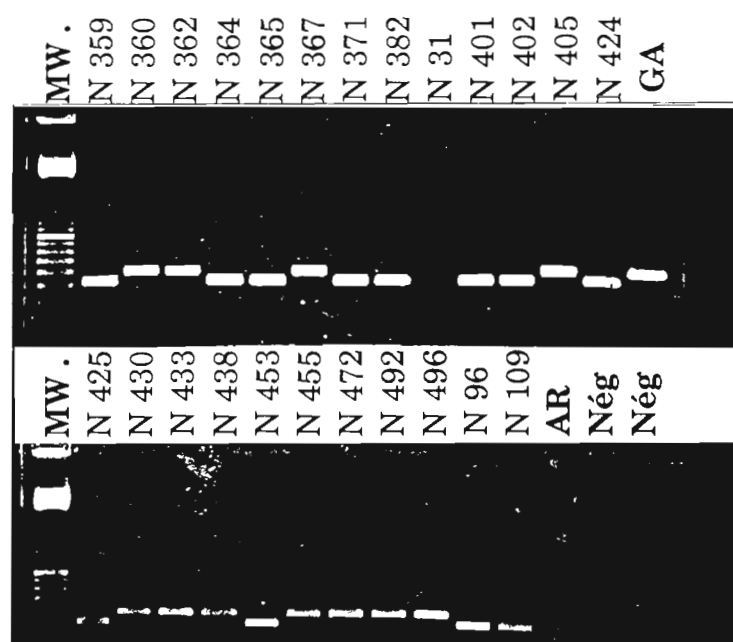
Entre avril 1993 et mars 1994, 36 séances de capture sur homme ont également été effectuées à Dielmo, et 36 séances à Ndiop, 18 chambres ont été explorées à Dielmo, et 36 à Ndiop.

Un tirage au sort a été effectué sur les femelles d'anophèles appartenant au complexe *An. gambiae* aussi bien pour les captures sur homme que pour les faunes matinales résiduelles. Ces femelles tirées au sort ont été identifiées par la technique PCR (Figure 4). Pour Dielmo d'avril 1992 à mars 1993, 1070 femelles sur 2193 ont été identifiées, d'avril 1993 à mars 1994, 656 sur 3660, et à Ndiop d'avril 1993 à mars 1994, 439 sur 953. La PCR a permis de mettre en évidence la présence de trois espèces appartenant au complexe *An. gambiae* dans ces deux localités. Il s'agit de *An. gambiae sensu stricto*, *An. arabiensis* et *An. melas*. Le tirage au sort réalisé mensuellement a permis d'estimer l'abondance relative de chaque espèce du complexe *An. gambiae*. Etant donné que seuls les moustiques tirés au sort ont été testés, l'estimation du nombre probable d'individus de chaque espèce parmi l'ensemble des moustiques capturés a été faite par une classique règle de 3 (Tableaux 2, 4, 6, 8, 10).

II.4.1.1. Captures sur homme

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, 3391 femelles vectrices ont été capturées, dont 1986 *An. funestus* et 1405 anophèles du complexe *An. gambiae*. A l'intérieur du complexe *An. gambiae*, *An. gambiae* a compté 616 femelles, *An. arabiensis* 788 femelles, et *An. melas* 1 femelle. Ces femelles ont été capturées aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur. La femelle d'*An. melas* a été capturée à l'intérieur. Le nombre de femelles vectrices capturées a varié selon l'espèce, le lieu et le mois de capture (Tableaux 1 et 2). Le rapport intérieur-extérieur est égal à 1,39 pour *An. funestus* et 1,41 pour *An. gambiae*. Ces espèces ont été plus endophages contrairement à *An. arabiensis* qui a été plus exophage avec un rapport intérieur-extérieur égal à 0,92.

Figure 4 : Migration de l'ADN amplifié sur gel d'agarose



MW. =marqueur de taille : "100 bp ladder"

N : indiquent la localité

GA = témoin positif *An. gambiae*

AR = témoin positif *An. arabiensis*

Nég = témoin négatif

Espèces	Lieu	Avr-92	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan-93	Fevrier	Mars	Total
Vecteurs	Total	185	112	346	776	579	469	212	117	87	222	228	58	3391
	extérieur	90	67	170	392	403	307	101	44	45	99	134	44	1896
	intérieur	95	45	176	384	176	162	111	73	42	123	94	14	1495
<i>An. funestus</i>	Total	122	51	220	599	266	57	57	93	77	195	206	43	1986
	extérieur	59	14	105	263	65	18	24	55	34	102	83	9	831
	intérieur	63	37	115	336	201	39	33	38	43	93	123	34	1155
Complexe <i>An. gambiae</i>	Total	63	61	126	177	313	412	155	24	10	27	22	15	1405
	extérieur	36	31	71	121	111	144	87	18	8	21	11	5	664
	intérieur	27	30	55	56	202	268	68	6	2	6	11	10	741

Tableau 1 : Captures sur homme - nombres de femelles d'*An. funestus* et du complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois : Dielmo avril 92 à mars 93

Espèces		Lieu	Avr-92	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan-93	Fevrier	Mars	Total
nombre identifié par PCR	<i>An. gambiae</i>	extérieur	2	6	6	10	7	23	22	10	4	3	1	0	94
		intérieur	5	2	13	12	12	25	24	5	1	1	2	0	102
	<i>An. arabiensis</i>	extérieur	32	24	36	26	20	8	19	4	4	15	9	15	212
		intérieur	22	27	31	19	22	10	15	0	0	4	9	10	169
	<i>An. melas</i>	extérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		intérieur	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nombre probable	<i>An. gambiae</i>	extérieur	2	6	10	34	29	107	47	13	4	3	1	0	255
		intérieur	5	2	16	22	71	191	42	6	2	1	2	0	361
	<i>An. arabiensis</i>	extérieur	34	25	61	87	82	37	40	5	4	18	10	5	408
		intérieur	22	27	39	34	131	77	26	0	0	5	9	10	380
	<i>An. melas</i>	extérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		intérieur	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Tableau 2 : Captures sur homme - nombre de femelles identifiées par PCR et nombre probable de femelles par espèce dans le complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Dielmo avril 92 à mars 93

Espèces	Lieu	Avr-93	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan - 94	Fevrier	Mars	Total
Vecteurs	Total	65	8	62	1313	1164	605	345	49	59	56	147	49	3922
	extérieur	40	5	33	501	489	272	150	16	26	18	58	33	1641
	intérieur	25	3	29	812	675	333	195	33	33	38	89	16	2281
<i>An. funestus</i>	Total	42	3	13	6	2	25	51	20	30	36	99	38	365
	extérieur	24	1	4	3	1	16	23	5	9	9	29	25	149
	intérieur	18	2	9	3	1	9	28	15	21	27	70	13	216
Complexe	Total	23	5	49	1307	1162	580	294	29	29	20	48	11	3557
<i>An. gambiae</i>	extérieur	16	4	29	498	488	256	127	11	17	9	29	8	1492
	intérieur	7	1	20	809	674	324	167	18	12	11	19	3	2065

Tableau 3 : Captures sur homme - nombre de femelles d'*An. funestus* et du complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois : Dielmo avril 93 à mars 94

Espèces		Lieu	Avr-93	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan - 94	Fevrier	Mars	Total
nombre identifié par PCR	<i>An. gambiae</i>	extérieur	0	0	1	0	4	25	13	2	1	0	1	0	47
		intérieur	0	0	1	4	4	19	15	4	1	1	0	0	49
	<i>An. arabiensis</i>	extérieur	5	3	26	43	44	23	24	9	11	6	24	7	225
		intérieur	3	1	18	71	49	31	26	12	10	9	17	3	250
	<i>An. melas</i>	extérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		intérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nombre probable	<i>An. gambiae</i>	extérieur	0	0	1	0	41	133	45	2	1	0	1	0	224
		intérieur	0	0	1	43	51	123	61	4	1	1	0	0	285
	<i>An. arabiensis</i>	extérieur	16	4	28	498	447	123	82	9	16	9	28	8	1268
		intérieur	7	1	19	766	623	201	106	14	11	10	19	3	1780
	<i>An. melas</i>	extérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		intérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 4 : Captures sur homme - nombre de femelles identifiées par PCR et nombre probable de femelles par espèce dans le complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Dielmo avril 93 à mars 94

Espèces	Lieu	Avr-93	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan-94	Fevrier	Mars	Total
Vecteurs	Total	0	0	0	6	149	248	55	0	0	0	0	0	458
	extérieur	0	0	0	2	69	98	21	0	0	0	0	0	190
	intérieur	0	0	0	4	80	150	34	0	0	0	0	0	268
<i>An. funestus</i>	Total	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	3
	extérieur	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	intérieur	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
Complexe <i>An. gambiae</i>	Total	0	0	0	6	148	246	55	0	0	0	0	0	455
	extérieur	0	0	0	2	69	97	21	0	0	0	0	0	189
	intérieur	0	0	0	4	79	149	34	0	0	0	0	0	266

Tableau 5 : Captures sur homme - nombre de femelles d'*An. funestus* et du complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Ndiop avril 93 à mars 94

Espèces		Lieu	Avr-93	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan - 94	Fevrier	Mars	Total
nombre identifié par PCR	<i>An. gambiae</i>	extérieur	0	0	0	0	12	21	4	0	0	0	0	0	37
		intérieur	0	0	0	0	6	27	6	0	0	0	0	0	39
	<i>An. arabiensis</i>	extérieur	0	0	0	2	35	22	13	0	0	0	0	0	72
		intérieur	0	0	0	3	46	22	23	0	0	0	0	0	94
	<i>An. melas</i>	extérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		intérieur	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Nombre probable	<i>An. gambiae</i>	extérieur	0	0	0	0	18	47	5	0	0	0	0	0	70
		intérieur	0	0	0	0	9	82	7	0	0	0	0	0	98
	<i>An. arabiensis</i>	extérieur	0	0	0	2	51	50	16	0	0	0	0	0	119
		intérieur	0	0	0	3	70	67	26	0	0	0	0	0	166
	<i>An. melas</i>	extérieur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		intérieur	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2

Tableau 6 : Captures sur homme - nombre de femelles identifiées par PCR et nombre probable de femelles par espèce dans le complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Ndiop avril 93 à mars 9

Espèces	Lieu	Avr - 92	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan - 93	Fevrier	Mars	Total
Vecteurs	Total	109	209	153	704	127	133	140	53	94	254	183	130	2289
	chambres	108	189	149	531	56	65	63	49	85	242	161	115	1813
	greniers	1	20	4	173	71	68	77	4	9	12	22	15	476
<i>An. funestus</i>	Total	84	123	95	517	21	18	10	28	84	241	169	111	1501
	chambres	83	112	92	408	0	15	9	27	78	230	149	98	1301
	greniers	1	11	3	109	21	3	1	1	6	11	20	13	200
Complexe <i>An. gambiae</i>	Total	25	86	58	187	106	115	130	25	10	13	14	19	788
	chambres	25	77	57	123	56	50	54	22	7	12	12	17	512
	greniers	0	9	1	64	50	65	76	3	3	1	2	2	276

Tableau 7 : Faunes matinales résiduelles - nombre de femelles d'*An. funestus* et du complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Dielmo avril 92 à mars 93

Espèces		Lieu	Avr - 92	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan - 93	Fevrier	Mars	Total
nombre identifié par PCR	<i>An. gambiae</i>	chambres	9	12	11	14	12	27	26	14	5	3	3	1	137
		greniers	0	1	0	11	16	21	26	3	2	0	1	2	83
	<i>An. arabiensis</i>	chambres	16	62	31	15	21	9	9	3	2	7	9	11	195
		greniers	0	5	1	20	15	12	14	0	1	1	1	0	70
	<i>An. melas</i>	chambres	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4
		greniers	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3
Nombre probable	<i>An. gambiae</i>	chambres	9	12	15	59	20	38	40	17	5	4	3	1	223
		greniers	0	2	0	23	26	41	46	3	2	0	1	2	146
	<i>An. arabiensis</i>	chambres	16	64	41	64	36	12	14	4	2	8	9	14	284
		greniers	0	8	1	41	24	24	25	0	1	1	1	0	126
	<i>An. melas</i>	chambres	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4
		greniers	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5

Tableau 8 : Faunes matinales résiduelles - nombre de femelles identifiées par PCR et nombre probable de femelles par espèce dans le complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Dielmo avril 92 à mars 93

Espèces	Lieu	Avr - 93	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan - 94	Fevrier	Mars	Total
Vecteurs	chambres	0	0	2	21	168	261	50	0	0	0	0	0	502
<i>An. funestus</i>	chambres	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	4
Complexe <i>An. gambiae</i>	chambres	0	0	2	21	168	258	49	0	0	0	0	0	498

Tableau 9 : Faunes matinales résiduelles - nombre de femelles d'*An. funestus* et du complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Ndiop avril 93 à mars 94

Espèces		Lieu	Avr - 93	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Jan - 94	Fevrier	Mars	Total
nombre identifié par PCR	<i>An. gambiae</i>	chambres	0	0	0	0	20	35	9	0	0	0	0	0	64
	<i>An. arabiensis</i>	chambres	0	0	2	15	40	35	38	0	0	0	0	0	130
	<i>An. melas</i>	chambres	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nombre probable	<i>An. gambiae</i>	chambres	0	0	0	0	56	129	9	0	0	0	0	0	194
	<i>An. arabiensis</i>	chambres	0	0	2	20	112	129	40	0	0	0	0	0	303
	<i>An. melas</i>	chambres	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Tableau 10 : Faunes matinales résiduelles - nombre de femelles identifiées par PCR et nombre probable de femelles par espèce dans le complexe *An. gambiae* selon le lieu et le mois de capture : Ndiop avril 93 à mars 94

A l'intérieur et à l'extérieur, *An. arabiensis* a été l'espèce la plus capturée au sein du complexe *An. gambiae* (Figure 5).

D'avril 1993 à mars 1994 à Dielmo, les 3922 femelles d'anophèles capturées se sont réparties comme suit : 365 *An. funestus*, 3557 femelles du complexe *An. gambiae* (509 *An. gambiae*, 3048 *An. arabiensis*). Le nombre de femelles vectrices a également varié à l'intérieur et à l'extérieur selon l'espèce et le mois de capture (Tableaux 3 et 4). Le rapport intérieur-extérieur est égal à 1,45 pour *An. funestus*, 1,28 pour *An. gambiae* et 1,40 pour *An. arabiensis*. Ces trois espèces ont été plus endophages qu'exophages. A l'intérieur du complexe *An. gambiae*, *An. arabiensis* a dominé pour l'année (Figure 5).

D'avril 1993 à mars 1994 à Ndiop, parmi les 458 femelles d'anophèles capturées, 3 ont été de l'espèce *An. funestus*, 455 du complexe *An. gambiae* (168 *An. gambiae*, 285 *An. arabiensis* et 2 *An. melas*). Le nombre de femelles vectrices à l'intérieur a été plus élevé qu'à l'extérieur et a varié selon le mois de capture (Tableaux 5 et 6). Le rapport intérieur-extérieur a été égal à 1,40 pour *An. gambiae* et à 1,39 pour *An. arabiensis*. La tendance a été à l'endophagie pour ces deux espèces. *An. arabiensis* a dominé (Figure 5).

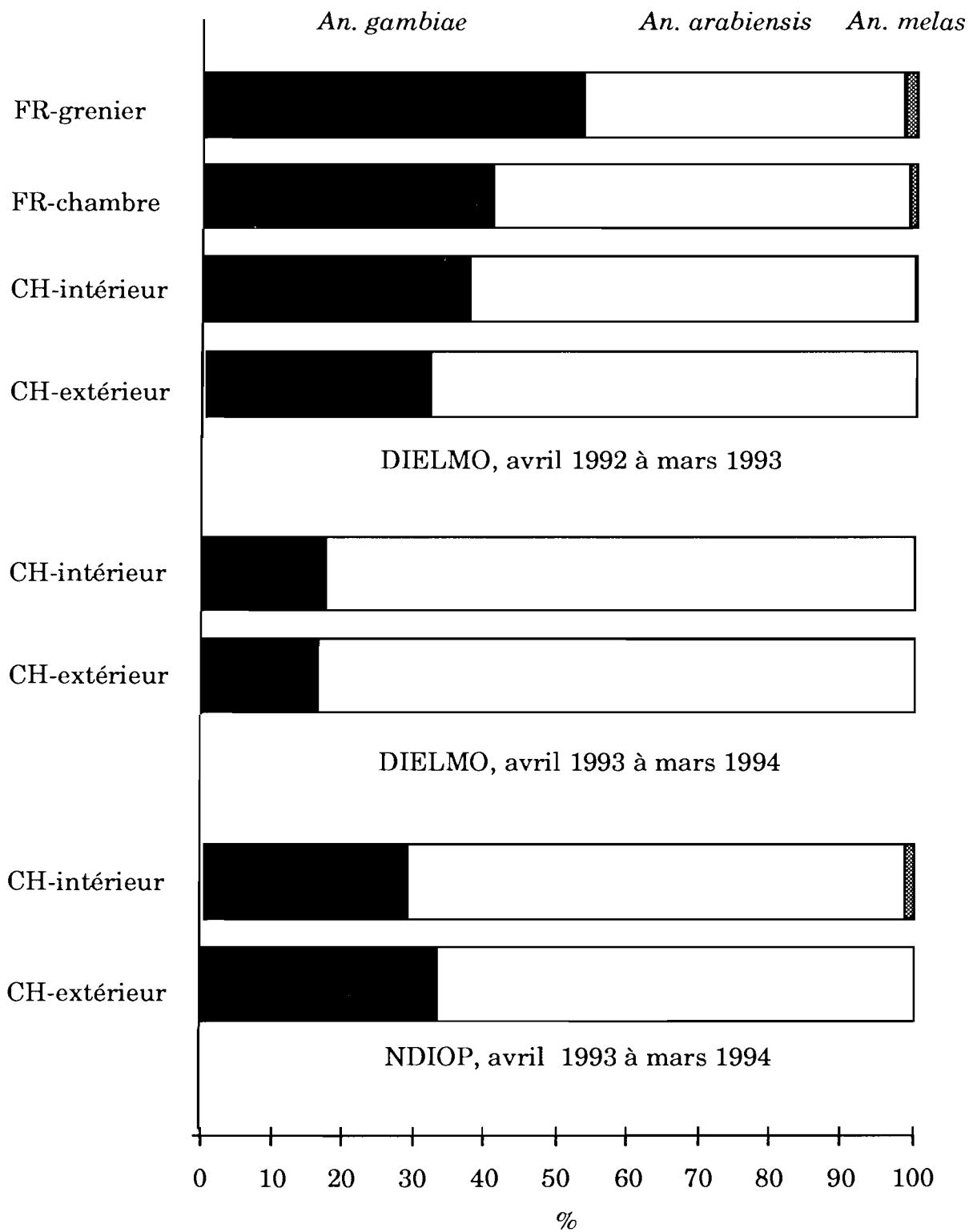
Entre 1992 et 1994 à Dielmo, seul 1 *An. melas* a été capturé sur homme A Ndiop *An. funestus* et *An. melas* ont compté respectivement 3 et 2 femelles capturées sur homme.

II.4.1.2. Les faunes matinales résiduelles

A Dielmo, d'avril 1992 à mars 1993, 2289 de femelles vectrices ont été collectées dont 1501 *An. funestus* et 788 anophèles du complexe *An. gambiae* (369 *An. gambiae*, 410 *An. arabiensis* et 9 *An. melas*). Les récoltes ont été effectuées aussi bien dans les chambres que dans les greniers. Le nombre de femelles dans les chambres et les greniers a varié selon l'espèce et le mois de la récolte (Tableaux 7 et 8). *An. gambiae* a dominé dans les greniers, *An. arabiensis* dans les chambres (Figure 5).

A Dielmo d'avril 1993 à mars 1994, les récoltes de faunes matinales résiduelles ont permis d'obtenir en avril, mai et juin 203 femelles vectrices dont 100 *An. funestus* (63 en avril, 19 en mai, 13 en juin dans les chambres et 2 en mai, 3 en juin dans les greniers) et 103 anophèles du complexe *An. gambiae* dont 4 *An. gambiae* (1 en mai dans les greniers, 3 en juin dans les

Figure 5 : Proportions des espèces du complexe *An. gambiae* en fonction de la méthode et du lieu de capture.



FR = faunes résiduelles

CH = capture sur homme

chambres) et 99 *An. arabiensis* (20 en avril, 31 en mai, 40 en juin dans les chambres et 2 en mai, 6 en juin dans les greniers).

A Ndiop, à partir de juin, le nombre de femelles récoltées a augmenté progressivement avec un maximum en septembre. A partir d'octobre les effectifs ont chuté pour devenir nuls en novembre (Tableaux 9 et 10).

Durant ces deux années d'étude à Dielmo, *An. funestus* et *An. arabiensis* ont été toujours présents. *An. gambiae* au cours de certains mois n'a pas été capturé sur homme ; cependant les faunes matinales résiduelles ont montré la présence d'*An. gambiae* toute l'année (1992-1993).

A Ndiop, les vecteurs ont été présents pendant la saison pluvieuse et ont disparu avec la fin de celle-ci. Les grands effectifs ont été atteints un mois plus tard qu'à Dielmo en (d'avril 1992 à mars 1993).

A Dielmo, entre avril 1992 et mars 1993, 5680 anophèles vecteurs ont été capturés sur homme et en faunes matinales résiduelles. *An. funestus* représentait 61,4% de l'effectif, *An. arabiensis* 21,1%, *An. gambiae* 17,3% et *An. melas* 0,2 %. Entre avril 1993 et mars 1994, 3922 anophèles ont été capturés sur homme et les proportions étaient de 9,3%, 77,7% et 13,0% respectivement pour *An. funestus*, *An. arabiensis* et *An. gambiae*.

A Ndiop (avril 1993 à mars 1994), 960 anophèles ont été capturés, dont 0,7% d'*An. funestus*, 61,3% d'*An. arabiensis*, 37,3% d'*An. gambiae*, 0,3% d'*An. melas*.

