

UNIVERSITE MONTPELLIER II, SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
U.F.R DE SCIENCES

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II, Sciences et techniques du Languedoc

Discipline : Parasitologie

présentée et soutenue publiquement

par

Philippe SOLANO

le 21/11/98

Titre :

**Implications épidémiologiques de la variabilité génétique
des populations de glossines.
Cas de *Glossina palpalis* en Afrique de l'Ouest.**

Directeur de thèse :

Gérard Duvallet, Professeur Cirad-emvt

JURY

M. RAIBAUT André, Professeur, U.M II,
M. ELSER Pierre, Professeur, IMT Anvers, Belgique
M. RODHAIN François, Directeur de recherche, Institut Pasteur
M. CUNY Gérard, Directeur de recherche, ORSTOM Montpellier
M. DWINGER Ron, Directeur de recherche, AIEA, Vienne

Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une collaboration CIRAD-ORSTOM-CIRDES dirigée en particulier sur les glossines, communes aux intérêts médicaux et vétérinaires. Je tiens à remercier la direction du CIRAD-EMVT (P.C. Lefèvre puis J. Domenech, D. Richard, A. Martin) et F. Monicat, pour le financement de ce travail et leur contribution au bon déroulement de ces trois années de thèse. Je remercie également l'ORSTOM (J.L. Frézil et C. Bellec) pour m'avoir accueilli au début et à la fin de la thèse, et pour avoir mis à ma disposition les compétences et les locaux nécessaires. Je n'oublie pas le CIRDES, en particulier son directeur, S.M. Touré, pour ses encouragements et son soutien constants au cours d'un premier séjour de CSN puis au long de la thèse. Dans ces trois organismes, je tiens également à remercier le personnel administratif et financier pour sa disponibilité et son accueil.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour m'avoir octroyé une allocation de Recherche pendant trois ans. Je suis également reconnaissant aux autres organismes dont le soutien financier est intervenu à un moment ou l'autre de ce travail : AUPELF-UREF, Coopération Française, Agence Internationale de l'Energie Atomique, CNRS.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à :

** Gérard Duvallet : vous êtes à l'origine de tout ce travail, depuis mon premier séjour au CIRDES en tant que CSN. Vous avez su me mettre à l'aise dès le départ et m'intégrer dans l'Unité EPI du CRTA que vous dirigiez, et dans laquelle j'ai continué à travailler après votre départ. Vous avez également accepté de diriger cette thèse que nous avons conçu à Bobo-Dioulasso, me témoignant ainsi une confiance qui m'a fortement touché. Je souhaite sincèrement que vous puissiez remettre vos compétences exceptionnelles, tant scientifiques, pédagogiques, et organisationnelles, au service exclusif de la trypanosomose dans un avenir très proche.*

** Dominique Cuisance : depuis mes premiers contacts avec le CIRAD en 1993 et avec l'ex-CRTA, j'ai toujours trouvé en vous un soutien permanent, aussi*

bien scientifique qu'humain, et j'ai beaucoup apprécié votre expérience, votre savoir et votre intégrité, dans cet environnement tropicaliste.

Je tiens à vous exprimer à tous les deux un profond respect et je vous dis simplement : merci.

Jean-Louis Frézil, c'est depuis le DEA que nous nous cotoyons (scientifiquement), et votre excellence scientifique et pédagogique n'a d'égale que vos dons d'orateur ! Merci pour votre soutien constant et les moments partagés.

Gérard Cuny, je suis arrivé à faire de la biologie moléculaire grâce à toi et ton équipe, et je n'oublie pas votre patience à tous, en particulier Valérie Dumas et Sophie Ravel. Je te remercie beaucoup pour ton soutien scientifique indispensable à la réalisation de cette thèse, et pour ton apparente tranquillité rassurante. Et au cours des nombreuses heures passées au laboratoire, je n'oublie pas cet aphorisme : « Il n'est pas nécessaire d'espérer pour entreprendre, ni de réussir pour persévérer », et également « une journée est faite de 24 heures » !

Je n'oublie pas mes professeurs d'Université à Montpellier qui ont su me faire aimer la parasitologie, et qui sont pour beaucoup dans l'orientation que j'ai prise : je pense en particulier à L. Euzet et A. Raibaut, qu'ils trouvent ici l'expression de mes respectueux remerciements.

J'ai sollicité T. de Meeüs assez tard au cours de ce travail, et je te remercie beaucoup de l'attention et des conseils que tu m'as apportés, sans lesquels j'aurais eu du mal à terminer cette thèse ; que soit également remercié F. Renaud à cette occasion.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, pour leur présence à ce jury, à messieurs les Professeurs F. Rodhain de l'Institut Pasteur Paris, et P. Elsen de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers, ainsi que le docteur R. Dwinger, de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique de Vienne. Je suis très sensible au grand honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Je sais par avance que je ne pourrais nommer tout le monde que je dois remercier au CIRDES, pour son accueil inoubliable et les 3 ans passés au sein de cette structure que j'ai vu évoluer, avec les joies et les peines de chacun. Aussi bien en brousse que dans le centre, je n'oublierai personne, en particulier bien sûr dans les unités EPI et ULV ; merci à I. Sidibé, mon ami et « chef d'unité » fiable, et aussi à Z. Bengaly, I. Kaboré et B. Bauer ; merci aussi à Joanny et Adrien, compagnons quotidiens, mais également tous ceux avec qui j'ai partagé des moments, de terrain ou de laboratoire. Je vous souhaite à tous beaucoup de santé surtout, et le reste aussi.

Au CIRDES, au CIRAD, à l'ORSTOM, ou ailleurs, j'ai une pensée particulière pour ceux qui m'ont spontanément aidé à un moment ou à un autre, mais aussi avec lesquels j'ai partagé des moments moins racontables. Je pense notamment à : Thierry Lefrançois, Sandrine et Arnaud Delafosse, Jef et Vincent Michel, Frédéric Stachurski, Anne-Laure Banuls, Stéphane de la Rocque, Jean-Marc Reifenberg, Isabelle Morlais, Sylvain Brisse, Thierry Baldet.

J'ai une pensée particulière pour J. P. Dujardin, qui m'a inculqué les premiers rudiments de génétique des populations au cours du DEA, ainsi que M. Tibayrenc.

Merci à J. Seignot, au Dr. O. Diall, et à I. Morlais pour la fourniture des glossines provenant respectivement du Sénégal, du Mali, et du Cameroun.

Je n'oublie pas B. Tchikaya, J.Y. Meunier, et J.S. Rodier pour leur collaboration active à l'insectarium.

Ont également toujours répondu présent à mes sollicitations et je les en remercie : J.C. Maillard, B. Geoffroy, I. de Zborowsky, V. Verdier, M. de Garine-Wichatitsky, F. Maudet, S. Messad, , M. Arnaud, A. Diallo.

A mes parents et ma sœur,

A Sandrine ; à ses parents.

A mes amis.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
Avant-Propos	5
Introduction :	6
Chapître 1 :	8
Etat des Connaissances	8
1. Les trypanosomoses en Afrique : un problème d'actualité	9
2. Les acteurs, le système pathogène	10
2.1 Les glossines	10
2.1.1 Présentation	10
2.1.2 Répartition géographique	12
2.1.3 Biologie et écologie de <i>Glossina palpalis gambiensis</i>	13
2.1.3.1 Le biotope	13
2.1.3.2 La dispersion	14
2.1.3.3 La gamme d'hôtes nourriciers :	14
2.1.3.4 Cycle de vie	15
2.1.4 Aptitude des glossines à s'infecter	17
2.2 Les hôtes mammifères	20
2.3 Les trypanosomes	21
2.3.1 Les cycles de développement des trypanosomes chez le vecteur	21
2.3.2 Diagnostic	23
2.3.2.1 Chez la glossine	23
2.3.2.2 Chez l'hôte mammifère	24
2.3.2.3 Apport des outils moléculaires	25
3. Cytogénétique et génétique des Populations de vecteurs	29
4. Les marqueurs microsatellites : un outil récent	35
4.1 Description et Définitions	35
4.2 Polymorphisme et mutations	36
4.3 Principales applications	36
4.4 Utilisation en génétique des populations:	37
5. L'analyse morphométrique : de nouvelles possibilités	39
Chapitre 2 :	40
Matériel et Méthodes	40
1. Recherche des microsatellites :	41
1.1 Détection et clonage	41
1.2 Séquençage et choix des amorces	43
1.3 Etalonnage des allèles	44
2. Conditions d'amplification et de révélation des allèles microsatellites	45
3. Matériel biologique :	45
3.1 Glossines d'insectarium	45
3.2 populations naturelles :	46
3.2.1 Mali	46