II.4.2. Taux d'agressivité

II.4.2.1. Taux d'agressivité des vecteurs

En 1992-1993 à Dielmo, le nombre moyen de piqûres de vecteurs par homme et par nuit (PHN) a été de 23,5 pour l'année (intérieur et extérieur confondus). Ce PHN annuel a été de 20,8 à l'extérieur et de 26,3 à l'intérieur. Ce PHN a varié au cours de l'année en fonction du lieu et du mois avec des pics de 64 PHN pour les captures extra-domiciliaires en juillet, et de 67,2 en août pour les captures intra-domiciliaires. Une recrudescence a été observée entre janvier et février (Figure 6A).

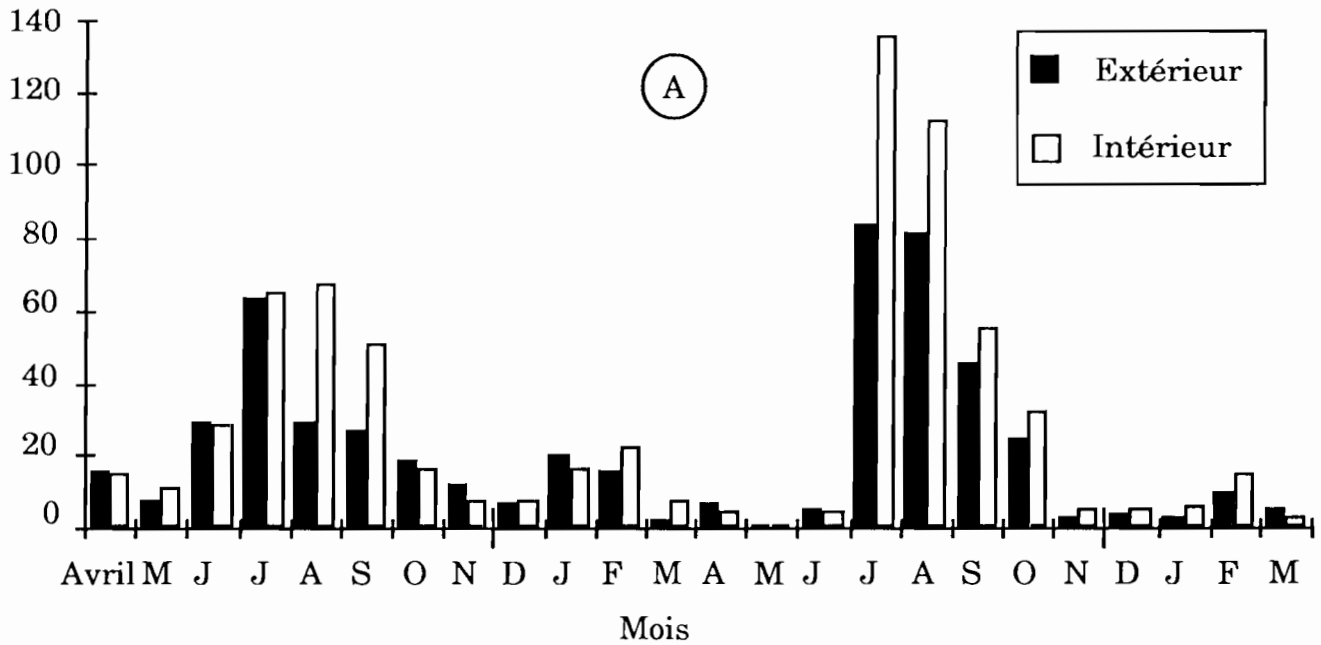
En 1993-1994 à Dielmo, le PHN a été de 27,2, Ce PHN avec 22,72 à l'extérieur et à 31,68 à l'intérieur. Il a régulièrement augmenté à partir de mai avec des pics en juillet de 83,5 et 135,3 respectivement pour l'extérieur et l'intérieur. Une recrudescence a été observée en février (Figure 6A).

Les premières femelles de vecteurs capturées sur homme à Ndiop en 1993-1994 l'ont été en juillet. Le PHN annuel a été de 3,2. A l'extérieur il a

Figure 6 : Variations mensuelles du taux d'agressivité des vecteurs
(DIELMO et NDIOP, avril 1992 à mars 1994)

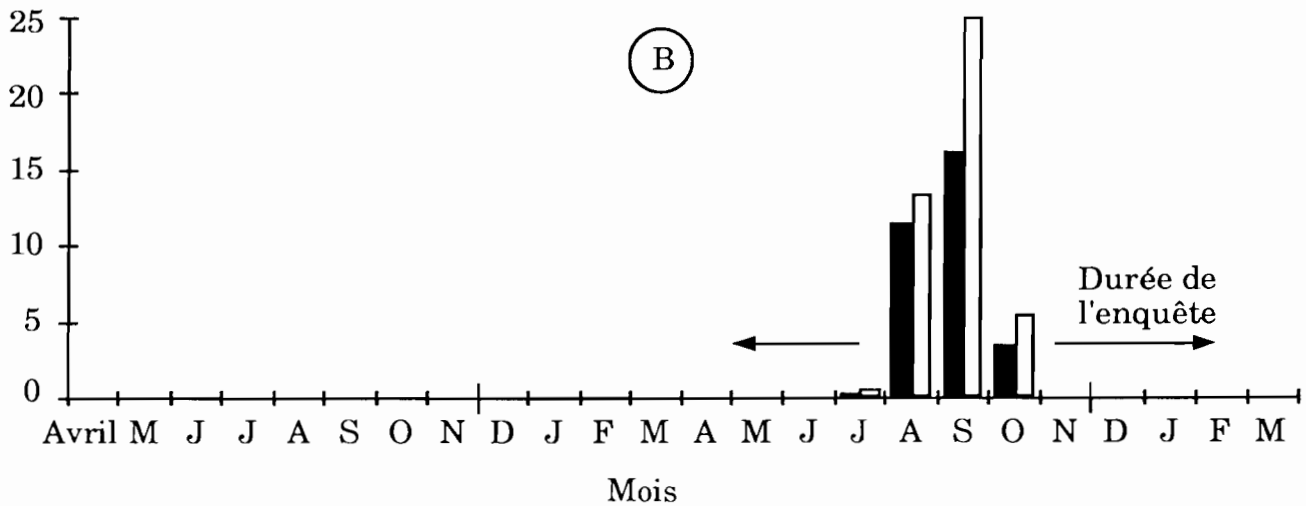
DIELMO, avril 1992 à mars 1994

Nombre de piqûres/homme/nuit



NDIOP avril 1993 à mars 1994

Nombre de piqûres/homme/nuit



été de 2,6, à l'intérieur de 3,7. Le PHN a augmenté à partir de juillet, et a atteint les pics de 16,2 à l'extérieur et de 25 à l'intérieur en septembre puis a diminué à partir d'octobre pour s'annuler en novembre. Les variations à l'intérieur et à l'extérieur ont été similaires (Figure 6B).

II.4.2.2. Taux d'agressivité par espèce

En raison des effectifs très faibles à Dielmo et à Ndiop, *An. melas* n'a pas été étudié.

II.4.2.2.1. Taux d'agressivité pour *An. funestus*

A Dielmo d'avril 1992 à mars 1993, le PHN annuel pour *An. funestus* a été de 13,8. Il a été de 11,5 à l'extérieur et de 16 à l'intérieur. Il a augmenté à partir de mai avec des pics de 43,8 à l'extérieur et de 56 à l'intérieur en juillet. La recrudescence a été nette entre janvier et février (Figure 7).

A Dielmo d'avril 1993 à mars 1994, le PHN annuel pour *An. funestus* a été de 2,5. Il a été de 2,1 à l'extérieur et de 3 à l'intérieur. A partir de mai, il a augmenté très faiblement pour atteindre des pics en octobre de 3,8 à l'extérieur et de 4,7 à l'intérieur. En février une recrudescence a été observée (Figure 7).

A Ndiop d'avril 1993 à mars 1994, *An. funestus* a été capturé sur homme et n'a pas été étudié.

II.4.2.2.2. Taux d'agressivité pour *An. arabiensis*

A Dielmo en 1992-1993, le PHN annuel pour *An. arabiensis* a été de 5,5. Il a été de 5,7 à l'extérieur et de 5,3 à l'intérieur. Le PHN a augmenté régulièrement au cours de l'année pour atteindre des pics de 14,6 à l'extérieur en juillet et de 21,8 à l'intérieur en août. entre novembre et décembre aucune femelle n'avait piqué à l'intérieur(Figure 8A).

A Dielmo en 1993-1994, le PHN annuel pour *An. arabiensis* a été de 21,1. Il a été de 17,5 à l'extérieur et de 24,7 à l'intérieur. Le PHN a augmenté régulièrement avec des pics de 83 à l'extérieur et de 127,7 à l'intérieur(Figure 8A).

A Ndiop en 1993-1994, les premières femelles de *An. arabiensis* capturées sur homme l'ont été en juillet. le PHN annuel pour *An. arabiensis* a été de 2. Il a été de 1,6 à l'extérieur et de 2,3 à l'intérieur.

Figure 7 : Variations mensuelles du taux d'agressivité de *Anopheles funestus*,
(DIELMO, avril 1992 à mars 1994).

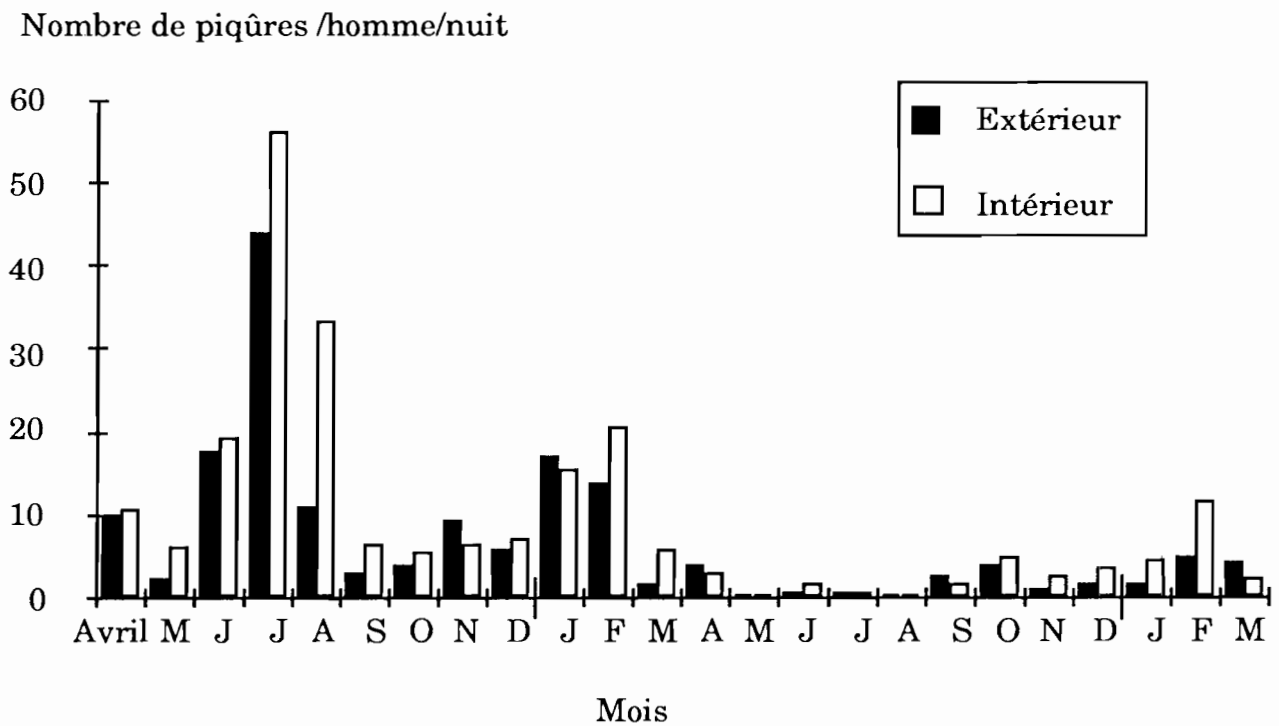
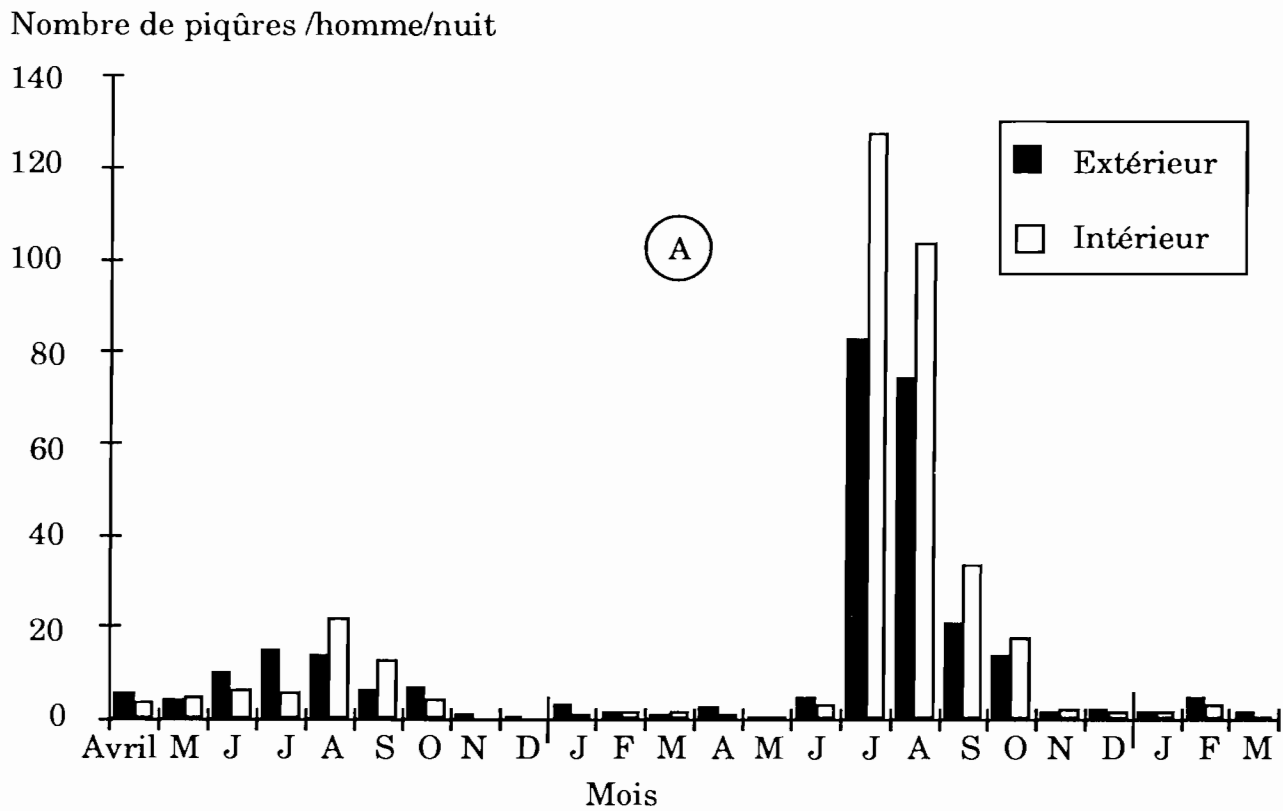
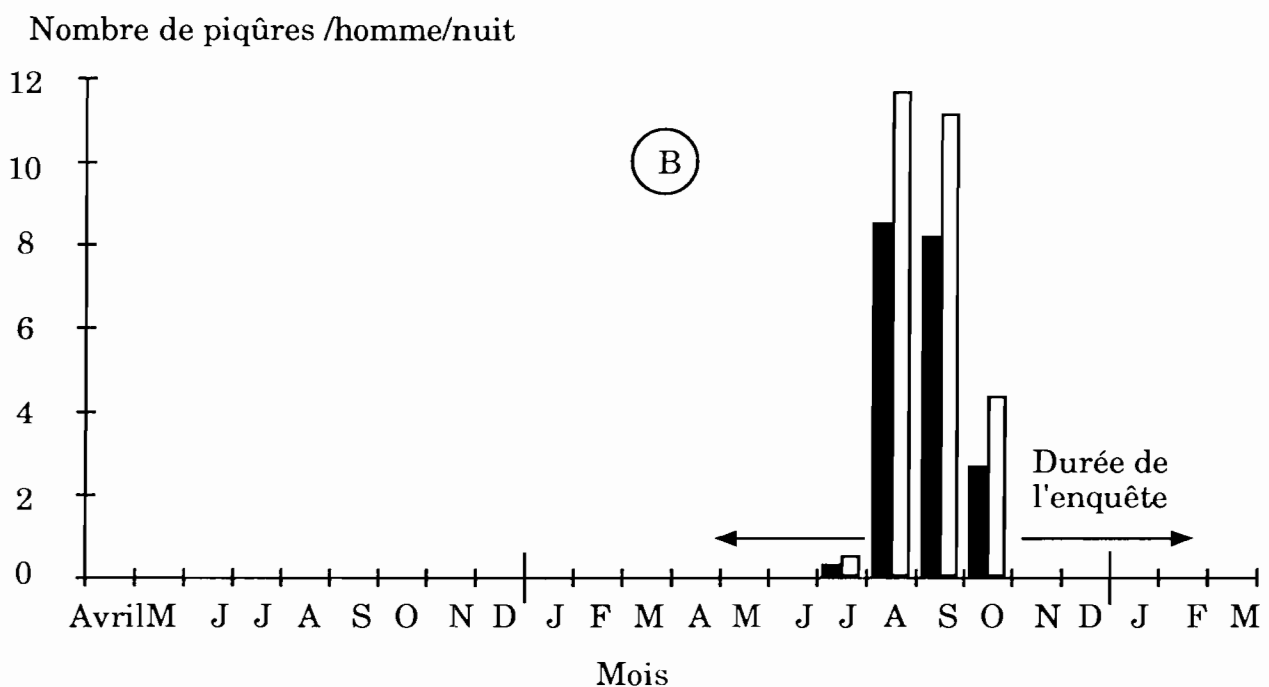


Figure 8 : Variations mensuelles du taux d'agressivité de *Anopheles arabiensis* (DIELMO et NDIOP, 1992 - 1994)

DIELMO Avril 1992 à Mars 1994



NDIOP Avril 1993 à Mars 1994



Le PHN a augmenté pour atteindre des pics de 8,6 et 11,7 en août respectivement à l'extérieur et à l'intérieur, puis a diminué à partir de septembre pour être nul en novembre. Les variations à l'intérieur et à l'extérieur ont été similaires (Figure 8B).

II.4.2.2.3. Taux d'agressivité pour *An. gambiae*

A Dielmo en 1992-1993, le PHN annuel pour *An. gambiae* a été de 4,3. Il a été de 3,6 à l'extérieur et de 5,6 à l'intérieur. Le PHN a augmenté au cours de l'année pour atteindre en septembre des pics de 17,8 à l'extérieur et de 31,9 à l'intérieur. Il a ensuite diminué régulièrement pour s'annuler en mars (Figure 9A).

A Dielmo en 1993-1994, le PHN annuel pour *An. gambiae* a été de 3,5. Il a été de 3,1 à l'extérieur et de 4 à l'intérieur. Le PHN a augmenté régulièrement au cours de l'année pour atteindre en septembre des pics de 22,2 à l'extérieur et de 20,5 à l'intérieur. Il a ensuite diminué régulièrement avec des valeurs très basses à partir de décembre et s'est annulé à partir de février à l'intérieur et en mars à l'extérieur (Figure 9A).

A Ndiop en 1993-1994, *An. gambiae* est apparu tard (août). Le PHN annuel pour *An. gambiae* a été de 1,2. A l'extérieur il a été de 1, à l'intérieur de 1,4. Le PHN a augmenté pour atteindre des pics de 7,8 et 13,7 en septembre respectivement à l'extérieur et à l'intérieur puis a diminué dès le mois d'octobre pour s'annuler en novembre. Intérieur et extérieur ont présenté des variations similaires (Figure 9B).

II.4.3. Densités au repos des femelles dans les chambres

II.4.3.1. Densités au repos d'*An. funestus*

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, le nombre de femelles par chambre et par jour (FCJ) chez d'*An. funestus* a augmenté à partir d'avril pour atteindre un premier pic de 34 FCJ en juillet. Il a chuté d'août en novembre. A partir de décembre la recrudescence s'est amorcé et a atteint un second pic de 46 FCJ en janvier. Entre février et mars les densités sont restées supérieures à 16 FCJ (Figure 10A).

D'avril 1993 à mars 1994 à Ndiop, seul 4 femelles d'*An. funestus* ont été capturées en faune résiduelles.