3.2.2 Sénégal	46
3.2.3 Burkina Faso : Présentation des zones d'étude	48
3.2.3.1 Samorogouan	48
3.2.3.2 Sidéradougou	50
3.2.4 Travail effectué sur le terrain	52
3.2.5 Traitements au laboratoire	53
4. Interprétation des données génétiques	54
4.1 Détermination du génotype des individus :	54
4.2 Tests génétiques effectués	54
4.2.1 Analyses intrapopulation :	55
4.2.2 Analyses interpopulation :	56
4.2.3 Stratégies d'analyse :	57
4.2.4 Analyse Factorielle des Correspondances	57
5. Analyses morphométriques	58
<u>Chapitre 3 :</u>	61
<u>Résultats</u>	61
1. Obtention des microsatellites	62
2. Glossines d'insectarium	62
2.1 Polymorphisme des séquences microsatellites chez <i>G. palpalis gambiensis</i>	62
2.2 Transmission des allèles entre générations chez <i>Glossina palpalis gambiensis</i>	64
2.3 Extension à d'autres taxons	67
3. Populations naturelles de <i>Glossina palpalis gambiensis</i>	68
3.1 Résultats génétiques et morphométriques obtenus sur l'ensemble des populations	69
3.1.1 Analyses génétiques intrapopulation	71
3.1.2 Analyses génétiques interpopulations	73
3.1.3 Apport des analyses morphométriques	75
3.2 Résultats épidémiologiques et génétiques obtenus dans la zone de Samorogouan, au Burkina Faso	75
3.2.1 Entomologie et parasitologie	75
3.2.2 Analyse des repas de sang	77
3.2.3 Analyses génétiques à Samorogouan	77
3.3 Résultats épidémiologiques et génétiques obtenus dans la zone de Sidéradougou, au Burkina faso	79
3.3.1 Entomologie et parasitologie:	79
3.3.1.1 A Nyarafo, ouest de la zone	79
3.3.1.2 A Yéguéré, est de la zone	80
3.3.2 Caractérisation par PCR des trypanosomes présents chez <i>G. palpalis gambiensis</i>	82
3.3.2.1 A Nyarafo	82
3.3.2.2 A Yéguéré	82
3.3.3 Taux d'infection et caractérisation des trypanosomes chez les animaux des producteurs locaux	82
3.3.4 Analyse des repas de sang :	83
3.3.5 Synthèse des données épidémiologiques recueillies sur les glossines dans la zone de Sidéradougou	84
3.3.6 Analyses génétiques	85
3.4 Résultats supplémentaires obtenus avec les microsatellites	92

3.4.1 Sur l'ensemble des populations	92
3.4.2 Dans la zone de Sidéradougou, deux échelles spatiales de structuration génétique des populations de <i>G. palpalis gambiensis</i>	96
3.4.2.1 Entre l'ouest et l'est de la zone	96
3.4.2.2 Le cas particulier du bois de Nyarafo	97
Chapitre 4	105
Discussion	105
1. Validité des résultats présentés	106
2. Héritabilité des allèles aux loci microsatellites	109
3. Populations naturelles subdivisées chez <i>G. palpalis gambiensis</i>	110
3.1 Génétique spatiale à l'échelle de l'aire de distribution	110
3.2 Génétique à l'échelle de deux zones de développement	115
3.2.1 A Samorogouan	115
3.2.2 A Sidéradougou	118
3.2.2.1 Entre Nyarafo à l'Ouest et Yéguéré à l'Est	119
3.2.2.2 Dans le bois de Nyarafo, un mélange de populations ?	124
4. La PCR comme outil diagnostique de la trypanosomose ?	128
5. Implications de ces résultats pour le contrôle des trypanosomoses animales africaines (TAA)	130
5.1 Stratégies de lutte : contrôle et éradication des vecteurs	130
5.2 Comportement vis-à-vis des leurres	132
5.3 Manipulation génétique des vecteurs	133
6. Extension à d'autres espèces	134
Conclusion et perspectives	137
Bibliographie	140
Annexes	162
Annexe 1 : Couples d'amorces PCR disponibles au CIRDES	163
Annexe 2 : Protocole PCR pour la caractérisation des trypanosomes	164
Annexe 3 : Protocole PCR pour les analyses génétiques	165
Annexe 4 : Protocole de révélation du polymorphisme de l'ADN microsatellite	166
Annexe 5 : Génotypes des individus de l'insectarium	167
Annexe 6 : Résultats de l'analyse morphométrique	168
Annexe 7 : Matrice des Fst	170
Annexe 8 : Liste des publications dans des revues à comité de lecture	171
Annexe 9 : Solano et al., Acta tropica, 1997	172
Annexe 10 : Solano et al., Rev. Elev. Méd. vét. pays Trop., 1997	179
Annexe 11 : Lefrançois et al., Molecular Ecology, 1998	185
Annexe 12 : Solano et al., Rev. Elev. Méd. vét. pays Trop., 1997	194
Annexe 13 : Solano et al., Medical and Veterinary Entomology, 1996	200
Annexe 14 : Liste des abréviations	205



Avant-Propos

Les trypanosomes pathogènes ont dans la plupart des cas un cycle hétéroxène car ils passent par un insecte vecteur avant d'infecter un hôte mammifère.

Dans les cycles parasitaires impliquant plus d'un hôte, on distingue en général un hôte intermédiaire et un hôte définitif. L'hôte intermédiaire est en principe celui qui assure une phase de multiplication au parasite (c'est dans beaucoup de cas un invertébré), avant que ce dernier n'aille infecter l'hôte définitif (souvent vertébré), ce dernier abritant par définition la reproduction sexuée des parasites.

Or, chez les trypanosomes (en l'occurrence), il est difficile de savoir si la reproduction sexuée existe réellement dans la nature et, le cas échéant, la fréquence avec laquelle elle se produit (Tibayrenc *et al.*, 1990) et l'hôte chez lequel elle se réalise. Il a été montré expérimentalement qu'elle pouvait avoir lieu chez la glossine (Jenni *et al.*, 1986 ; Gibson, 1989) qui pourrait donc être considérée comme hôte définitif (puisqu'elle semble abriter la reproduction sexuée). Cependant, cette dernière peut aussi être vue comme un ectoparasite puisqu'elle est sous la dépendance énergétique de l'hôte à qui elle va inoculer (ou prélever) les trypanosomes. Par convention, nous utiliserons uniquement le terme de vecteur pour la glossine : un vecteur est « un arthropode hématophage qui assure la transmission biologique (ou mécanique) active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré » (Rodhain & Perez, 1985).

Pour les glossines, afin d'éviter les lourdeurs d'écriture, nous utiliserons le terme « taxon » pour nommer deux niveaux systématiques, au lieu de détailler espèce et sous-espèce (par exemple, « les deux taxons *Glossina palpalis gambiensis* et *G. tachinoides* »).

Pour les trypanosomes, étant donnée la difficulté d'appliquer les concepts classiques de l'espèce, nous n'emploierons pas le terme de sous-espèce ; on qualifiera les divisions infraspécifiques à l'aide des termes : groupes taxonomiques, taxons, groupes, ou types (exemple *T. congolense* type savane ; le groupe Forêt de *T. congolense*).

Nous utiliserons le terme de trypanosomose dans le texte, en accord avec la « Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases » (SNOAPAD) (Veterinary Parasitology 1988, 29, 299-326).

Introduction

Les glossines ou mouches tsé-tsé (Diptera : Glossinidae) sont des insectes qui transmettent les trypanosomes (Kinetoplastida : Trypanosomatidae), protozoaires parasites flagellés responsables des trypanosomoses animales (ou « nagana ») et de la trypanosomose humaine ou « maladie du sommeil », en Afrique intertropicale. Ces maladies ont un impact considérable sur le développement économique de cette zone du monde. La trypanosomose animale africaine (TAA) affecte principalement les espèces domestiques, comme le zébu (*Bos indicus*) ou les petits ruminants (ovins, caprins), mais aussi les équins et les porcins.

Les parasites se développent de manière principalement cyclique chez la glossine, mais certains d'entre eux sont aussi transmis de manière mécanique par les glossines ou d'autres insectes piqueurs (taons, stomoxes...). Après avoir prélevé, lors du repas sanguin, des trypanosomes chez l'hôte vertébré et permis leur développement dans son organisme, l'insecte vecteur va les inoculer à une nouvelle victime. Il ne semble pas exister de spécificité stricte d'un taxon donné de parasite pour une espèce ou sous-espèce de glossine, mais différents facteurs, biotiques ou abiotiques, peuvent influencer sur la capacité d'une mouche à transmettre le parasite, qui finalement, conditionnera l'apparition, la pérennité, et l'importance économique de l'enzootie.