Figure 9 : Variations mensuelles du taux d'agressivité de *Anopheles gambiae* (DIELMO et NDIOP, 1992 - 1994)

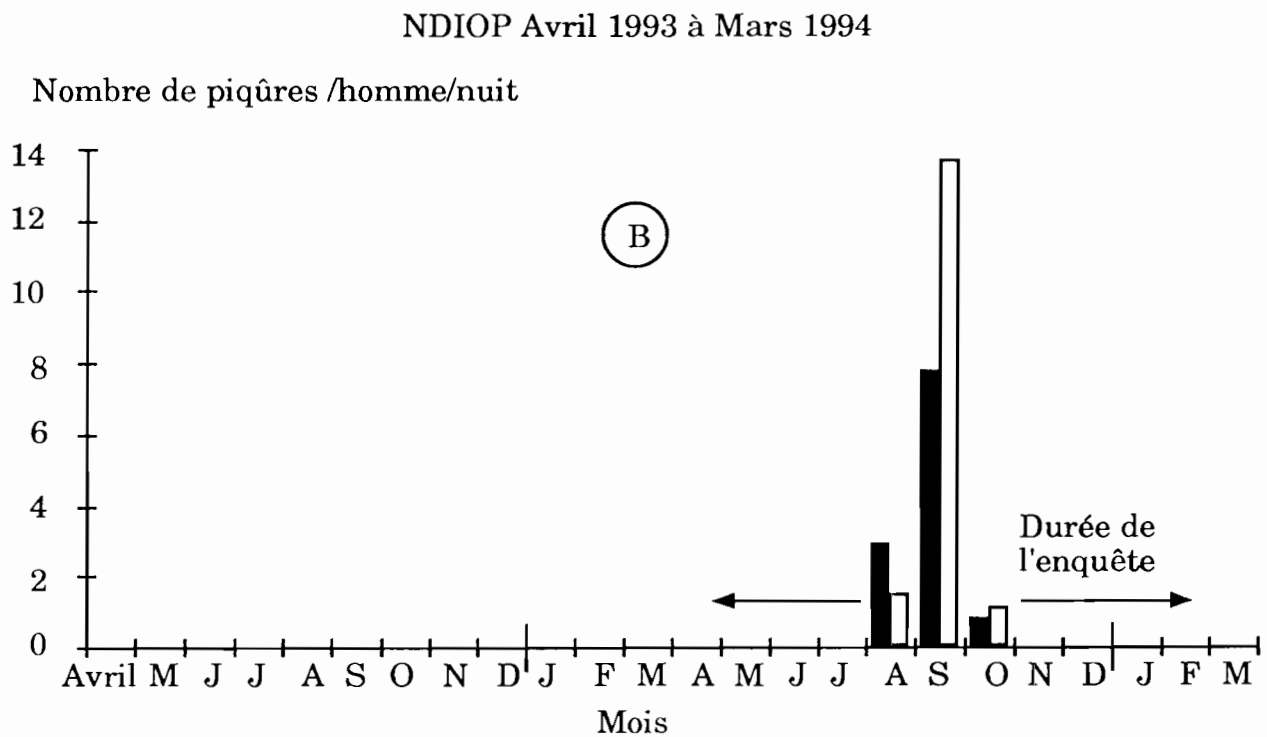
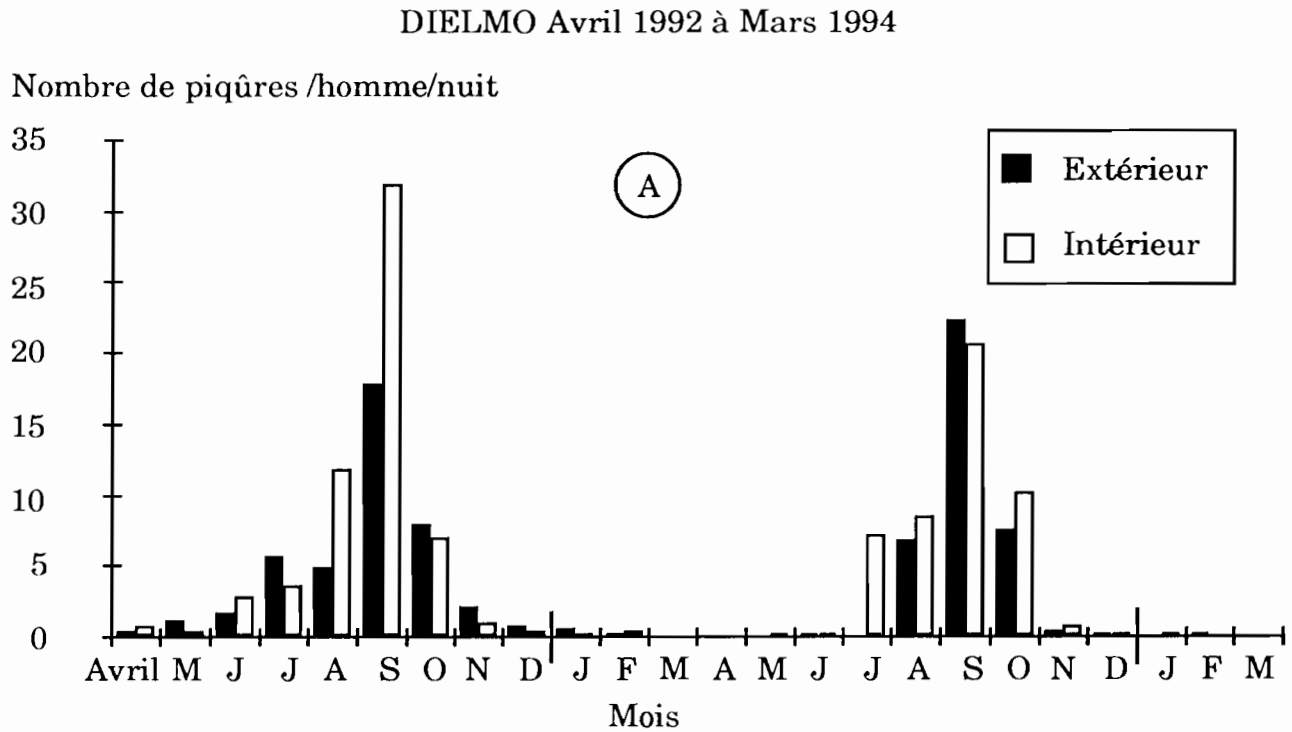
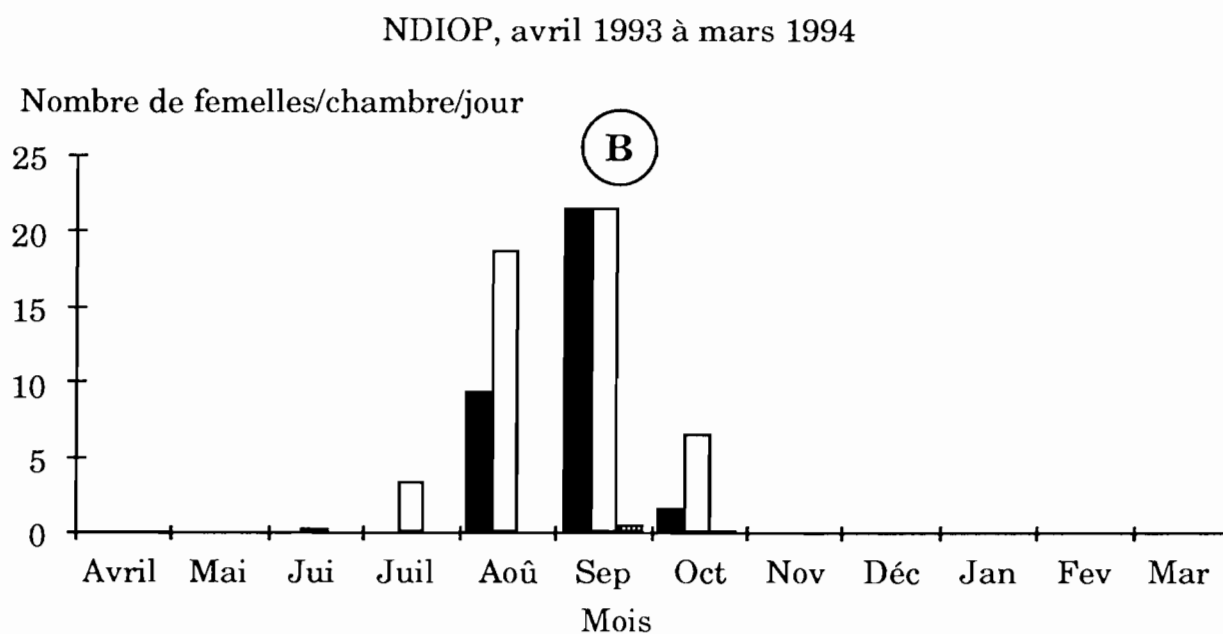
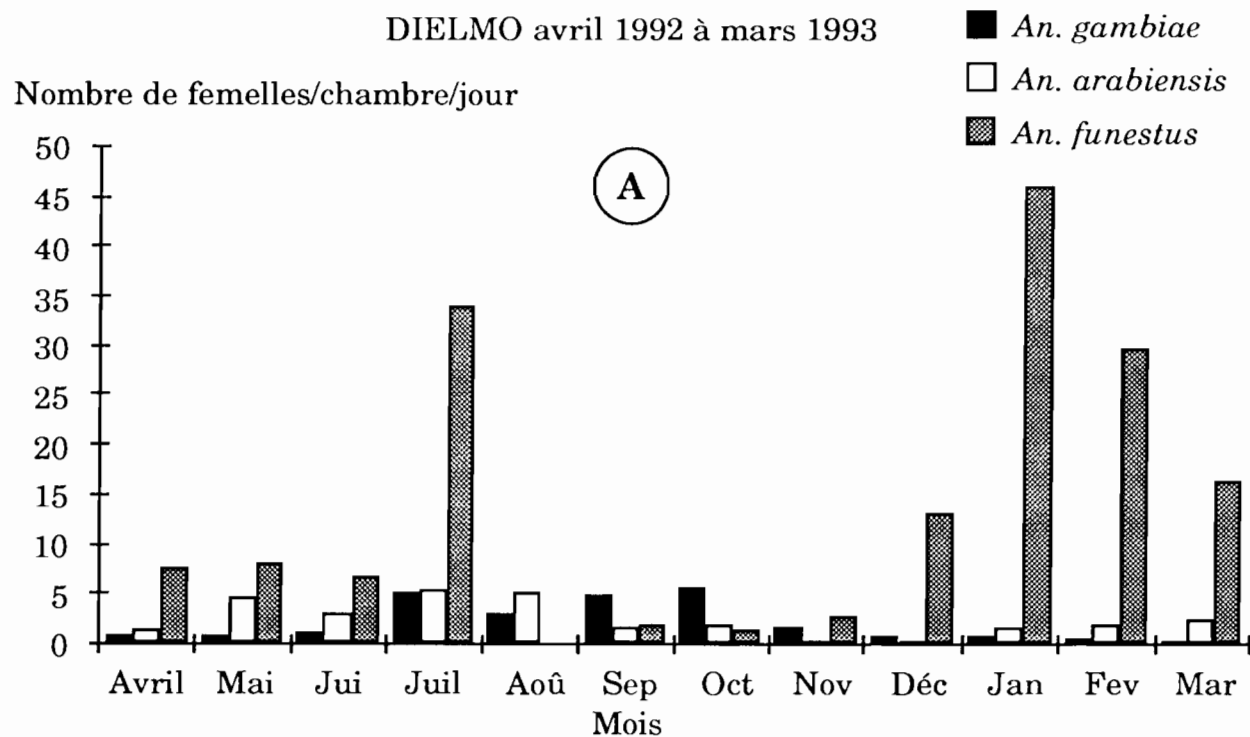


Figure 10 : Variations mensuelles de la densité de repos d'*An. gambiae*, d'*An. arabiensis* et d'*An. funestus* dans les chambres DIELMO (avril 1992 à mars 1993) et NDIOP avril 1993 à mars 1994)



II.4.3.2. Densités au repos d'*An. arabiensis*

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, le nombre moyen FCJ d'*arabiensis* a été de 1,86. Il a varié entre 0,33 (décembre) et 5,30 (juillet). Les mois de juillet et août ont présenté les plus fortes densités (Figure 10A).

D'avril 1993 à mars 1994 à Ndiop, les premières femelles d'*An. arabiensis* sont apparues au mois de juin. Le nombre de FCJ le plus élevé a été observé en septembre (21,5 FCJ). Il a commencé à chuter en octobre pour s'annuler en novembre (Figure 10B).

II.4.3.3. Densités au repos d'*An. gambiae*

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, le nombre moyen de FCJ d'*An. gambiae* a été de 1,30 FCJ. Le nombre de FCJ a varié au cours des mois avec un pic de 5,73 en octobre (Figure 10A).

A Ndiop, d'avril 1993 à mars 1994, *An. gambiae* est apparu au mois d'août. Le nombre moyen de FCJ a été de 2,69 FCJ et il a augmenté à partir d'août pour atteindre un pic de 21,5 FCJ en septembre. Ce nombre moyen de FCJ a baissé à partir d'octobre pour s'annuler en novembre (Figure 10B).

Un seul *An. melas* a été capturé en faunes matinales résiduelles à Ndiop.

A Dielmo *An. arabiensis*. a dominé dans les chambres entre avril 1992 et mars 1993. Dans les greniers, *An. gambiae* a dominé légèrement (Figure 5)

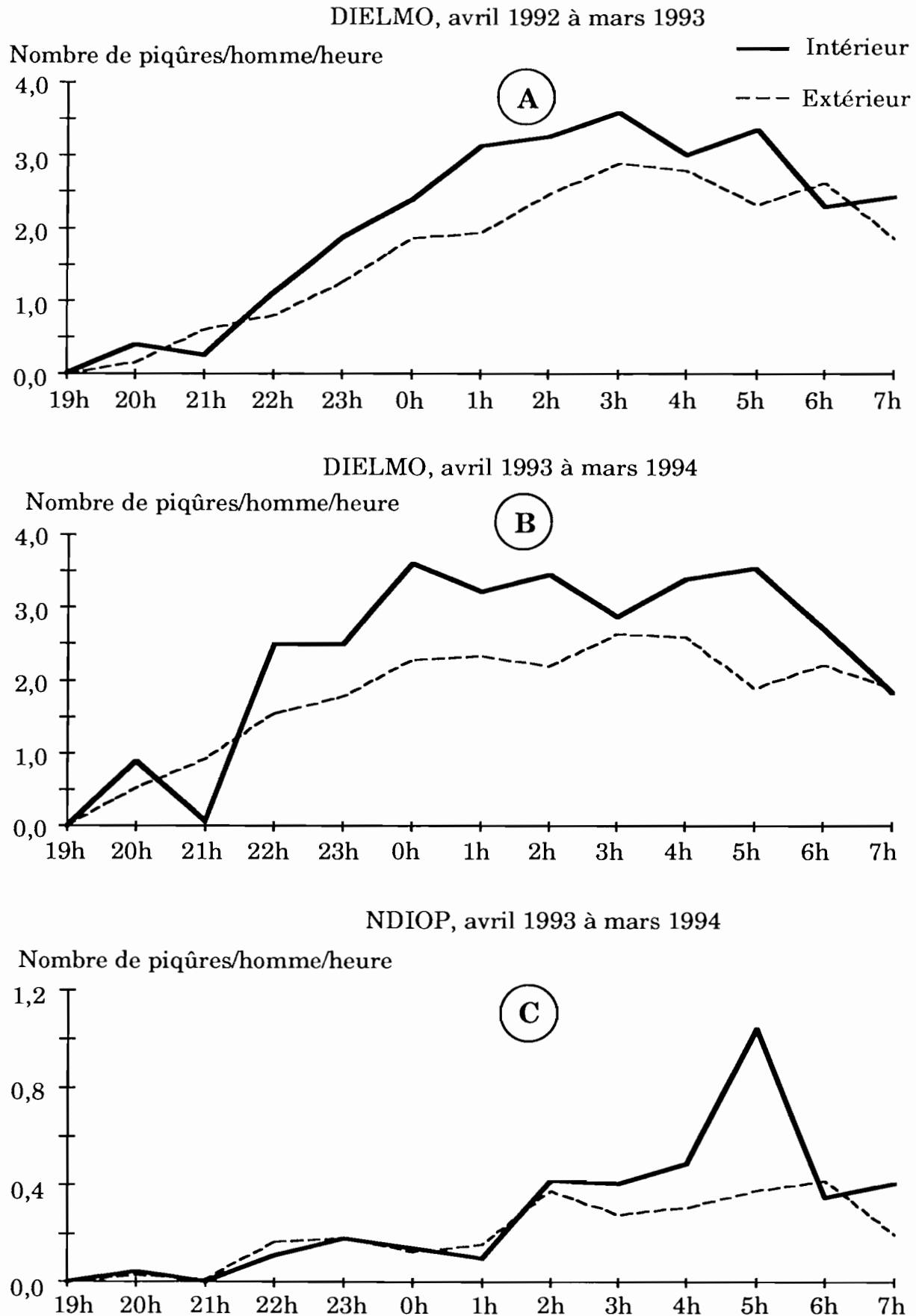
II.4.4. Cycle d'agressivité

II.4.4.1 Cycle d'agressivité des vecteurs

A Dielmo d'avril 1992 à mars 1993, les vecteurs ont été agressifs à partir de 19h à l'extérieur et à l'intérieur. Le nombre moyen de piqûres par homme et par heure (PHH) a ensuite augmenté régulièrement à l'extérieur et à l'intérieur avec un pic entre 2 et 3 h. Le plus grand nombre de piqûre a été enregistré entre 0 h et 6 h (Figure 11A).

A Dielmo d'avril 1993 à mars 1994, l'agressivité observée était semblable à celle de l'année précédente, un plateau a été atteint à partir de

Figure 11 : Cycles d'agressivité des vecteurs à l'intérieur et à l'extérieur (DIELMO et NDIOP, avril 1992 à mars 1994)



0 h pour les captures à l'intérieur. Les moustiques ont été plus agressifs dans la deuxième moitié de la nuit (Figure 11B)..

A Ndiop d'avril 1993 à mars 1994, l'agressivité des vecteurs a évolué de la même façon qu'à Dielmo à l'extérieur et à l'intérieur, avec un pic marqué qui a été atteint entre 4 et 5 h à l'intérieur (Figure 11C).

II.4.4.2. Cycle d'agressivité par espèce

II.4.4.2.1. Cycle d'agressivité pour *An. funestus*

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, *An. funestus* a été agressif à partir de 19 h. Il a beaucoup plus piqué dans la seconde moitié de la nuit. Les pics d'agressivité se situaient entre 2 et 3 h pour les captures à l'extérieur et à l'intérieur (Figure 12A). D'avril 1993 à mars 1994 à Dielmo, l'évolution a été la même. Un second pic pour les captures à l'extérieur à l'intérieur a été observé entre 5 et 6 h. A l'intérieur, deux pics supplémentaires, l'un entre 22 et 23 h et l'autre entre 1 et 2 h ont été observés (Figure 12B).

II.4.4.2.2. Cycle d'agressivité pour *An. arabiensis*

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, le nombre moyen de PHH a augmenté régulièrement à partir de 19 h. les pics ont été observés à entre 4 et 5 h pour les captures à l'intérieur et entre 5 et 6h pour les captures à l'extérieur. *An. arabiensis* a été plus agressif dans la seconde moitié de la nuit (Figure 13A).

d'avril 1993 à mars 1994 à Dielmo, les variations du nombre moyen de PHH ont été similaires. Pour les captures à l'intérieur, les pics d'agressivité se situaient entre 1 et 0 h. et entre 1 et 5 h. Pour les captures à l'extérieur la progression s'est faite régulièrement et un plateau a été atteint entre 0 et 1 h (Figure 13B).

A Ndiop en 1993-1994, le PHH d'*An. arabiensis* a augmenté à partir de 19 h et a présenté un pic entre 4 et 5 h pour les captures à l'intérieur et à l'extérieur. *An. arabiensis* a été plus agressif dans la seconde moitié de la nuit (Figure 13C).

II.4.4.2.3. Cycle d'agressivité pour *An. gambiae*

A Dielmo, d'avril 1992 à mars 1993, *An. gambiae* a été agressif à partir de 19 h à l'extérieur et à partir de 21 h à l'intérieur. Le PHH a

Figure 12 : Cycles d'agressivité de *An. funestus* à l'intérieur et à l'extérieur (DIELMO et NDIOP, avril 1992 à mars 1994)

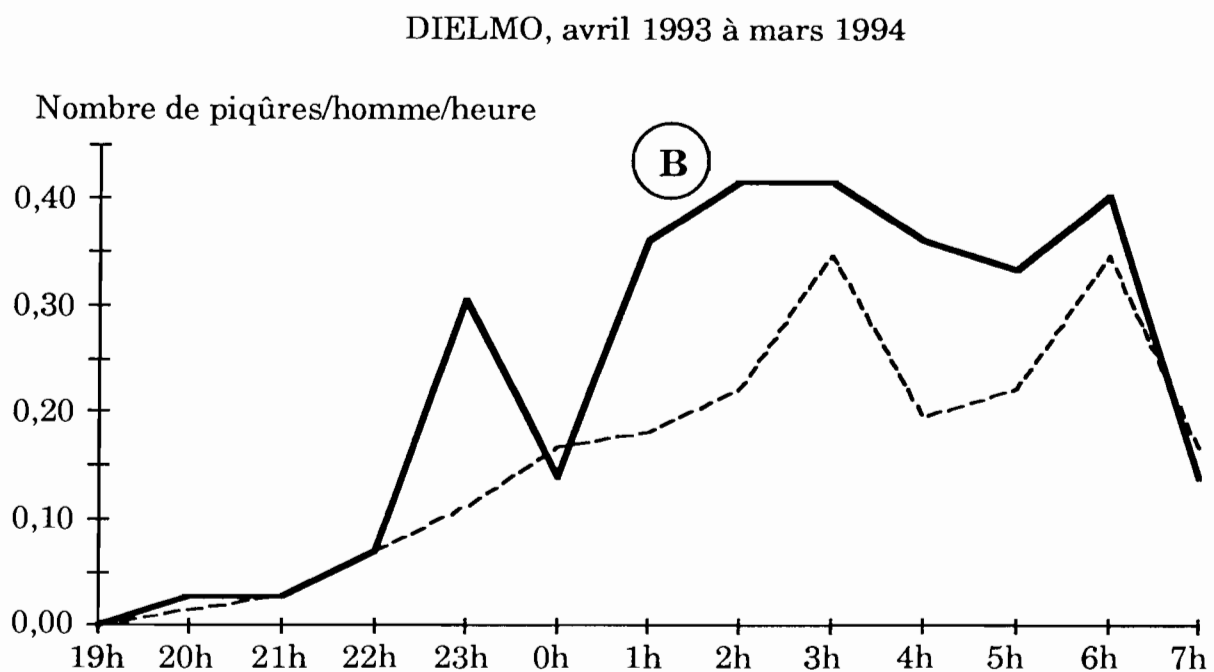
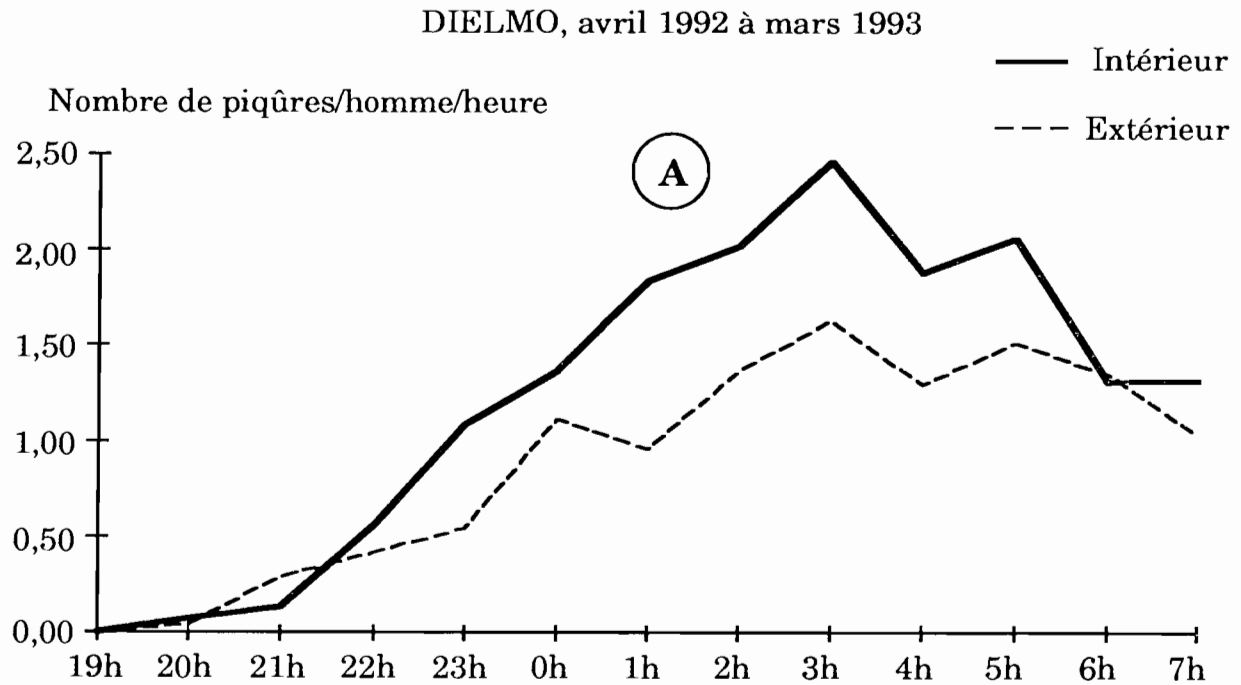
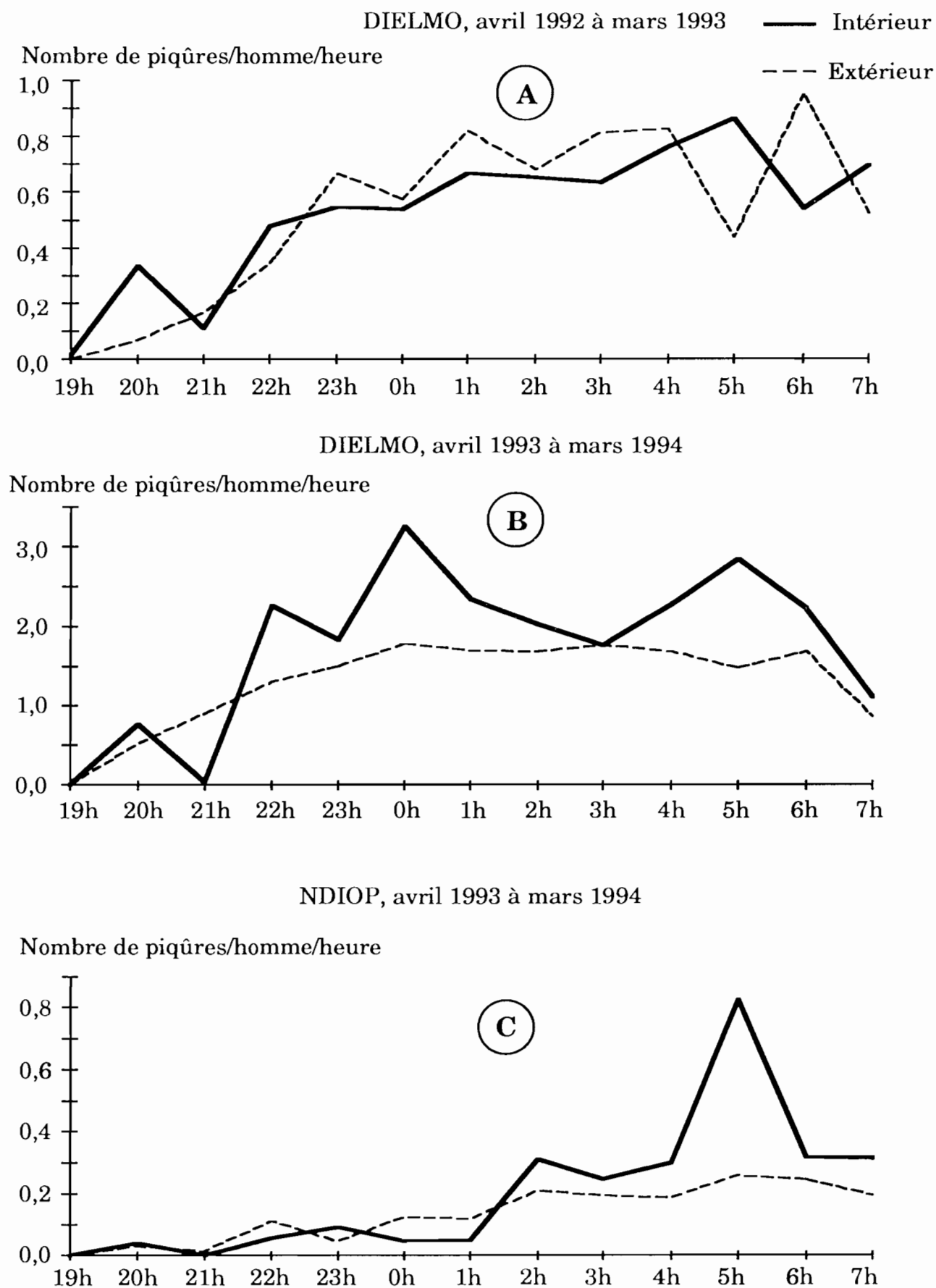


Figure 13 : Cycles d'agressivité de *An. arabiensis* à l'intérieur et à l'extérieur (DIELMO et NDIOP, avril 1992 à mars 1994)



augmenté et a atteint un pic entre 0 et 1 h à l'intérieur et entre 1 et 4 h à l'extérieur (figure 14A). Entre avril 1993 et mars 1994, une situation inverse entre l'extérieur et l'intérieur a été observée pour le début d'activité. Le reste a été similaire avec un pic entre 1 et 2 h (intérieur) et entre 3 et 4 h (extérieur). Une recrudescence est observée entre 6 h et 7 h à l'intérieur et à l'extérieur (Figure 14B).

A Ndiop d'avril 1993 à mars 1994, *An. gambiae* a été agressif à partir de 21 h. Il a été plus agressif dans la seconde moitié de la nuit. Trois pics ont été observés à l'extérieur, mais le nombre réduit de femelles identifiées (76) ne permet pas d'obtenir des courbes précises (Figure 14C).

II.4.5. Taux de parturité

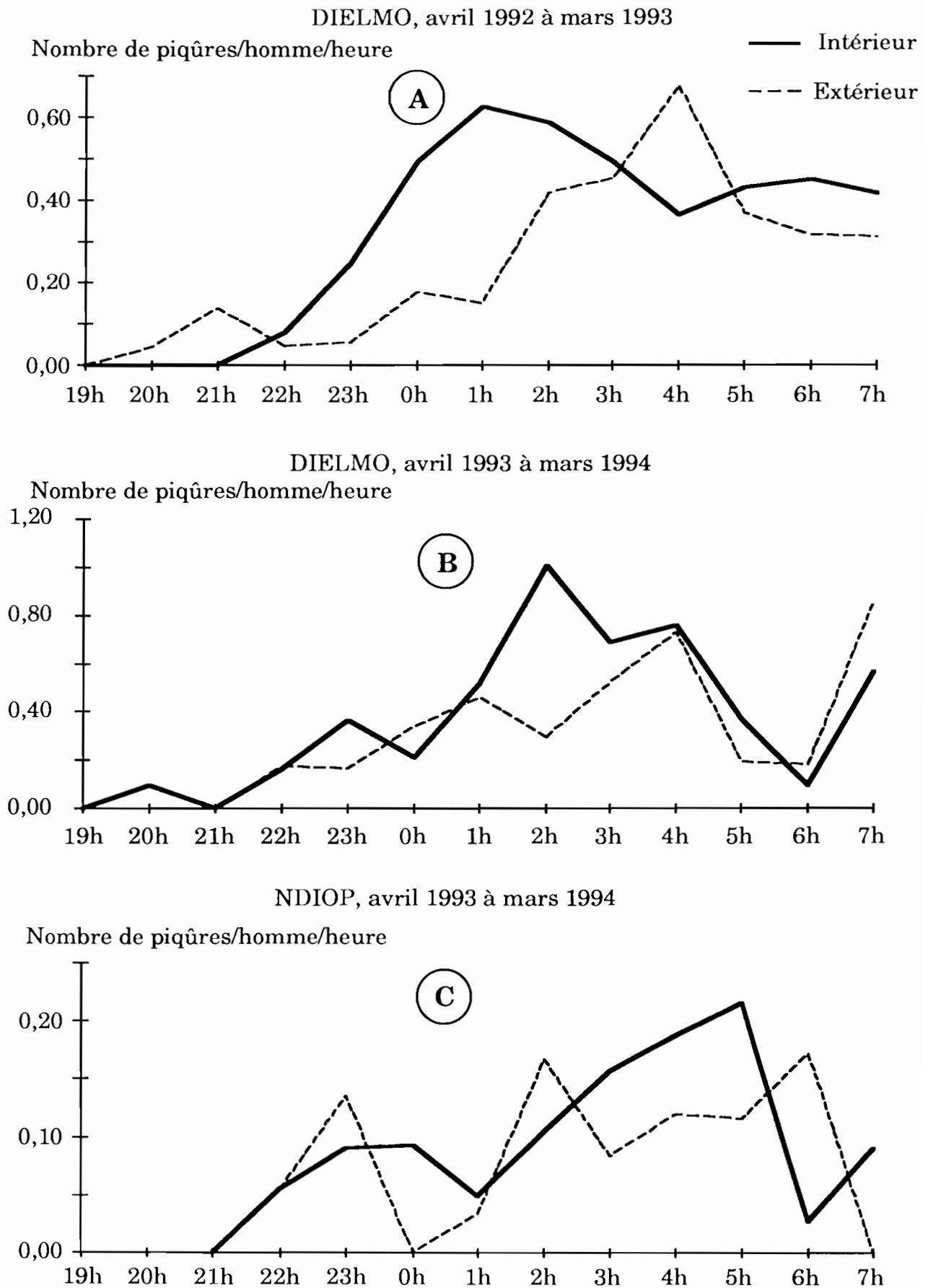
Entre avril 1992 et mars 1993 à Dielmo, l'étude du taux de parturité des vecteurs a été effectuée sur 479 femelles du complexe *An. gambiae* disséquées et identifiées, et sur 1159 *An. funestus*. Chez *An. funestus*, Sokhna (1994) a trouvé 883 pares contre 276 nullipares soit un taux de parturité moyen de 76,19%. Suite à la réalisation de la PCR, le taux de parturité a pu être estimé pour *An. arabiensis* et *An. gambiae*. Pour *An. arabiensis*, le taux de parturité moyen a été estimé à 63,64% (189 pares contre 109 nullipares). *An. gambiae* a eu un taux de parturité moyen de 74,18% (135 contre 47 nullipares). Pour *An. arabiensis* et *An. gambiae*, les variations saisonnières du taux de parturité n'ont pas été significatives. Pour *An. funestus* elles ont été significatives entre le deuxième et le troisième ($\chi^2 = 4,33$ pour 1 ddl, $p < 0,02$) et entre le troisième et le quatrième ($\chi^2 = 4,85$ pour 1 ddl, $p < 0,02$) trimestre (Tableau 11).

Entre avril 1993 et mars 1994 à Dielmo, le TP moyen a été de 89,18% pour *An. funestus* (272 pares contre 33 nullipares). Après PCR, nous avons trouvé pour *An. gambiae*, un taux de parturité de 77,14% (54 pares et 16 nullipares) et de 74,70 pour *An. arabiensis* (209 pares, 70 nullipares) (Tableau 11).

Entre les 2 années, les variations du taux de parturité ont été très significatives pour *An. arabiensis* ($\chi^2 = 8,56$ pour 1 ddl, $p < 0,02$). On a assisté à une augmentation du TP moyen trimestriel en corrélation avec une baisse de la densité pour *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus*.

A Ndiop entre avril 1993 et mars 1994, le taux de parturité a été étudié chez 33 *An. gambiae* (30 pares, 3 nullipares) et 83 *An. arabiensis* (74 pares, 9 nullipares). Les taux de parturité moyen respectifs sont 90,91% et 89,16%. Les taux trimestriels sont restés supérieurs à 86% (Tableau 11).

Figure 14 : Cycles d'agressivité de *An. gambiae* à l'intérieur et à l'extérieur (DIELMO et NDIOP, avril 1992 à mars 1994)



LIEU	ESPECES	<i>An. gambiae</i>			<i>An. arabiensis</i>			<i>An. funestus</i>		
	PERIODES	P	N	TP en %	P	N	TP en %	P	N	TP en %
DIELMO	Avr 92- Juin	11	6	64,71	92	57	61,74	263	110	70,51
	Juil - Sept	67	28	70,53	38	29	56,72	580	189	75,42
	Oct - Dec	50	10	83,33	28	9	75,68	303	87	77,69
	Jan-Mars 93	7	3	70,00	31	13	70,45	341	81	80,81
	Année 92-93	135	47	74,18	189	108	63,64	883	276	76,19
	Avr 93- Juin	-	-	-	26	14	65,00	38	13	74,51
	Juil - Sept	26	15	63,41	76	45	62,81	21	3	87,50
	Oct - Dec	27	0	100	59	5	92,19	82	2	97,62
	Jan-Mars 94	1	1	50,00	48	6	88,89	131	15	89,73
	Année 93-94	54	16	77,14	209	70	74,91	272	33	89,18
	Avr 93- Juin	0	0	-	-	-	-	-	-	-
NDIOP	Juil - Sept	25	3	89,29	53	8	86,89	-	-	-
	Oct - Dec	5	0	100	21	1	95,45	-	-	-
	Jan-Mars 94	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Année 93-94	30	3	90,91	74	9	89,16	-	-	-

P = nombre de femelles pares

N = nombre de femelles nullipares

TP = taux de parurité

Tableau 11 : Variations saisonnières du, taux de parurité à Dielmo
(avril 1992 à mars 1994) et à Ndiop (avril 1993 à mars 1994).

II.4.6. Préférences trophiques

L'origine des repas de sang de vecteurs a été déterminée par ELISA par la méthode modifiée de Beier (1988b).

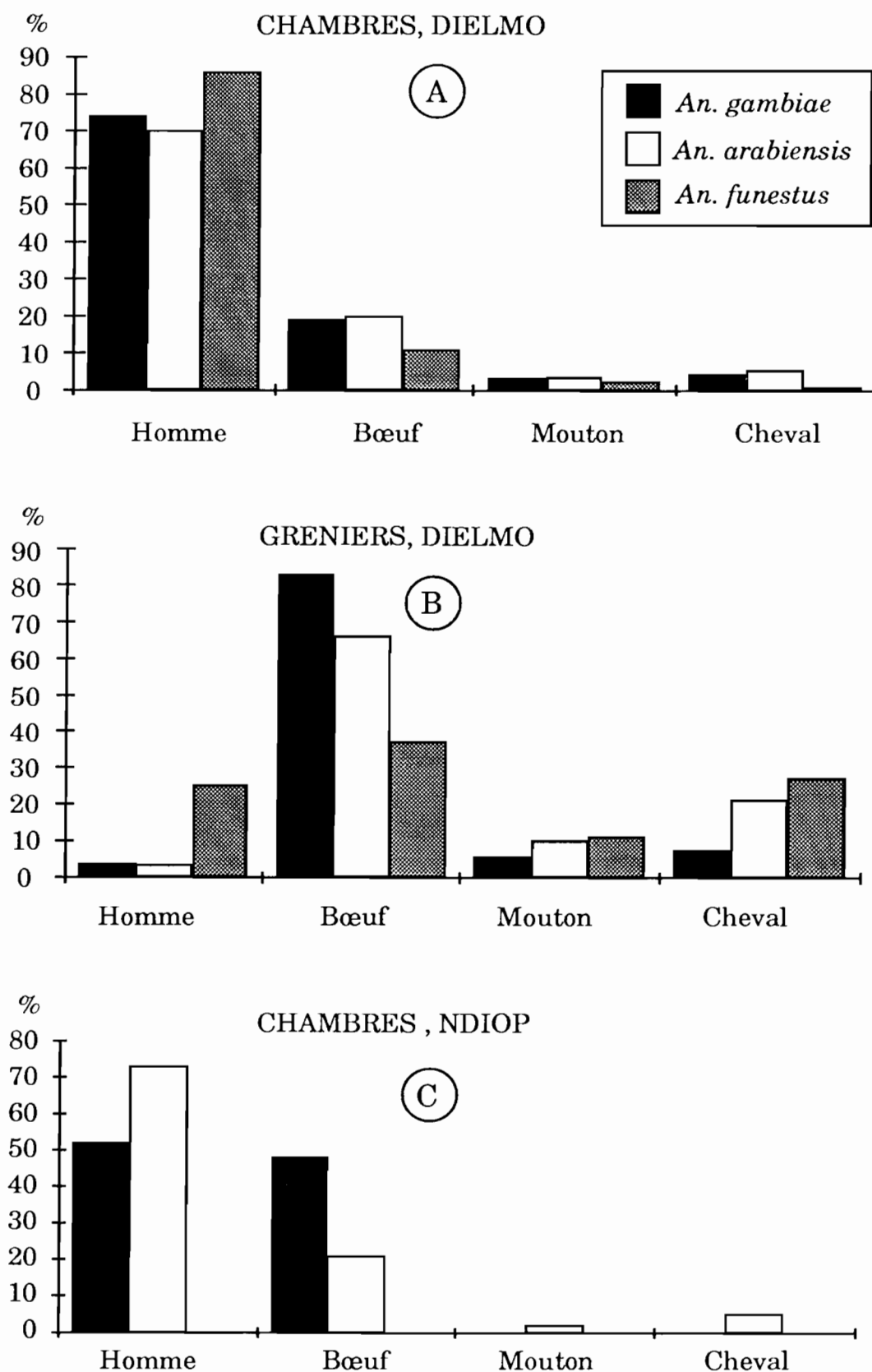
Entre avril 1992 et mars 1993 à Dielmo, 149 repas ont été analysés pour *An. gambiae* (95 provenant des chambres, 54 des greniers), 142 pour *An. arabiensis* (113 provenant des chambres, 29 des greniers) et 626 pour *An. funestus* (553 provenant des chambres, 73 des greniers). Dans les chambres, le taux d'anthropophilie (TA) moyen a été de 73,68% pour *An. gambiae*, de 71,40% pour *An. arabiensis* et de 86,08% pour *An. funestus*. Après l'homme, *An. funestus*, *An. arabiensis* et *An. gambiae* capturés dans les chambres ont piqué préférentiellement le bœuf. Le mouton ou chèvre et le cheval ont été très peu piqués par les femelles qui se sont reposées dans les chambres (Figure 15A). Dans les greniers, le TA moyen a été de 3,70 pour *An. gambiae*, 3,45 pour *An. arabiensis* et 28,77 pour *An. funestus*. Le bœuf a été le plus piqué au niveau des greniers. Le mouton ou chèvre et le cheval ont été plus piqués dans les greniers que dans les chambres (Figure 15B). Le TA dans les chambres a été très supérieur à celui trouvé dans les greniers. Le TA calculé dans les chambres et greniers les confondus a été de 48,32% pour *An. gambiae*, 31,76% pour *An. arabiensis* et 79,39% pour *An. funestus*. La déviation animale a été assez marquée pour *An. gambiae* et *An. arabiensis* à Dielmo. Elle est plus élevée pour *An. arabiensis* que pour *An. gambiae* mais de façon non significative ($\chi^2 = 2,45$ pour 1 ddl, $p > 0,1$). Ces espèces ont été plus zoophiles que *An. funestus*.

A Ndiop entre avril 1993 et mars 1994, la PCR a permis d'identifier 23 *An. gambiae* et 57 *An. arabiensis* ayant pris un repas de sang. Chez *An. arabiensis*, 41 ont été pris sur homme et 17 sur bétail (13 sur bœuf, 3 sur cheval et 1 sur mouton ou chèvre) soit un TA de 70,6%. Un *An. arabiensis* s'est gorgé homme et sur bœuf. Chez *An. gambiae*, 12 repas ont été pris sur homme et 20 sur bœuf soit un TA de 52,2% (figure 15C).

II.4.7. Indices sporozoïtiques (IS)

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, 46 femelles ont montré des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires. Trente huit appartenaient à l'espèce *An. funestus* et 8 au complexe *An. gambiae*. La PCR a permis de calculer l'IS pour chaque espèce du complexe *An. gambiae*. Certains moustiques porteurs de sporozoïtes n'ont pas pu être déterminés par PCR.

Figure 15 : Préférences trophiques des *Anopheles* de faunes résiduelles, à DIELMO (avril 1992 à mars 1993) et à NDIOP (avril 1993 à mars 1994)



On a eu recours à la classique règle de 3 pour les rattacher à *An. gambiae* ou *An. arabiensis* : ce qui explique les valeurs décimales des tableaux 12 et 13. Les IS moyens calculés pour chaque espèce du complexe *An. gambiae* ont été de 2,7%, 0,83%, 2,03% respectivement pour *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus*. En fonction des trimestres des variations d'IS ont été observées (Tableau 12). L'IS a été plus élevé en juillet-septembre pour *An. gambiae* et en octobre-décembre pour *An. arabiensis*. Les variations trimestrielles d'IS n'ont pas été significatives pour le reste de l'année. Pour *An. funestus*, l'IS a très peu varié (Tableau 12).

Entre avril 1993 et mars 1994 à Dielmo, pour 20 femelles porteuses de sporozoïtes 8 appartenaient à l'espèce *An. funestus* et 12 au complexe *An. gambiae*. Les IS moyens calculés ont été 0,51%, 0,30%, 2,14% respectivement pour *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus*. Les variations trimestrielles d'IS n'ont pas été significatives.

A Ndiop, d'avril 1993 et mars 1994, 7 femelles de vecteurs ont montré des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires parmi les 451 disséquées. Ces femelles appartenaient toutes au complexe *An. gambiae*. Les IS moyens ont été de 0,60% pour *An. gambiae* et de 2,07% pour *An. arabiensis*. Pour chacune de ces 2 espèces, les variations trimestrielles de l'IS n'ont pas été significatives (Tableau 12).

II.4.8. Indice circumsporozoïtique (ICSP)

Toutes les femelles ont été testées par ELISA (Beier, 1988a) pour rechercher la présence de l'antigène circumsporozoïtique.

Entre avril 1992 et mars 1993 à Dielmo, 143 femelles dont 105 *An. funestus* et 38 du complexe *An. gambiae* ont porté l'antigène circumsporozoïtique. Les ICSP ont été calculés pour chaque espèce. L'ICSP moyen annuel pour *An. gambiae* a été de 2,86%. Il a été de 0,82% pour *An. arabiensis* et de 3,01% pour *An. funestus* (Tableau 13). Chez 19 *An. gambiae* infestés et identifiés, 17 ont porté *Plasmodium falciparum* et 2 *Plasmodium malariae*. Sur 8 *An. arabiensis* infestés et identifiés, 7 ont porté *Plasmodium falciparum* et 1 a été infesté *Plasmodium ovale* et par *Plasmodium malariae*. *An. funestus* a été infesté par *Plasmodium falciparum* dans 96,97% des cas, *Plasmodium malariae* dans 2,02% des cas et *Plasmodium ovale* dans 1,01% des cas.

Entre avril 1993 et mars 1994 à Dielmo, 9 *An. funestus* et 27 anophèles du complexe *An. gambiae* ont porté l'antigène circumsporozoïtique. Sur les 24 identifiés par PCR parmi les 27 infestés, 3 ont été des *An. gambiae* et

LIEU	ESPECE	<i>An. gambiae</i>			<i>An. arabiensis</i>			<i>An. funestus</i>		
	PERIODE	Ps	Ng	IS (%)	Ps	Ng	IS (%)	Ps	Ng	IS (%)
DIELMO	Avr 92- Juin	0	32	0,00	0	161	0,00	10	380	2,56
	Juil - Sept	4	78	4,88	2	106	1,85	14	805	1,71
	Oct - Dec	1	65	1,52	1	42	2,33	5	220	2,22
	Jan-Mars 93	0	5	0,00	0	48	0,00	9	427	2,06
	Total 92-93	5	180	2,70	3	357	0,83	38	1832	2,03
	Avr 92- Juin	0	2	0,00	0	73	0,00	2	57	3,39
	Juil - Sept	0	135	0,00	2	2870	0,07	1	32	3,03
	Oct - Dec	1,29	113	1,13	7,71	232	3,22	2	101	1,94
	Jan-Mars 93	0	1	0,00	0	72	0,00	3	175	1,69
	Total 93-94	1,29	251	0,51	9,71	3247	0,30	8	365	2,14
	Avr 92- Juin	0	0	-	0	0	-	-	-	-
NDIOP	Juil - Sept	1	155	0,64	4	242	1,63	-	-	-
	Oct - Dec	0	12	0,00	2	42	4,55	-	-	-
	Jan-Mars 93	0	0	-	0	0	-	-	-	-
	Total 93-94	1	167	0,60	6	284	2,07	-	-	-

Ps = nombre théorique de femelles positives en dissection

Ng = nombre de femelles négatives en dissection

IS = indice sporozoïtique

Tableau 12 : Variations saisonnières de l'indice sporozoïtique à Dielmo
(avril 1992 à mars 1994) et à Ndiop (avril 1993 à mars 1994).

LIEU	ESPECES	<i>An. gambiae</i>			<i>An. arabiensis</i>			<i>An. funestus</i>		
	PERIODE	Pse	Nge	ICSP (%)	Pse	Nge	ICSP (%)	Pse	Nge	ICSP (%)
DIELMO	Avr 92- Juin	1	79	1,27	1	338	0,30	19	695	2,73
	Juil - Sept	17,4	661	2,63	3,6	649	0,55	36	1478	2,44
	Oct - Dec	8,75	227	3,85	3,25	121	2,69	19	349	5,44
	Jan-Mars 93	1	18	5,56	2	90	2,22	31	965	3,21
	Année 92-93	28,15	985	2,86	9,85	1198	0,82	105	3487	3,01
	Avr 92- Juin	0	2	0,00	0	75	0,00	2	58	3,45
	Juil - Sept	1,1	391	0,28	11,9	2658	0,45	1	33	3,03
	Oct - Dec	2,6	114	2,28	10,4	238	4,37	3	101	2,97
	Jan-Mars 93	0	2	0,00	1	77	1,30	3	173	1,73
	Année 93-94	3,7	509	0,73	23,3	3048	0,76	9	365	2,47
NDIOP	Avr 92- Juin	0	0	-	0	2	0,00	-	-	-
	Juil - Sept	13,4	445	3,02	24,6	668	3,68	0	7	0,00
	Oct - Dec	0	25	0,00	15	99	15,15	0	1	0,00
	Jan-Mars 93	0	0	-	0	0	-	-	-	-
	Année 93-94	13,4	470	2,77	39,6	769	4,89	0	8	0,00

Pse = nombre théorique de femelles positives en ELISA

Nge = nombre de femelles négatives en ELISA

ICSP = indice circumsporozoïtique

Tableau 13 : Variations saisonnières de l'indice circumsporozoïtique à Dielmo
(avril 1992 à mars 1994) et à Ndiop (avril 1993 à mars 1994).

21 des *An. arabiensis*. Les ICSP moyens trouvés ont été 0,7%, 0,8%, 2,5% respectivement pour *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus* (Tableau 13). *Plasmodium falciparum* a infesté 3 *An. gambiae*, 7 *An. funestus* et 18 *An. arabiensis*. *Plasmodium malariae* a infesté 3 *An. arabiensis* et 2 *An. funestus*. *Plasmodium ovale* n'a pas été mis en évidence.

Les ICSP moyens d'*An. arabiensis* et d'*An. funestus* n'ont pas varié significativement pour d'une année à l'autre contrairement à ce qui a été observé pour *An. gambiae* ($\chi^2 = 7,05$ pour 1 ddl, $p < 0,01$).

Entre avril 1993 et mars 1994 à Ndiop, les captures mensuelles et hebdomadaires ont été utilisées pour le calcul des ICSP moyens. *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont été les seuls vecteurs représentatifs. Le nombre de femelles positives après le test ELISA a été de 53. L'ICSP moyen a été de 2,77% et 4,89% respectivement pour *An. gambiae* et pour *An. arabiensis*. Les ICSP trimestriels moyens ont été sensiblement identiques pour les 2 espèces (Tableau 13). Parmi les 31 *An. arabiensis* infestés et identifiés par PCR, 26 ont été infestés par *Plasmodium falciparum*, 4 par *Plasmodium malariae* et 1 par *Plasmodium ovale*. Pour les 8 *An. gambiae* infestés et identifiés par PCR, 5 ont été infestés par *Plasmodium falciparum* (avec 1 infestation double *Plasmodium falciparum*-*Plasmodium ovale*), 3 par *Plasmodium malariae*.

II.4.9. Taux d'inoculation

II.4.9.1. Taux d'inoculation entomologique

Le taux d'inoculation (he) est le nombre de piqûres infestantes que reçoit un individu par unité de temps. Il est égal au produit du taux d'agressivité et de l'IS. Il est calculé dans notre étude par trimestre.

A Dielmo, un individu a reçu en moyenne 184 piqûres infestantes (calculé à partir de l'IS) d'avril 1992 à mars 1993 et 46 d'avril 1993 à mars 1994. A Ndiop le nombre moyen annuel de piqûres infestantes reçues par homme a été de 17 (Tableau 14).

A Dielmo, d'avril 1992 à mars 1993, le nombre de piqûre infestantes a été de 100 pour *An. funestus*, de 59 pour *An. gambiae* et de 25 pour *An. arabiensis*. Entre avril 1993 et mars 1994, les valeurs correspondantes ont été de 20, 3, et 23 respectivement. Le he entomologique a également varié selon les saisons avec des maxima entre juillet et septembre pour *An. funestus* (55,3), *An. gambiae* (20,7) et *An. arabiensis*. (39,4) d'avril 1992 à

LIEU	ESPECES	<i>An. gambiae</i>		<i>An. arabiensis</i>		<i>An. funestus</i>		Vecteurs	
	PERIODE	NPI	NPIf	NPI	NPIf	NPI	NPIf	NPI	NPIf
DIELMO	Avr 92-Juin	0,00	1,36	0,00	1,56	25,15	26,53	25,15	29,45
	Juil-Sept	55,34	30,62	20,74	5,61	39,42	55,32	115,5	91,55
	Oct-Dec	4,31	10,77	4,4	5,1	12,6	28,94	21,31	44,81
	Jan-Mars 93	0,00	1,03	0,00	3,09	22,87	35,52	22,87	39,64
	Total annuel	59,65	43,78	25,14	15,36	100,04	146,31	184,83	205,45
	Avr 93-Juin	0,00	0,00	0,00	0,00	4,92	5	4,92	5
	Juil-Sept	0,00	2,74	4,65	29,9	2,5	2,5	7,15	35,14
	Oct - Dec	3,23	6,51	18,66	25,32	4,9	7,5	26,79	39,33
	Jan-Mars 94	0	0	0,00	2,49	7,31	7,48	7,31	9,97
	Total annuel	3,23	9,25	23,31	57,71	19,63	22,48	46,17	89,44
NDIOP	Avr 93-Juin	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	0	0
	Juil-Sept	2,49	11,76	9,87	22,29	-	-	12,36	32,26
	Oct-Dec	0,00	0,00	4,8	15,98	-	-	4,8	15,98
	Jan-Mars 94	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	0	0
	Total annuel	2,49	11,76	14,67	38,27	-	-	17,16	48,24

NPI = nombre de piqûres infectantes à partir du taux d'inoculation entomologique

NPIf = nombre de piqûres infectantes à partir du taux d'inoculation immunologique

Tableau 14 : Variations saisonnières des taux d'inoculation entomologique et immunologique à Dielmo (avril 1992 à mars 1994) et à Ndiop (avril 1993 à mars 1994).

mars 1993. Entre avril 1993 et mars 1994, les maxima se situaient entre octobre et décembre pour *An. gambiae*. (3,2) et *An. arabiensis*. (18) et entre janvier et février pour *An. funestus* (7,3). A Ndiop (d'avril 1993 à mars 1994) le he entomologique a été de 2 pour *An. gambiae* et de 15 pour *An. arabiensis*. Le maximum d'inoculation se situait entre Juillet et septembre pour *An. gambiae* (2,5) et *An. arabiensis* (9,8).

An. gambiae et *An. arabiensis* ont tous deux assuré la transmission à la même période à Dielmo et à Ndiop.

II.4.9.2. Taux d'inoculation immunologique

D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, le nombre annuel de piqûres infestantes calculé à partir l'ICSP pour un homme a été de 205 dont 44 d'*An. gambiae*, 15 d'*An. arabiensis* et 146 d'*An. funestus*. D'avril 1993 à mars 1994 à Dielmo, un individu a reçu 89 piqûres infestantes pour l'année avec 9 d'*An. gambiae*, 58 d'*An. arabiensis* et 22 *An. funestus*. Le maximum de transmission a eu lieu entre juillet et septembre pour les 3 espèces en 1992-1993. D'avril 1993 à juin 1994, c'est *An. arabiensis* qui a principalement assuré la transmission avec un maximum entre juillet et septembre (Tableau 14).

A Ndiop en 1993-1994, 50 piqûres infestantes ont été reçues par homme dont 12 d'*An. gambiae* et 38 d'*An. arabiensis* pour la période d'avril 1993 à juin 1994.

II.5. Discussion

II.5.1. Les populations de vectorielles

Les données présentées dans cette étude ont montré qu'à Dielmo coexistent 3 espèces du complexe *An. gambiae* : *An. arabiensis*, *An. gambiae*, et *An. melas*. La présence d'*An. melas* est liée à la proximité de la côte et à la présence de gîtes saumâtres. La coexistence des trois espèces du complexe dans les biotopes proches de la côte a déjà été signalée au Sénégal dans les Niayes (Vercruysse et Jancloes, 1981 ; Sy, 1994) à Sokone, à Ndofane (Bryan *et al.*, 1982) et à Saint Louis (Petrarca *et al.*, 1987) et au Ghana (Appawu *et al.*, 1994). Les effectifs d'*An. melas* sont restés très faibles à Dielmo, contrairement aux observations de Petrarca *et al.* (1987) à Saint Louis. *An. arabiensis*, et *An. gambiae* ont été les seuls vecteurs appartenant au complexe *An. gambiae* à Dielmo. A côté de ceux-ci nous

avons trouvé un autre vecteur, *An. funestus*. L'association espèces du complexe *An. gambiae* et *An. funestus* est connue à Wassadou au Sénégal (Sy, 1994), dans la vallée Kou au Burkina Faso (Robert *et al.*, 1991), à Segera en Tanzanie (White *et al.*, 1972). *An. funestus* a été l'espèce dominante durant l'enquête d'avril 1992 à mars 1993 grâce à deux pullulations survenues au cours de l'année, résultat qui corrobore ceux de Hamon *et al.*, (1955). Cette dominance s'est manifestée toute l'année sauf en septembre où *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont été plus abondants. Au sein du complexe *An. gambiae* les proportions de chaque espèce ont varié au cours de l'année à Dielmo selon le lieu et la méthode de capture (Figure 16). Les vecteurs ont été récoltés pendant toute la durée de l'étude à Dielmo lors des captures sur homme ou des collectes de faune matinale résiduelle.

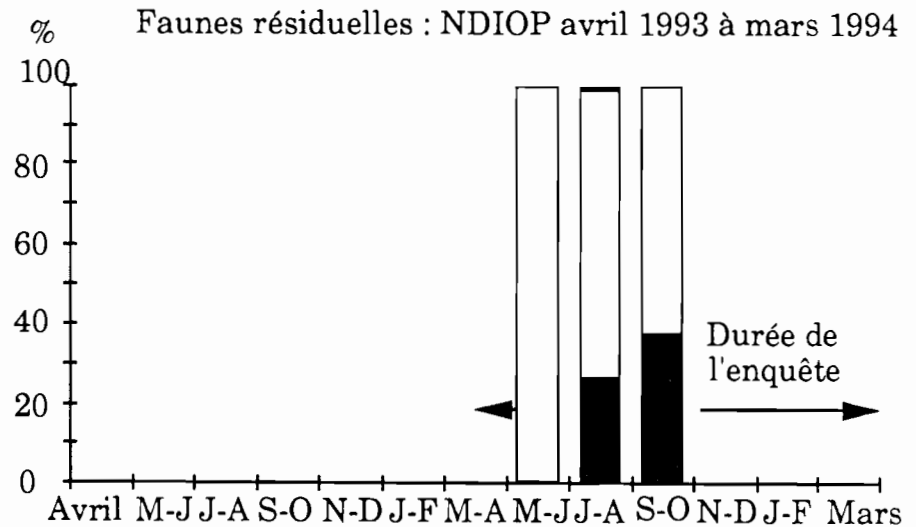
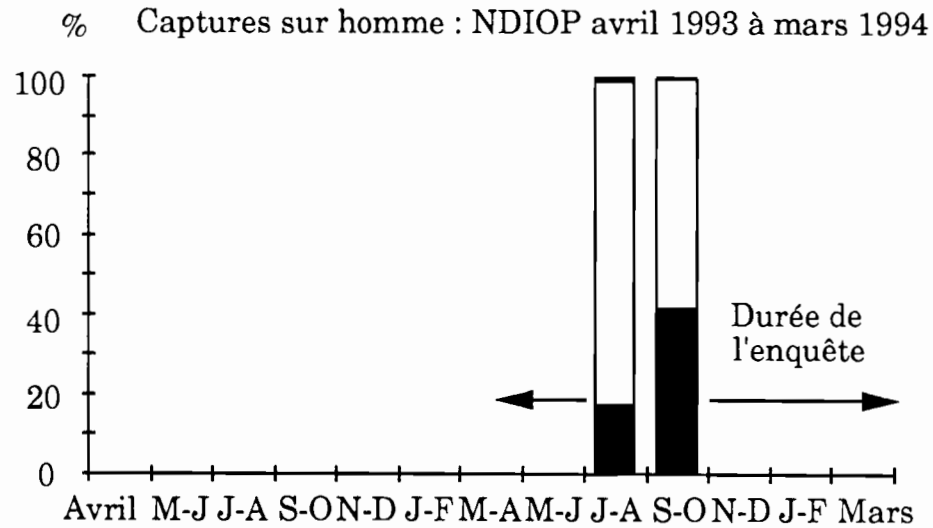
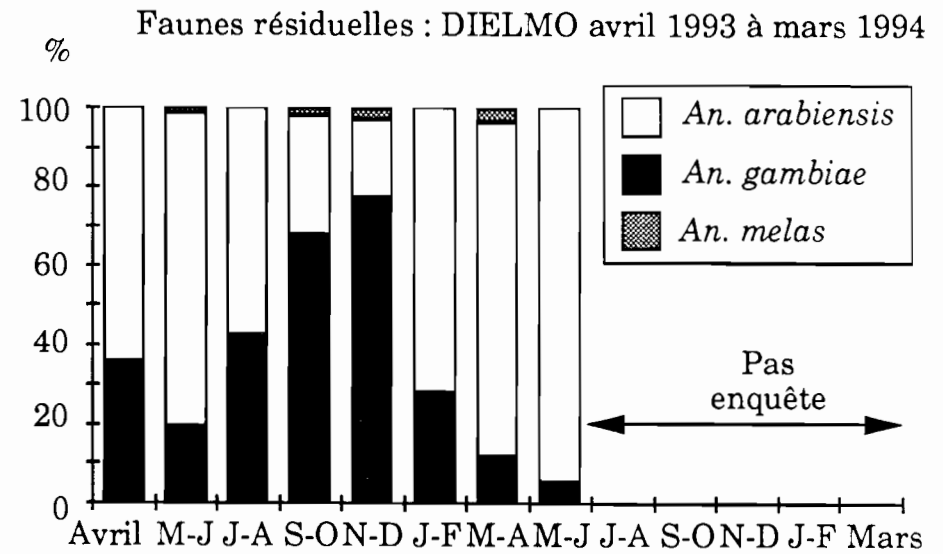
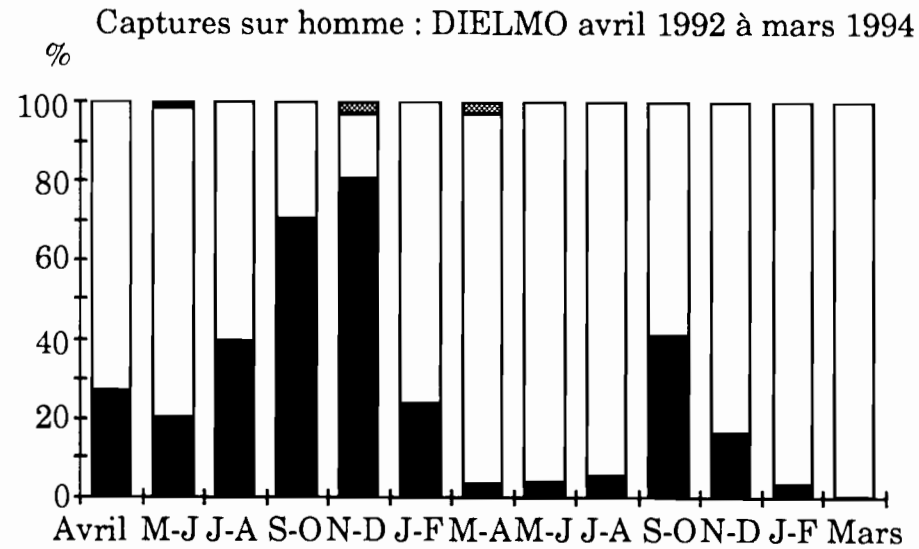
Entre avril 1993 et mars 1994, *An. arabiensis* a dominé. *An. funestus* a été moins représenté au niveau des vecteurs. Cependant, il a dominé pendant toute la saison sèche. Nous avons assisté à une situation contraire à celle de 1992-1993 avec une succession, anophèles du complexe *An. gambiae* en saison des pluies et *An. funestus* en saison sèche comme l'ont déjà signalé Konaté (1991) et Diagne (1992). Ces deux années d'étude montrent une bonne représentativité d'*An. funestus* à côté de *An. gambiae*, et *An. arabiensis* à Dielmo. Ce résultat est similaire à celui trouvé par White *et al.* (1972) à Segera (Tanzanie) et par Robert *et al.*, (1988) au Sud-Ouest du Burkina Faso. Ce résultat diffère de ceux de Sy (1994) à Wassadou et à Thiaye où *An. funestus* est faiblement représenté.

A Ndiop (avril 1993 à mars 1994), les vecteurs ont été les mêmes que ceux décrits à Dielmo. *An. arabiensis* a dominé, mais les effectifs d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* se sont équilibrés en septembre. Les variations des proportions au sein du complexe sont résumées dans la figure 16. *An. funestus* et *An. melas* ont été présents, mais en nombre très faible. Contrairement à Dielmo, les premiers anophèles ont été capturés en juin à Ndiop, période où l'humidité relative est assez élevée. Après les premières pluies, les effectifs ont vite augmenté. Les récoltes ont été infructueuses en saison sèche à partir de novembre. Cette différence notée par rapport à Dielmo est liée à la nature des gîtes dans les deux sites.

II.5.2. Densités agressives

L'étude du cycle d'agressivité a montré que les vecteurs ont été beaucoup plus agressifs dans la seconde moitié de la nuit. L'activité a

Figure 16 : Proportions relatives des trois espèces du complexe *An. gambiae* en fonction de la méthode et de la période de capture



débuté généralement après le crépuscule, sauf pour *An. gambiae* à Ndiop (avril 1993 à mars 1994) où il a été actif à partir de 21 h. Il faut noter que les effectifs de *An. gambiae* y ont été faibles. Généralement, les cycles d'agressivité ont présenté un pic situé dans la seconde moitié de la nuit. *An. funestus* entre avril 1993 et mars 1994 a eu un pic situé dans la première moitié de la nuit. *An. gambiae* à Dielmo (avril 1993 à mars 1994) et *An. arabiensis* ont eu des cycles d'agressivité avec deux pics situés l'un dans la première et l'autre dans la seconde moitié de la nuit.

Les vecteurs ont été agressifs à l'intérieur et à l'extérieur. *An. arabiensis* a été plus exophage qu'endophage entre avril 1992 et mars 1993. Il a été plus endophage en 1993-1994 comme *An. gambiae* et *An. funestus* qui l'ont été pour les deux années d'étude.

A Dielmo et à Ndiop, les variations de densité des espèces vectrices ont été liées à la saison pluvieuse. Les densités les plus élevées ont été atteintes très tôt en juillet (Dielmo) ou en août (Ndiop) pour *An. arabiensis*. Elles ont été atteintes un peu plus tardivement pour *An. gambiae* (septembre). La saison humide a été favorable à *An. arabiensis* et à *An. gambiae*. Ce dernier a exigé des conditions beaucoup plus humides (White, 1974 ; Rishikesh *et al.*, 1985) qui lui ont permis d'atteindre des densités assez élevées. En saison sèche à Dielmo, *An. funestus* a dominé, mais les densités des vecteurs ont été beaucoup plus faibles qu'en saison des pluies. Ceci est dû à la présence de la rivière qui abrite des gîtes couverts de végétation favorables au développement des stades préimaginaux de cette espèce. Dans la période froide de la saison sèche, nous avons assisté à une légère recrudescence de vecteurs avec une nette dominance de *An. funestus*. Cette situation n'a pas été observée à Thiaye (Sy, 1994) malgré la présence de gîtes en cette période de l'année.

II.5.3. Le taux de parturité

Les taux de parturité ont été élevés pour *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus*. Aucune variation trimestrielle significative n'a été observée à Dielmo et à Ndiop. A Dielmo les taux de parturité moyen de *An. gambiae* ont été plus élevés que ceux de *An. arabiensis* entre avril 1992 et mars 1994. Les taux de parturité ont varié en sens inverse avec les densités moyennes observées respectivement pour ces espèces ; ce qui confirme les corrélations négatives faites entre les densités et les taux de parturité chez les moustiques en zone sahélienne. A Ndiop, les taux de parturité moyen d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* ont été plus élevés qu'à Dielmo entre

avril 1993 et mars 1994. Cette situation pourrait s'expliquer par l'éloignement de Ndiop par rapport à son gîte principal, qui conduit à des densités plus faibles puisque les jeunes imagos se dispersent (Manga *et al.*, 1993) et n'arrivent pas tous dans le village. Il en résulte une faible présence de nullipares au sein des effectifs et un I.

II.5.4. Les préférences trophiques

Dans les chambres, *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont présenté des comportements trophiques identiques. Ces 2 espèces y ont présenté des taux d'anthropophilie élevés. Ces deux espèces se sont gorgées essentiellement sur homme, puis sur bœuf et très peu sur mouton et cheval. Il en est de même pour *An. funestus* mais ce dernier a été plus anthropophile que les anophèles du complexe *An. gambiae*.

Dans les greniers, l'hôte préférentiel d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* a été le bœuf. Les proportions repas pris sur moton-chèvre ou sur cheval ont été plus importantes que celles prises sur homme.

Entre avril 1992 et mars 1993 à Dielmo, les proportions de repas pris sur homme ont été nettement plus élevées dans les chambres que dans les greniers. Ceci montre d'une part qu'il y a biais lorsque le taux d'anthropophilie est calculé seulement à partir des femelles endophiles capturées dans les chambres, et d'autre part que *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. funestus* ont tous eu tendance à se reposer préférentiellement dans les abris intérieurs (chambres ou greniers) après leur repas de sang. Les faibles proportions de repas pris sur homme dans les greniers s'expliqueraient par une arrivée d'une fraction des femelles exophages, l'autre se retrouvant dans les chambres. Le caractère exophile déjà signalé par White (1974), Gillies & Coetzee (1987), Petrarca *et al.* (1991), chez *An. arabiensis* et chez *An. gambiae* (Coosemans *et al.*, 1989) au Burundi n'a pas pu être mis en évidence à Dielmo à partir de l'étude des repas de sang puisque les abris extérieurs n'ont pas été explorés. Cependant, les densités de vecteurs comparées aux densités de repos (toutes observées dans les chambres) laissent supposer que ce caractère exophile est présent chez *An. arabiensis* et *An. gambiae*. Pour *An. arabiensis* l'indice d'anthropophilie calculé à partir des femelles capturées dans les chambres a été inférieur à celui trouvé par Vercruysse et Jancloes (1981) à Pikine où le bétail est peu abondant.

A Ndiop le taux d'anthropophilie a été étudié à partir des captures dans les chambres. Il a été plus élevé chez *An. arabiensis* que chez *An.*

gambiae . Aucun *An. gambiae* ne s'est gorgé sur mouton ou sur cheval à Ndiop. Il est important de noter que l'étude des repas n'a pas été faite en septembre, période où la densité des vecteurs a été plus élevée.

La déviation trophique notée à Dielmo et à Ndiop est liée à la présence d'animaux dans les villages étudiés. Cette déviation a été signalée par Bryan *et al.* (1987) en Gambie et par Petrarca *et al.* (1991) à l'Ouest du Kenya.

II.5.5. Les indices sporozoïtiques et circumsporozoïtiques

Aucune femelle d'*An. melas* n'a été observée positive en dissection et en ELISA. En plus, son exophilie, sa zoophilie (Bryan *et al.*, 1987) et ses faibles densités ne font pas d'elle un vecteur de paludisme à Dielmo et à Ndiop.

Les seuls vecteurs à Dielmo ont été *An. funestus*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* . Ces 3 espèces ont été les principaux vecteurs à l'Ouest du Kenya (Taylor *et al.*, 1990). Ces espèces ont porté des sporozoïtes dans les glandes salivaires et/ou l'antigène circumsporozoïtique (CSP) dans leur tête et thorax. Contrairement à *An. funestus* ayant un indice supérieur à 0 pendant tous les trimestres étudiés, aucune infestation n'a été décelée chez *An. gambiae* et *An. arabiensis* entre avril et juin. Cette situation s'est prolongée jusqu'en septembre pour *An. gambiae* en 1993-1994. Les femelles positives en dissection sont apparues avec l'augmentation des densités en saison des pluies pour ces deux espèces du complexe *An. gambiae* et aucune femelle positive en dissection n'a été observée après la saison des pluies. Une très faible proportion de femelles d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* ont été positives au test ELISA durant la période sèche entre avril 1992 et mars 1993, résultat qui n'a pas été observé entre avril 1993 et mars 1994. Ce qui montre la rareté des infestations en saison sèche pour ces deux espèces comme l'a déjà signalé Sy (1994) à Wassadou et à Thiaye. Mais contrairement aux observations de Sy (1994) à Wassadou, les infestations se retrouvent aussi bien chez *An. gambiae* que chez *An. arabiensis*. Cette différence est certainement liée à la faible densité de *An. arabiensis* notée à Wassadou. Les variations d'indices notées chez *An. gambiae* et *An. arabiensis* en rapport avec les taux de parturité, se sont faites dans le même sens au cours de la période avril 1992 à mars 1994 à Dielmo. Le fait que les IS et le ICSP aient été plus élevés entre avril 1992 et mars 1993 s'expliquerait par une présence plus grande de porteurs de gamétocytes au sein de la population de Dielmo à cette période. Une

augmentation de ces indices a été observée en saison des pluies chez *An. gambiae* et *An. arabiensis*, mais ils ont été plus élevés chez *An. gambiae* dont les effectifs ont augmenté à cette période par rapport à ceux de *An. arabiensis*. Cette observation complète l'hypothèse de Konaté (1991) selon laquelle les variations seraient dues à un changement de la composition spécifique au sein du complexe *An. gambiae*.

A Ndiop, les vecteurs prouvés ont été *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Les femelles positives en dissection et en ELISA ont été retrouvées chez *An. gambiae* et *An. arabiensis*. *An. arabiensis* a été le principal vecteur à Ndiop avec des indices plus élevés. Ceci a été probablement dû à l'apparition tardive de *An. gambiae*, à sa disparition rapide en début de saison sèche et à la forte déviation animale observée pour cette espèce à Ndiop.

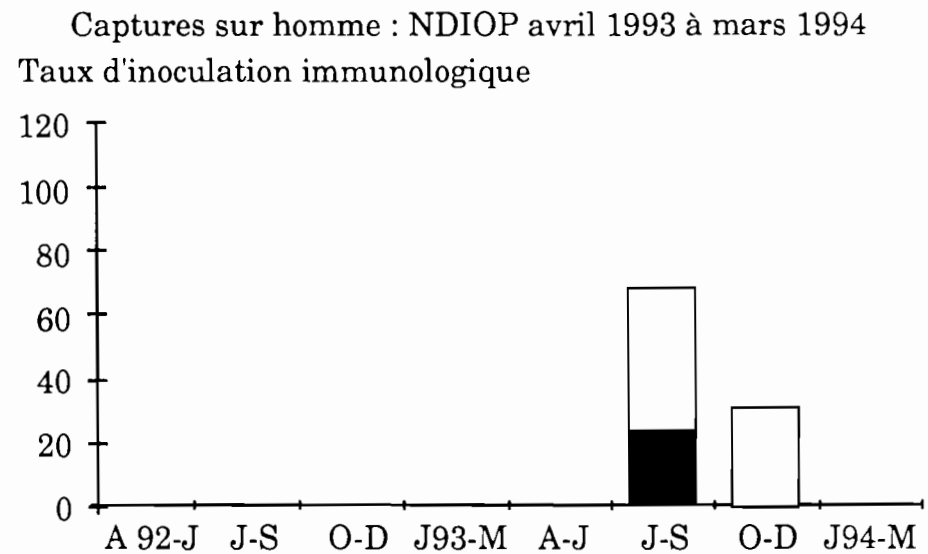
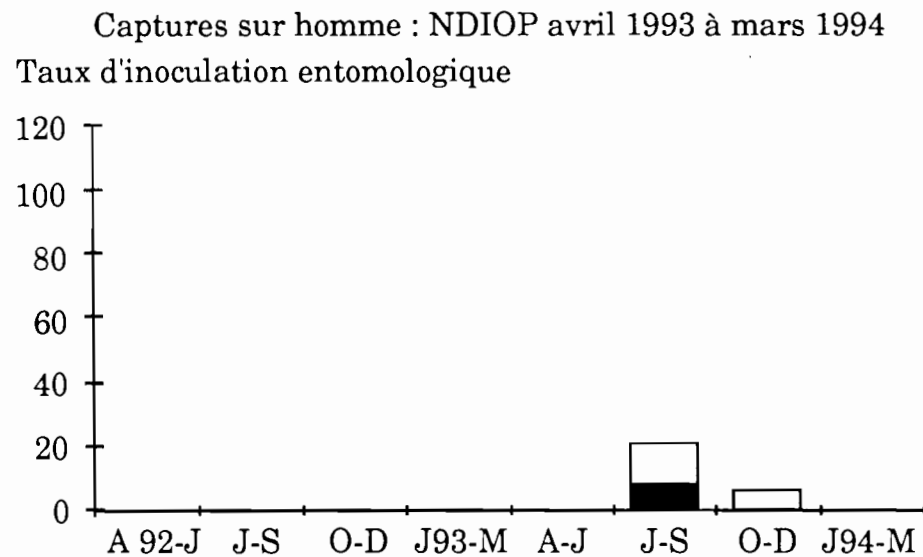
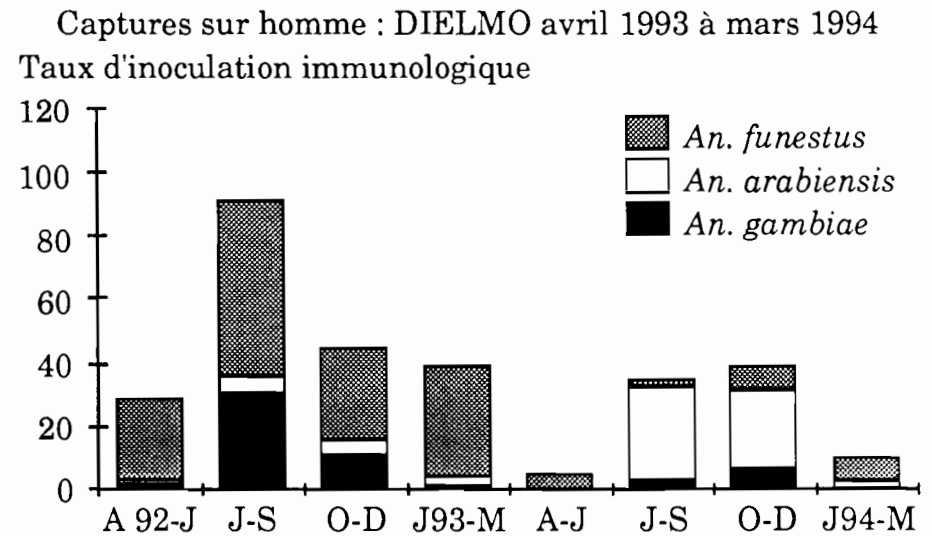
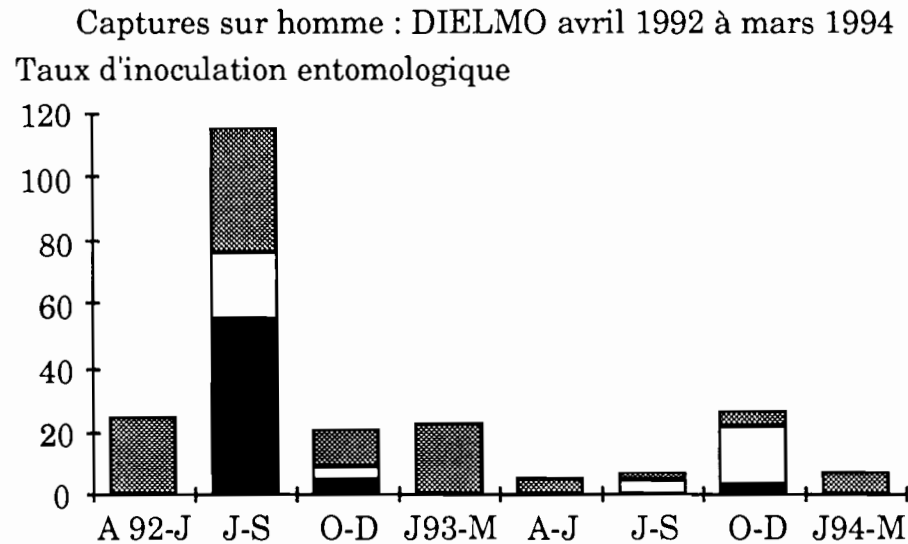
Pour *An. arabiensis*, l'indice moyen trouvé entre avril 1992 et mars 1993 à Dielmo a été plus élevé que celui trouvé par Vercruysse et Jancloes (0,55) en 1981 à Pikine et celui d'avril 1993 à mars 1994 à Dielmo. Ces derniers ont été tous plus faibles que celui trouvé à Ndiop à cause des taux de parturité qui y sont plus élevés. A Dielmo et à Ndiop, les indices trouvés en 1992-1993 sont sensiblement identiques.

Les ICSP ont généralement été plus élevés que les IS. cette différence proviendrait soit d'une erreur de lecture des lames au microscope, soit par une identification des jeunes sporozoïtes n'ayant pas encore atteint les glandes salivaires.

II.5.6. La transmission

La transmission a été continue lors des deux années d'étude à Dielmo. Cette continuité a déjà été signalée par Konaté (1991), Diagne 1992, Sokhna (1994) et Faye (1995). *An. funestus* a été le vecteur principal en saison sèche. En saison des pluies, la transmission a été surtout assurée par *An. gambiae*, et *An. arabiensis*. La transmission a été plus importante en saison pluvieuse (Figure 17). Ceci est en rapport avec la pullulation de *An. gambiae* et *An. arabiensis*. En 1992-1993 la forte pullulation de *An. funestus* en saison des pluies a également augmenté la transmission en cette période. La forte transmission en saison des pluies a déjà été signalée par Konaté (1991), Diagne (1992) et Sokhna (1994) à Dielmo. Le caractère continu de la transmission à Dielmo n'est pas observé par Vercruysse et Jancloes (1981) dans les Niayes et Sy (1994) à Thiaye où la transmission

Figure 17 : Niveaux de transmission comparés entre *An. gambiae* ,
An. arabiensis et *An. funestus* en fonction des trimestres



présente un caractère saisonnier. Cette particularité de Dielmo est liée à la présence d'*An. funestus*, d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* en saison sèche. *An. funestus* a été le principal vecteur en 1992-1993 en assurant 54,2% de la transmission contre 32,3% pour *An. gambiae* et 13,6% pour *An. arabiensis*. En 1993-1994, le principal vecteur a été *An. arabiensis* avec 50,5% de la transmission contre 42,5% pour *An. funestus* et 7,0% pour *An. gambiae*. Pour *An. arabiensis* le niveau de transmission a augmenté en 1993-1994. Pour *An. gambiae* et *An. funestus* le niveau de transmission a diminué entre 1992-1993 et 1993-1994. En 1992-1993, le test ELISA a montré que certaines femelles d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* ont été porteuses de l'antigène circumsporozoïtique en saison sèche. Ces deux espèces ont probablement continué à transmettre en cette saison. Le test ELISA a également montré une augmentation de la transmission due à *An. arabiensis* en 1993-1994 contrairement à *An. gambiae* et *An. funestus* dont les niveaux de transmission ont baissé.

A Ndiop, 85,5% de la transmission a été assurée par *An. arabiensis* contre 14,5% pour *An. gambiae*. Cette transmission a eu lieu en saison des pluies et en début de saison sèche. Elle est saisonnière et moins importante qu'à Dielmo. Ce qui pourrait être dû à l'absence de *An. funestus* et au fait que *An. arabiensis* a été le principal vecteur cette année et a présenté une densité plus faible à Ndiop par rapport à Dielmo.

An. melas à Dielmo et à Ndiop n'a pas été trouvé positif en dissection et en ELISA. Il n'a pas joué de rôle dans la transmission. Il en est de même pour *An. funestus* à Ndiop.

III. ETUDE DES FACTEURS D'ATTRACTIVITE DES MOUSTIQUES - MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE

III.1. Etat des connaissances

On sait que chaque individu n'est pas piqué de façon équivalente par les anophèles vecteurs de *Plasmodium* (Burkot, 1988). Les enfants semblent moins piqués que les adultes (Carnevale *et al.*, 1978 ; Port & Boreham, 1980). Or le développement de l'immunité est, entre autre, lié au nombre de piqûres infestantes que reçoit un individu. De plus, en zone d'holoendémicité, on ne sait toujours pas précisément quelles sont les variations des paramètres cliniques, parasitologiques et immunologiques qui suivent une piqûre infestante, selon les classes d'âge. Chez les enfants en particulier, on ne connaît pas la proportion de piqûres infestantes qui est suivie d'effet clinique. Dans les études classiques de mesure de la transmission, le nombre moyen de piqûres infestantes par homme par période de temps (nuit, mois ou année) est toujours calculé à partir de captures au niveau individuel, généralement des hommes, volontaires. Seule la détermination du nombre de piqûres reçues peut permettre de contourner ce biais important. Les premières études sur ce sujet avaient utilisé le polymorphisme très limité des groupes sanguins (Bryan & Smalley, 1978), mais 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, quel individu a été piqué (Weber & May, 1989 ; Coulson, 1990, Gokool & Smith, 1992).

III.2. Objectifs

Les objectifs sont les suivants :

- évaluer les facteurs permettant d'expliquer qu'un individu est plus piqué par un anophèle vecteur de *Plasmodium*, (poids, âge, sexe, localisation dans le village, nature de la case, nombre de personnes dans la case),
- évaluer les différences de nombre de piqûres infestantes que reçoit un individu donné en fonction de ces différents paramètres afin de pouvoir rattacher de façon plus précise l'évolution des paramètres immunologiques, à la transmission,

- évaluer s'il existe d'autres facteurs de variation, différents de ceux prévus,

- détecter, quatre fois dans l'année, qui a reçu une piqure infestante, au jour J₀, afin que les équipes avec lesquelles nous collaborons suivent tous les quatre jours, pendant trois semaines, l'évolution des paramètres cliniques, parasitologiques et immunologiques, chez les individus contaminés.

III.3. Matériel et méthodes

Le site sélectionné est Dielmo, village de 250 habitants, dans le Sine-Saloum, où une équipe réalise chaque mois une mission de capture de *Culicidae* depuis avril 1990. La transmission y est continue.

III.3.1. Extraction de l'ADN d'homme à partir de lymphocytes selon la méthode phénol-chloroforme

01- Préparation de 100 ml tampon LGB (lyse des globules blancs)

- Tris HCl pH = 7,6	10 mM	1,211 g
- EDTA pH = 8 0,	0,1 M	3,720 g
- NaCl	50 mM	0,292 g
- SDS	2% w/v	2 g
- Protéinase K	300 µg/ml	30 mg

Garder le tampon à 4 °C

02 - Mettre 50 µl de solution contenant les globules blancs (environ 10⁵ lymphocytes) dans un tube numéroté de 1,5 ml,

03 - ajouter 1 ml du tampon LGB,

04 - incuber à 41 °C dans un Bain-Marie pendant 2 à 16 h en agitant,

05 - ajouter 0,5 ml de phénol-chloroforme (mélange 25 : 25) puis vortexer,

06 - centrifuger 10 mn à 1500 t/mn

07 - garder la phase supérieure dans un nouveau tube numéroté de 1,5 ml,

08 - ajouter 0,5 ml de phénol-chloroforme (mélange 25 : 25) puis vortexer,

09 - centrifuger 10 mn à 1500 t/mn

10 - garder la phase supérieure dans un nouveau tube numéroté de 1,5 ml,

11 - éliminer le reste du phénol avec 1 ml de chloroforme,

12 - ajouter 50 ml de NaCl 3 M et 0,7 ml d'isopropanol ; l'ADN est précipité immédiatement,

13 - centrifuger 10 mn à 13.500 t/mn

14 - laver le culot 2 fois à l'alcool 70° en retournant le tube délicatement. Au dernier lavage, vider le reste de l'alcool à la pipette en faisant attention au culot,

15 - sécher dans le "Speed Vac" pendant 20 mn,

16 - reconstituer dans 100 µl de tampon de resuspension

Tris HCl pH = 7,6 10 mM

EDTA pH = 8 1 mM

17 - vortexer

Le stockage se fait à -20 °C

III.3.2. Extraction de l'ADN d'homme chez les anophèles, d'après Coulson *et al.*, 1990

01 - Préparer les tampons

Tampon de broyage : pour 100 ml

Tris HCl pH = 7,5	10 mM	0,121 g
NaCl	60 mM	0,351 g
EDTA	10 mM	0,372 g
sucrose	5% w/v	5 g
spermidine	0,15 mM	0,0022 g
spermine	0,15 mM	0,006 g

Tampon SDS : pour 100 ml

Tris HCl pH = 9	0,3 M	3,633 g
SDS	1,5% w/v	1,5 g
EDTA	0,1 M	3,722 g
sucrose	5% w/v	5 g
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	0,34% v/v	0,4 ml

Garder les tampons à +4 °C

02 - Mettre le moustique dans un tube de 1,5 ml portant le numéro du moustique,

03 - incuber sur de la carboglace pendant 20 mn,

- 04 - broyer le moustique dans 25 µl de tampon de broyage,
 - 05 - ajouter 75 µl de tampon de broyage et 10 µl de tampon SDS,
 - 06 - mettre le tube 40 mn à 65 °C dans le bain sec (allumé 30 mn à l'avance),
 - 07 - refroidir dans la glace quelques secondes,
 - 08 - ajouter 30 µl d'acétate de potassium 8 M (58,89 g dans 75 ml d'eau distillée) ; "vortexer" fort,
 - 09 - mettre dans la glace pour 45 mn,
 - 10 - centrifuger 10 mn à 13.500 tour/mn à +4 °C,
 - 12 - garder le surnageant dans un nouveau tube numéroté de 1,5 ml en faisant attention au culot,
 - 13 - ajouter 260 µl d'alcool 95 °C à -20 °C et incuber 5 mn à la température de la pièce,
 - 14 - centrifuger 5 mn à 13.500 tour/mn,
 - 15 - laver 3 fois à l'alcool 70° en retournant le tube délicatement. Au dernier lavage, vider le reste de l'alcool à la pipette en faisant attention au culot ; changer de pointe après chaque moustique,
 - 16 - sécher au "Speed Vac" pendant 20 mn,
 - 17 - reconstituer dans 50 µl de tampon de resuspension puis vortexer.
- Le stockage se fait à -20 °C

III.3.3. Premier essai

Trois gènes microsatellites de type (CA)_n (dinucléotides) pouvant être testés en même temps, ont été retenus ("insulin like growth factor 1 : IGF1", "somatostatin : SST", "apolipoprotein 2 : APOA 2") dont les séquences sont les suivantes :

IGF1	GCT AGC CAG CTG GTG TTA TT ACC ACT CTG GGA GAA GGG TA
SST	GCT CAA ATG TTT CTG CAA CC CTT TGT AGC TCG TGA TGT GA
APOA2	GGT CTG GAA GTA CTG AGA AA GAT TCA CTG CTG TGG ACC CA

Les amorces spécifiques de ces trois gènes donnent des tailles comprises entre 120 et 150 paires de bases pour APOA 2, 150 et 175 pour

SST, 180 et 200 pour IGF1, selon le nombre de répétitions des bases CA (Weber & May, 1989). Afin d'augmenter la résolution de l'amplification, du dATP marqué au soufre 35 ($[^{35}\text{S}]$ dATP) est incorporé dans le "mix" et une autoradiographie du gel est effectuée.

III.3.3.1. Amplification de l'ADN d'homme et visualisation sur gel d'agarose

Traiter 10 échantillons : 5 provenant de repas de moustiques, 5 des prélèvements humains.

Mix	1 tube	11 tubes
Eau distillée	22,44 μl	246,84 μl
Tampon <i>Taq</i> 10 X	5 μl	55 μl
dNTP à 25 mM	0,16 μl	1,76 μl
IGF1-1	2 μl	22 μl
IGF1-1	2 μl	22 μl
SST-1	2 μl	22 μl
SST-2	2 μl	22 μl
APOA2-1	2 μl	22 μl
APOA2-2	2 μl	22 μl
<i>Taq</i> pol	0,4 μl	4,4 μl

distribuer 40 μl de "mix" dans chaque tubes de 0,5 numéroté,
ajouter 10 μl de solution d'ADN de chaque individu par tube numéroté,

lancer la PCR.

L'amplifiat est visualisé sur gel agarose (voir II.3.5.2.) afin de voir s'il y a des bandes.

III.3.4.2. Visualisation avec du $[^{35}\text{S}]$ dATP

C'est en fait une amplification-marquage qui est effectuée, puisque c'est du $[^{35}\text{S}]$ dATP qui est utilisé à la place du dATP lors d'une étape d'amplification, afin de pouvoir faire une révélation sur film.

III.3.3.2.1. Amplification

Selon Weber & May (1989), le milieu réactionnel doit être :

pour dATP à 2,5 μM ce qui correspond à 2,5 pmole dans	1 μl
pour dGTP à 200 μM ce qui correspond à 200 pmole dans	1 μl
pour dCTP à 200 μM ce qui correspond à 200 pmole dans	1 μl
pour dTTP à 200 μM ce qui correspond à 200 pmole dans	1 μl
pour [^{35}S]dATP à 2 μCi à 500 Ci/mmmole ce qui correspond à 4 pmole dans 1 μl	

01 - Préparer 100 μl de solution biaisée de dNTP (dNTPb):

dATP à 10 mM	1,25 μl
dGTP à 100 mM	10 μl
dCTP à 100 mM	10 μl
dTTP à 100 mM	10 μl
H ₂ O	68,75 μl

02 - Préparer le "mix" pour 10 tubes :

Mix	1 tube	11 tubes
Eau distillée	22,44 μl	246,84 μl
Tampon <i>Taq</i> 10 X	5 μl	55 μl
dNTP b	0,2 μl	2,2 μl
IGF1-1	2 μl	22 μl
IGF1-1	2 μl	22 μl
SST-1	2 μl	22 μl
SST-2	2 μl	22 μl
APOA2-1	2 μl	22 μl
APOA2-2	2 μl	22 μl
<i>Taq</i> pol	0,4 μl	4,4 μl

03 - distribuer 40 μl de "mix" dans chaque tube numéroté,

04 - ajouter 10 μl d'ADN dans le tube correspondant,

05 - lancer la PCR pour 30 cycles

Au 17ème cycle, 2 μl de solution de [^{35}S] dATP est ajouté à chaque tube.

III.3.3.2.1. Révélation sur gel polyacrylamide dénaturant à 6%:

01 - Préparation du gel polyacrylamide dénaturant. Faire le mélange dans l'ordre:

TBE 10X	10 ml
Acrylamide /bis acrylamide	40 ml
Urée	42 g
H ₂ O	100 mlqsp
APS (ammonium persulfate)	600 µl
TEMED	100 µl

02 - Monter les plaques de verre séparées par des espaceurs sur l'appareil à électrophorèse,

03 - couler le mélange en évitant qu'il se forme des bulles d'air,

04 - placer les peignes,

05- après polymérisation, retirer les peignes en ajoutant du TBE 1 X par dessus afin d'éviter que les puits formés ne se referment,

06 - effectuer un préchauffage en mettant sous tension,

07 - charger les amplifiats après avoir coloré par du bleu,

08 - mettre sous tension.

Après migration :

09 - séparer soigneusement les plaques de verre, plonger celle qui porte le gel dans une solution d'acide acétique pour la fixation (environ 20 mn),

10 - placer ensuite le gel sur du papier buvard le couvrir de "Saran",

11 - sécher le gel pendant 2 h 30,

12 - monter le gel sur une plaque photo contenant un film en plaçant le "Saran" contre le film (2 jours ou plus),

13 - révéler le film en le passant successivement dans :

- le bain de révélation

- le bain d'arrêt

- le bain de fixation,

14 - sécher le film.

La solution d'acrylamide /bis acrylamide (à 30%) contient 29 g d'acrylamide et 1 g de bis acrylamide dans 100 ml.

III.3.4. Deuxième essai

Trois séquences contenant des répétitions de tétranucléotides (AAAG)_n situés sur le chromosome 20 (Melis *et al.*, 1993) sont choisies. Les amorces sont UT236, UT242 et UT275 dont les séquences sont :

UT236A GAG TAT CCA GAG AGC TAT TA
UT236B ATT ACA GTG TGA GAC CCT G

UT242A TTC CTG ATC AGT CAC CAT GTA
UT242B CAG CCT GGG TGA CAG AGA A

UT275A TGA AGT GTA GAG CTT GAC A
UT275B TGC AGT GAG CCA TGT TCA T

Ces amorces flanquent les fragments dont les tailles se situent respectivement vers les 120, 300 et 150 paires de bases. Les profils sont réalisés après migration sur gel polyacrylamide non dénaturant et coloration au nitrate d'argent.

III.4.4.1. Amplification d'ADN d'homme et visualisation sur gel d'agarose

L'amplification de l'ADN d'homme se fait de la même manière qu'en III.3.3.1., mais seuls de l'ADN extrait directement de lymphocytes prélevés d'homme a été utilisé.

III.3.4.2. Visualisation par coloration au nitrate d'argent

Préparation du gel polyacrylamide à 10 % (non dénaturant)

H ₂ O	44,5 ml
TBE 10 X	5 ml
Acrylamide	4,8 g
Bis acrylamide	0,2 g
Ammonium persulfate 10 %	0,4 ml
TEMED	40 µl

Après migration des produit d'amplification sur le gel polyacrylamide,

- 01 - fixer le gel dans 100 ml d'acide trichloracétique 12% pendant 60 mn,
- 02 - laver dans du méthanol 5% (5 ml qsp 100) pendant 3 mn 20,
- 03 - immerger le gel dans 100 ml de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) à 0,004% (4 mg dans 100 ml d'eau). Préparer la solution juste avant emploi,
- 04 - laver le gel 3 fois dans l'eau,
- 05 - mettre le gel dans 100 ml de solution de nitrate d'argent à 0,2% (200 mg dans 100 ml), contenant 75 μl de formaldéhyde à 37%. Préparer la solution juste avant emploi 75 μl
- 06 - laver délicatement à l'eau 2 fois
- 07 - révéler dans 200 ml de solution de carbonate de sodium à 0,3% (6 g dans 200 ml), contenant 100 μl de formaldéhyde à 37% et deux grains de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Préparer la solution juste avant emploi,
- 08 - laver le gel délicatement dans l'eau,
- 09 - mettre le gel dans 100 ml d'acide acétique à 5% pendant 10 mn pour arrêter la révélation
- 10 - mettre le gel dans du méthanol 5% pendant 15 mn

III.4. Résultats

III.4.1. Résultats du premier essai

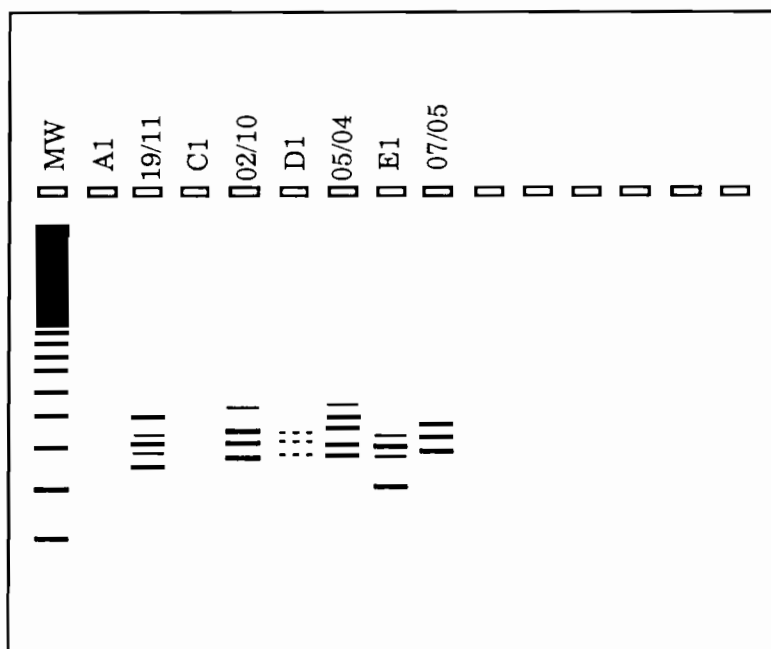
La révélation sur gel d'agarose (figure 18) montre la présence de bandes, ce qui prouve l'ADN extrait de lymphocytes a été amplifié. Les bandes apparaissent regroupées, et ne peuvent être analysées que sur gel très résolutifs d'acrylamide.

L'autoradiographie s'est révélée négative après amplification en présence de [^{35}S]dATP. Il n'a pas été possible de réaliser les profils par cette méthode.

III.4.2. Résultats du deuxième essai

Les bandes obtenues gel d'agarose, prouvent qu'une amplification d'ADN a eu lieu. L'observation de ces bandes sur gel polyacrylamide coloré au nitrate d'argent donnent les résultats schématisés à la figure 19. Ces bandes montrent un polymorphisme net selon les individus avec 7 allèles pour la seule paire d'amorces UT236. Pour la paire d'amorces UT275, 9 allèles ont été trouvés parmi les 10 échantillons testés et pour la paire

Figure 18 : Bandes obtenues après amplification avec les amorces APOA1, IGF, SST des séquences d'ADN humain et migration sur gel d'agarose à 1,5 %



MW = marqueur de taille "100 base paire ladder"

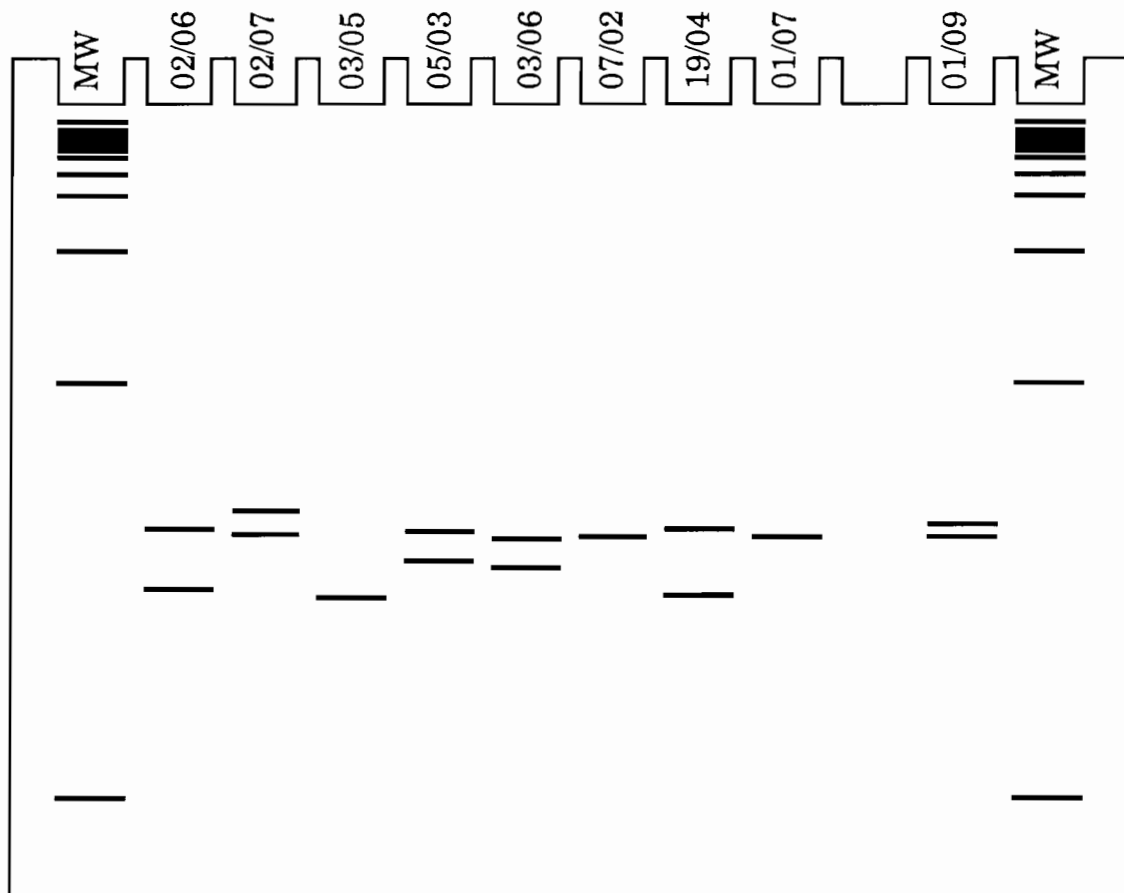
Chiffres avec barre = numéro de code des habitants de Dielmo

Lettres = ADN Humain extrait du repas de sang des moustiques

□ Puit du gel

— bandes

Figure 19 : Bandes obtenues des séquences d'ADN humain après amplification avec l'amorce UT236 et migration sur gel polyacrylamide à 10 % non dénaturant



MW = marqueur de taille

nt = nucléotide

Chiffres avec barre = numéro de code des habitants de Dielmo

d'amorces U242, 8 allèles. Après avoir repris les mêmes expériences avec les mêmes échantillons les résultats ont été identiques.

III.5. Discussion

Dans l'ensemble, les migrations effectuées sur gel d'agarose ont montré la présence d'ADN. Ce qui prouve que les deux méthodes d'extraction utilisées sont fiables.

L'absence de bande après autoradiographie (premier essai) s'expliquerait par le fait le [^{35}S]dATP ne soit pas incorporé ou qu'il soit entré en compétition avec le dATP qui aurait été incorporé préférentiellement par la *Taq* polymérase.

La deuxième technique (deuxième essai) doit être affinée afin qu'on ait une meilleure résolution. Les bandes parasites obtenues dans certains cas pourraient être évitées par l'application de la méthode "touchdown" qui consiste à choisir des températures d'hybridation élevées au départ, et à les baisser au fur et à mesure (Mellersh & Sampson, 1993).

La première méthodologie plus compliquée utilisant la radioactivité a été abandonnée au profit de la deuxième méthodologie plus simple qui semble répondre à nos exigences. Le nombre d'allèles mis en jeu est plus élevé pour cette dernière.

CONCLUSION

La technique PCR bien maîtrisée au laboratoire, nous a permis d'identifier les espèces du complexe *An. gambiae*. Cette identification faite seulement à partir des pattes est d'un grand intérêt, puisqu'elle laisse le reste du moustique pour d'autres types d'analyse.

Trois espèces ont été identifiées par cette technique au sein du complexe *An. gambiae* : *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*. Ces espèces ont été rencontrées à Dielmo et à Ndiop à côté d'*An. funestus*.

A Dielmo, *An. funestus* a été l'espèce la plus abondante entre avril 1992 et mars 1993 suivie d'*An. arabiensis* puis d'*An. gambiae*. Entre avril 1993 et mars 1994, *An. arabiensis* a dominé et *An. funestus* a été relégué au troisième plan. *An. melas* a été rare.

Entre avril 1993 et mars 1994 à Ndiop, *An. arabiensis* a dominé. *An. funestus* et *An. melas* ont été rares.

La PCR a permis d'étudier les cycles d'agressivité horaire et annuel, les indices sporozoïtiques et circumsporozoïtiques, les taux d'antropophilie et de parturité chez *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Ces deux espèces ont plus piqués à l'intérieur des domiciles, surtout dans la seconde moitié de la nuit. Les variations d'abondance ont été saisonnières et annuelles. Les indices circumsporozoïtiques moyens ainsi que les niveaux de transmission d'*An. gambiae*, d'*An. arabiensis* et d'*An. funestus* ont varié d'une année à l'autre à Dielmo. Entre avril 1992 et mars 1993 à Dielmo, *An. funestus* a été le vecteur principal du paludisme suivi d'*An. gambiae* puis d'*An. arabiensis* ; ce dernier a été le vecteur principal entre avril 1993 et mars 1994, devant *An. gambiae* suivi d'*An. funestus*. A Ndiop le vecteur principal a été *An. arabiensis*. La transmission a été continue à Dielmo, à Ndiop, elle s'est limitée à la saison des pluies.

Toutes ces données ont été obtenues grâce à la techniques PCR simple et rapide, mais qui reste encore onéreuse par le matériel qu'elle nécessite. Cependant, les améliorations sans cesse apportées devraient arriver à une baisse considérable du coût des analyses, et un grand nombre de laboratoire pourrait l'utiliser en routine.

Cette technique permet maintenant de connaître les individus piqués par des anophèles infestés à partir des repas de sang. L'étude de la transmission qui se fera désormais à partir du nombre de piqûres qu'a réellement reçu un individu devrait permettre d'obtenir des informations plus précises destinées à être corrélées avec les données obtenues en parasitologie, clinique et en immunologie.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWS A. T., 1992 - Electrophoresis of nucleic acids In : "Essential Molecular Biology" : A Practical Approach IRL PRESS, OXFORD, **1**, 89-126.
- ANONYME, 1992 - Stratégie mondiale de lutte antipaludique. Conférence ministérielle de lutte sur le paludisme. Amsterdam, O.M.S. CTD/MCM/92-3
- APPAWU M. A., BAFFOE-WILMOT A., AFARI E. A., NKRUMAH F. K. & PETRARCA V., 1994 - Species composition and inversion polymorphism of the *Anopheles gambiae* complex in some sites of Ghana, West Africa. *Acta Tropica*, **56** (1), 15-23.
- BECKINGHAM K., 1982 - Insects rDNA. In *The Cell Nucleus* (Busch, H. ROTHBLUM, L. eds)-Academic Press, New York , **10**, 205-263.
- BEIER J.C., ASIAGO C. M., ONYANGO F. K. & KOROS J. K., 1988a - Elisa absorbance cutoff method affects malaria sporozoite rate determination in wild afrotropical *Anopheles*. *Med. Vet. Ent.* **2**, 259-264.
- BEIER J. C., WIRTZ R. A., PERKINS P. V., KOROS J., DIGGS D., GARGAM T. P. & KOECH D. K., 1988b - Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa), tested on *Anopheles* (Diptera : Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.*, **25** (1), 9-16.
- BESANSKY N. J., POWELL J. R., CACONE A., HAMM D. M., SCOTT J. A. & COLLINS F. H., 1994 - Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6885-6888.
- BRYAN J. H., DI DECO M. A., PETRARCA V. & COLUZZI M., 1982 - Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.str. in The Gambia, West Africa. *Genetica*, **59**, 167-176.
- BRYAN J. H. & SMALLEY M. E., 1978 - The Use of ABO blood groups as markers for biting studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **72**, 357-360.

- BRYAN J. H., PETRARCA V., DI DECO M. A. & COLUZZI M., 1987 - Adult behaviour of members of the *Anopheles gambiae* complex in the Gambia with special reference to *Anopheles melas* and its chromosomal variants. *Parassitologia*, **29**, 221-249.
- BURKOT T. R., 1988 - No-random host selection by anopheline mosquitoes. *Parasitology today*, **4**, 156-162.
- CARNEVALE P., FREZIL J. L., BOSSENSO M. F., LE PONT F. & LANCIEN J., 1978 - Etude de l'agressivité d'*Anopheles gambiae* A en fonction de l'âge et du sexe des sujets humains. *Bull. OMS*, **56**, 147-154.
- CHARLIONET R. & RIVAT C., 1990 - In : Electrophorèse - "Principes et concepts méthodologiques". Ed. INSERM Paris, 155 p.
- COLLINS F. H., MENDEZ A. M., RASMUSSEN M. O., MEHAFFEY P. C., BESANSKY N. J. & FINNERTY V., 1987 - A ribosomal RNA probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37** (1), 37-41.
- COLLINS F. H., PETRARCA V., MPOFU S., BRANDLING-BENNETT A. D., WERE J. B. O., RASMUSSEN M. O. & FINNERTY V., 1988 - Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected *Anopheles gambiae* complex mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **39** (6), 545-550.
- COLUZZI M., PETRARCA V. & DI DECO M., 1985 - Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.*, **52**, 45-63.
- COOSEMANS M., PETRARCA V., BARUTWANAYO M. & COLUZZI M., 1989 - Species of the *Anopheles gambiae* complex and chromosomal polymorphism in a rice-growing area of the Rusizi Valley (Republic of Burundi). *Parassitologia*, **31**, 113-122.
- COULSON R. M. C., CURTIS P., READY P. D., HILL N. & SMITH D., 1990 - Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**, 357-366.
- COZ J. & BRENGUES J., 1967 - Le complexe *Anopheles gambiae* et l'épidémiologie du paludisme et de la filariose de Bancroft en Afrique de l'Ouest. *Médecine d'Afrique Noire*, **6**, 301-304.

- COZ J. & HAMON J., 1964 - Le complexe *Anopheles gambiae* en Afrique Occidentale. *Estratto dalla Rivista di Malariologia*, **43**, 233-244.
- CRAMPTON J. M. & HILL S. M. 1993 - DNA probes for the identification of malaria vectors. *Parasitologia*, **35**, 31-34.
- DARNEL J., LODISH H. & BALTIMORE D., 1988 - Synthèse, réparation et recombinaison de l'ADN In : "La Cellule Biologie Moléculaire". Ed. VIGOT, Paris, 517-565.
- DAVIDSON G. & HUNT R. H., 1973 - The crossing and chromosome characteristics of a new sixth species in the *Anopheles gambiae*. *Parassitologia* , **15**, 121-128.
- DE BRUIJN M. H. L., 1988 - Diagnostic DNA amplification no respite for the elusive parasite. *Parasitology Today*, **4**, 293-295.
- DE MEILLON, 1956 - Aspect of malaria vector research in Africa. *Bull WHO* , **15**, 847-851.
- DIAGNE N. A., 1992 - Le paludisme à Dielmo (Sénégal). Etude de la transmission et observations parasitologiques et cliniques chez les femmes enceintes. *Mém. D.E.A., Fac. Sc. et Tech. Univ. C.A.D. DAKAR*, **34**, 87 p.
- DIAGNE N. A., FONTENILLE D., KONATE L., FAYE O., LAMIZANA M. L., LEGROS F., MOLEZ J. F. & TRAPE J. F., 1994 - Les anophèles du Sénégal. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **87**, 267-277
- ELIE, 1993 - Les approches expérimentales In "La PCR : un procédé de répllication *in vitro* "Ed. *MEDICALES INTERNATIONALES* , Paris, 45-67.
- FAVIA G., DIMOPOULOS G. & LOUIS C., 1994 - Analysis of the *Anopheles gambiae* genome using RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, **3** (3), 149-157.
- FAYE F. B. K., 1995 - *Plasmodium ovale* à Dielmo (Sénégal). Etude parasito-clinique et observations entomologiques. *Mém. D.E.A., Fac. Sc. Univ. C.A.D. DAKAR*, **61**, 70 p.

- FOLEY D. H., PARU R., DAGORO H. & BRYAN J. H., 1993 - Allozyme analysis reveals six species within the *Anopheles punctulatus* complex of mosquitoes in Papua New Guinea. *Medical and Veterinary Entomology*, **7** (1), 37-48.
- FONTENILLE D., FAYE O., KONATE L., SY N. & COLLINS F., 1993 - Comparaison des techniques PCR et cytogénétique pour la détermination des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Sénégal. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **68**, 239-240.
- FRIZZI G. & HOLSTEIN M., 1956 - Etude cytogénétique d'*Anopheles gambiae*. *Bull WHO*, **15**, 425-435.
- GALE K. & CRAMPTON J. M., 1987 - DNA for species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, **1**, 127-136.
- GILLIES M. T. & COETZEE M., 1987 - A supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara. Publication of the South Africa Institute for Medical Research, Johannesburg, **55**, 143 p.
- GOKOOL S. SMITH. D. D., & CURTIS C. F., 1992 - The use of PCR to help quantify the protection provided by impregnated Bednets. *Parasitology Today*, **8** (10), 347-350.
- HAMON J., ABONNENC E. & NOEL E., 1955 - Contribution à l'étude des Culicides de l'Ouest du Sénégal. *Annales de Parasitologie*, **30** (3), 278-308.
- HILL S. M., URWIN R., KNAPP T. F. & CRAMPTON J. A., 1991 - Synthetic DNA probes for identification of sibling species in the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, **5**, 455-463.
- INNIS M. A. & GELFAND D. H. 1990 - Optimization of PCR In : "PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications". Academic Press Inc, 3-12.
- INNIS M. A., MYAMBO K. B., GELFAND D. H. & BROW M. A. D., 1988 - DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9436-9440.

IVINSON A. J. & TAYLOR G. R., 1993 - PCR in genetic diagnosis In : "PCR" : A Practical Approach IRL PRESS , OXFORD, 15-28.

JACKSON D. P., HAYDEN J. D. & QUIRKE P., 1993 - Extraction of nucleic acid from fresh or archival matériel In "PCR" : A Practical Approach IRL PRESS, OXFORD, 29-50.

JU L.-Y. & CHARRON D., 1992 - Typage HLA de classe II par amplification d'ADN et digestion avec des endonucléases spécifiques d'allèles In : "Amplification Enzymatique des séquences nucléotidiques par PCR". *Ed INSERM*, Paris, 31-42.

KAMBHAMPATI S., BLACK IV W. C. & 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.

KAPLAN J.-C. & DELPECH M., 1993 - Biologie Moléculaire et Médecine (2e éd.). *FLAMMARION* , -755 p.

KOCHER T. D. & WILSON A. C., 1993 - DNA amplification by the polymerase chain reaction In : "Essential Molecular Biology" : A Practical Approach IRL PRESS, OXFORD, **2**, 185-208.

KONATE L., 1991 - Epidémiologie du paludisme dans un village de savane Soudanienne : Dielmo Sénégal, *thèse de 3ème cycle* Fac. Sc. et Tech. Univ. C.A.D. DAKAR, 105 p.

KONATE L., DIAGNE N., BRAHIMI K., FAYE O., LEGROS F., ROGIER C., PETRARCA V. & TRAPE J. F., 1994 - Biologie des vecteurs et transmission de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium* et *Plasmodium* dans un village de savane d'Afrique de l'Ouest (Dielmo, Sénégal). *Parasite*, **1**, 325-333.

KONG H., KUCERA R. B. & JACK W. E., 1993 - Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile Archaea *Thermococcus litoralis*. *Journal of Biological Chemistry* , **268** (3), 1965-1973.

KUMAR A. & RAI K. S., 1993 - Molecular organization and evolution of mosquito genomes. *Comp. Biochem. Physiol.* **106** (3), 495-504.

- LAWYER F. C., STOFFEL S., SAIKIR. H., MYAMBO K., DRUMMOND & GELFAND D. H., 1989 - Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6427-6437.
- MANGA L., FONDJO E., CARNEVALE P. & ROBERT V., 1993 - Importance of Low Dispersion of *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae) on Malaria Transmission in Hilly Towns in South Cameroon. *J. Med. Entomo.* , **30** (5), 936-938.
- MCLAIN D. K. & COLLINS F. H., 1989 - Structure of DNA in the mosquito *Anopheles gambiae* and DNA sequence variation within and between species of the *Anopheles gambiae* Complex. *Heredity*, **62**, 233-242.
- MELIS R., BRADLEY P., ELSNER T., ROBERTSON M., LAWRENCE E., GERKEN S., ALBERTSEN H. & WHITE R., 1993 - Polymorphic SSR (Simple-Sequence-repeat) Markers for Chromosome 20. *Genomics*, **16**, 56-62.
- MELLERSH C. & SAMPSON J., 1993 - Simplifying Detection of Microsatellite Length polymorphisms. *Biotechniques* , **15**, 582-584.
- MEUNIER J. R. & GRIMOND P. A. D., 1993 - Factors affecting the reproducibility of a random amplified DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* **144**, 373-379.
- MILES S. J., 1978 - Enzyme variation in the *Anopheles gambiae* Giles group of species (Diptera: Culicidae). *Bull. ent. Res.*, **68**, 85-96.
- MULLIS K., 1990 - L'invention insolite de l'amplification des gènes. *Pour la Science*, **152**, 44-53.
- MOUCHET J. & CARNEVALE P., 1991 - Les vecteurs et la transmission. In : "Paludisme". *ELLIPSE* , Paris , 34 - 59.
- PASKEWITZ S.M. & COLLINS F. H., 1990 - Use of the polymerase chain reaction to identify mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**, 367-373.

- PASKEWITZ S. M., KAKIN N. G., COETZEE M. & HUNT R. H., 1993 - Evaluation of the polymerase chain reaction for identifying members of the *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae) complex in Southern Africa. *J. Med. Entomo.* , **30** (5), 953-957.
- PETRARCA V., BEIER J. C., ONYANGO F., KOROS J., ASIAGO C., KOECH D. K. & ROBERTS C. R., 1991 - Species composition of the *An. gambiae* complex (Diptera: Culicidae) at two sites in Western Kenya. *J. Med. Entomo.* **28** (3), 307-313.
- PETRARCA V., VERCRUYSSSE J. & COLUZZI M., 1987 : Observations on the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal river Basin, West Africa. *Med. Vet. Entomol.*, **1**, 303-312.
- PHILLIPS A., MILLIGAN P. J. M., BROOMFIELD G. & MOLYNEUX D. H., 1988 - Identification of medically important Diptera by analysis of cuticular hydrocarbons. *Biosystematics of Haematophagus Insects, Systematic Association*, **37**, 39-59.
- PORT G. R. & BOREHAM P. F. L., 1980 - The relationship of the host size to feeding by mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae). *Bull. ent. Res.*, **70**, 133-144.
- PORTER C. H. & COLLINS F. H., 1991 - Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera, Culicidae) *Am. J. Med. Hyg.*, **45** (2), 271-279.
- RISHIKESH N., DI DECO M. A., V..& COLUZZI M., 1985 - Seasonal variations of indoor resting *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Kaduna, Nigeria. *Acta tropica*, **42**, 165-170.
- ROBERT V. & CARNEVALE P., 1984 - Les vecteurs des paludismes en Afrique subsaharienne. *Etudes Médicales* , **2**, 79-90.
- ROBERT V., CARNEVALE P., OUEDRAGO V., PETRARCA V. & COLUZZI M., 1988 - La transmission du paludisme dans un village du Sud-Ouest du Burkina Faso. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, **68**, 107-121.

- ROBERT V., OUEDRAOGO V. & CARNEVALE, 1991 - La transmission du paludisme humain dans un village au centre de la rizière de la vallée du Kou, Burkina Faso In "Le paludisme en Afrique de l'Ouest -Etudes entomologiques et épidémiologiques en zone rizicole et en milieu urbain". Ed. ORSTOM, 5-12.
- ROBERT V., ZOULANI A. & COLUZZI M., 1990 - Analyse cytogénétique du complexe *Anopheles gambiae* dans un village du Sud-Est du Burkina-Faso. *Génétique, Sélection et Evolution*, **22**, 161-174.
- SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S. SCHARF S. J., HUGUSHI R., HORN G. T., MULLIS K. B. & ERLICH H. A., 1988 - Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- SAIKI R. K. & GELFAND D. H., 1989 - Introducing AmpliTaq DNA polymerase. *Amplification* **1**, 4-6.
- 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.
- SINGER M. & BERG P., 1992 - Réplication, maintenance et modification du génome In : "Genes & génomes". Ed VIGOT, Paris, 73-127.
- SOKHNA C. S., 1994 - Transmission du paludisme à Dielmo (Sénégal) et relation entre le délai de réinfection après chimio-thérapie et différents paramètres épidémiologiques. *Mém. D.E.A. Fac Sc. et Tech. Univ. C. A. D. DAKAR* **48**, 85p.
- SUGUNA S. G., GOPALA RATHINAM K., RAJAVEL A. R. & DHANDA V., 1994, - Morphological and chromosomal descriptions of new species in the *Anopheles subpictus* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, **8** (1), 88-94.
- SY N., - 1994. La transmission du paludisme dans deux faciès épidémiologiques du Sénégal : la zone côtière soudano-sahélienne des Niayes et la zone soudanienne de Tambacounda. *Mém. D.E.A., Fac. Sc. Univ. C.A.D. DAKAR* **52**, 46 p.
- TAYLOR G. R., 1993 - Polymerase chain reaction: basic principles and automation In "PCR" : A pratical Approach IRL PRESS, OXFORD, 1-14.

- TAYLOR K. A., KOROS J. K., NDUATI J., COPELAND R. S., COLLINS F. H. & BRANDLING-BENNETT D. A., 1990 - *Plasmodium falciparum* infection rates in *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43** (2), 124-129.
- TOSI M. & ACUTO O., 1992 - Grandeurs et limites de la PCR In : Amplification Enzymatique des séquences nucléotidiques par PCR. Ed. INSERM, Paris, 1-4.
- TOURE Y. T., PETRARCA V. & COLUZZI M., 1983 - Nuevo entità del complesso *Anopheles gambiae* in Mali. *Parassitologia*, **25**, 1-3.
- TOWNER P., 1992 - Purification of DNA In "Essential Molecular Biology" : A Practical Approach IRL PRESS, OXFORD, **1**, 47-68.
- TOWNSON H. & ONAPA A. W., 1994 - Identification by rDNA-PCR of *Anopheles bwambae*, a geothermal spring species of the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Molecular Biology*, **3** (4) 279-282.
- TRAPE J. F., ROGIER C., KONATE L., DIAGNE N., BOUGANALI H., CANQUE B., LEGROS F., BADJI A., NDIAYE G., NDIAYE P., BRAHIMI K., FAYE O. DRUILHE P., & DA SILVA L. P., 1994 - The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Sénégal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51** (2), 123-137.
- VERCRUYSSSE J. & JANCLOES M., 1981 - Etude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans la zone urbaine de Pikine (Senegal). *Cahier O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd et Parasitol.*, **19**, 165-178.
- WALLACE R. B., SHAFFER J., MURPHY R. F., BONNER J., HIROSE T & ITAKURA K., 1979 - Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to $\Phi \times 174$: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research*, **6**, 3543-3557.
- WEBER J. L. & MAY P. E., 1989 - Abundant class of DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 388-396.
- WHITE, G. B., 1974 - *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**, 39-45.

- WHITE G. B., MAGAYUKA S. A. & BOREHAM P. F. L., 1972 - Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Dipt. Culicidae) : bionomics and vectorial activity of species A and species B at Segera, Tanzania. *Bull. ent. Res.*, **62**, 295-317.
- WHITE G. B. & ROSEN, 1973 - Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Dipt., Culicidae). II. Ecology of species A and B in savana around Kadouna, Nigeria, during transition from wet to dry season. *Bull. ent. Res.*, **62**, 613-625.
- WILKERSON R. C., PARSONS T. J., ALBRIGHT D. G., KLEIN T. A. & BRAUN M. J., 1993 - Random amplified polimorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). *Insect Molecular Biology*, **1** (4), 205-211.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. & TINGEY S. V., 1990 - DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Reasearch*, **18** (22), 6531-6535.

Titre : Contribution à l'étude de la transmission du paludisme à Dielmo et à Ndiop (Sine Saloum-Sénégal) par l'utilisation de la biologie moléculaire.

Nom du candidat : Mathurin Paul René DIATTA

Nature du mémoire : D.E.A. de Biologie Animale

Jury :

Président : Mr.	Bhen Sikina	TOGUEBAYE
Membres : MM.	Ousmane	FAYE
	Didier	FONTENILLE
	Lassana	KONATE
	Jean François	TRAPE
	Jean	TROUILLET

soutenu le 31 mars 1995 à 15 heures en Amphi 7

Résumé : Les résultats présentés dans ce mémoire, complètent les études entomologiques menées à Dielmo et à Ndiop. La PCR (polymerase chain reaction) a été utilisée pour identifier les espèces du complexe *An. gambiae* et déterminer pour chaque vecteur la part prise dans la transmission du paludisme. *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas* ont été les 3 espèces du complexe rencontrées à Dielmo et à Ndiop à côté d'*An. funestus*. D'avril 1992 à mars 1993 à Dielmo, *An. funestus*, *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas* représentaient respectivement 61,4 ; 17,3 ; 21,1 et 0,2% des 5680 anophèles provenant des captures sur homme et des faunes matinales résiduelles. Les taux d'anthropophilie d'*An. funestus*, d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* ont été de 86%, 74% et 70% respectivement, les indices circumsporoïtiques respectifs sont 3,01% ; 2,86% et 0,82%. La transmission a été de 205 piqûres infectées par homme et par an, et les parts respectives de ces trois espèces ont été de 71%, 21%, 7%. D'avril 1993 à mars 1994 à Dielmo, les proportions respectives d'*An. funestus*, d'*An. gambiae*, d'*An. arabiensis* et d'*An. melas* ont été de 9,3% ; 13% ; 77,7% et 0% sur 3922 anophèles capturés sur homme. Les indices circumsporoïtiques ont été de 2,47%, 0,73% et 0,76% pour *An. funestus*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* respectivement. La transmission a été de 89 piqûres infectées par homme et par an, et les parts respectives de ces 3 espèces ont été de 28%, 11% et 61%. Les vecteurs principaux ont été *An. funestus* d'avril 1992 à mars 1993 et *An. arabiensis* d'avril 1993 à mars 1994. Les proportions de chaque espèce ont varié au cours des saisons pour les deux années d'étude. A Ndiop (avril 1993 à mars 1994), les proportions respectives, d'*An. funestus*, d'*An. gambiae*, d'*An. arabiensis* et d'*An. melas* sur 960 anophèles capturés sur homme et en faunes matinales résiduelles ont été de 0,7% ; 37,7% ; 61,3% et 0,3%. Les indices circumsporoïtiques respectifs d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* ont été 2,77% et 4,89%. La transmission a été de 48 piqûres infectées par homme et par an, dont 75,6% dues à *An. arabiensis* et 24,4% à *An. gambiae*.

Afin de retrouver quel individu a été piqué par un moustique donné, des profils de migration sur gel polyacrylamide résolutif coloré au nitrate d'argent ont été réalisés à partir d'ADN humain (provenant directement de prélèvement sanguin sur homme ou du repas de sang des moustiques) amplifié par PCR avec les paires d'amorces UT236, UT242 et UT275 qui ont montré un polymorphisme avec respectivement 7, 8, et 9 allèles entre les habitants de Dielmo. Il est donc possible de retrouver les individus piqués par les moustiques infectés.

Mots clés : PCR, *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. funestus*, Paludisme, transmission, Sénégal.