La lutte contre les trypanosomoses a longtemps reposé sur des méthodes non écologiques (épandage de DDT, «bush-clearing») avec pour but l'éradication des vecteurs. De plus en plus, on tend vers une maîtrise stratégique de la maladie par le contrôle des populations de tsé-tsé, en abaissant leur densité de manière à obtenir un seuil de transmission acceptable, grâce à l'emploi de méthodes non polluantes combinant des leurres vivants (animaux aspergés de produit insecticide) et artificiels (écrans de tissus imprégnés).

Toutefois ces méthodes de lutte, pour être efficaces et économiquement supportables, doivent être justement ciblées. Ceci implique une connaissance approfondie de l'épidémiologie de la maladie, donc de la biologie et de l'écologie des glossines, des parasites, de leurs interactions, et des interactions de ce système pathogène avec son environnement. Développés très récemment, les outils modernes d'analyse spatiale devraient permettre d'alléger le lourd dispositif nécessaire à la mise en place d'enquêtes entomologiques et épidémiologiques. Ces outils (Système d'Information Géographique) autorisent de manière unique la mise en relation des couches d'information géographiques et non géographiques, en particulier les modifications de l'environnement, la distribution, l'abondance et la génétique des vecteurs, dans le but d'identifier de

manière précise les zones à risque de transmission et les décisions de lutte les plus appropriées.

Parallèlement, depuis ces dernières années, le développement des outils de la biologie moléculaire, en particulier la PCR, autorise la détection et l'identification efficace de l'infection; cette technique a, de plus, permis d'affiner la classification des trypanosomes, en faisant « éclater » certaines espèces en plusieurs taxons dont l'épidémiologie est susceptible de différer. En revanche, les connaissances sur les vecteurs montrent beaucoup de lacunes, certainement à cause du manque d'outils adaptés à l'étude de la variabilité génétique des vecteurs. Il semblait donc nécessaire, et c'est l'objectif de ce travail :

- de développer un outil adapté à l'étude de la variabilité génétique des populations de glossines, ayant le potentiel de déceler une structuration de populations intra-taxon,
- d'observer les conséquences de cette structuration sur l'épidémiologie de la trypanosomose animale africaine sur le terrain, en l'occurrence au Burkina Faso.

Nous avons choisi de développer les marqueurs microsatellites, qui n'avaient jamais été évalués chez les glossines : ces séquences d'ADN se montrent en effet très polymorphes chez d'autres organismes et semblent constituer un outil de choix. Nous avons voulu commencer par étudier *Glossina palpalis* s.l., espèce riveraine d'Afrique de l'Ouest, car ce taxon est vecteur des trypanosomoses humaine et animale, et certaines populations relictées semblent pouvoir se maintenir après l'application des mesures alternatives de lutte classiquement mises en oeuvre, notamment au Burkina Faso.

Après une brève présentation des principaux acteurs intervenant dans la trypanosomose, en insistant sur les récents apports des outils moléculaires aussi bien pour la caractérisation des parasites que des vecteurs, nous décrirons les populations étudiées et les méthodes d'analyse choisies; les résultats des analyses génétiques seront exposés, ainsi que les données épidémiologiques recueillies, notamment celles concernant les hôtes principaux des glossines et l'identification des trypanosomes. Ces résultats seront discutés en relation avec les connaissances actuelles sur l'épidémiologie et le contrôle de la trypanosomose animale africaine.

Chapitre 1 :

Etat des Connaissances

1. LES TRYPANOSOMOSES EN AFRIQUE : UN PROBLEME

D'ACTUALITE

"In some considerable measure, Africa's lack of progress ... may be attributed to the tsetse flies."

Buxton P.A. (1955). The natural history of tsetse flies. London School of Hygiene and Tropical Medicine, Memoir 10, 816 pp

Les trypanosomoses animales représentent la première maladie à transmission vectorielle chez le bétail en Afrique subsaharienne. Elles entraînent des pertes directes dans les cheptels par mortalité, morbidité, faible croissance, infertilité, avortements, faible force de traction des animaux ; ces facteurs accentuent la pauvreté des agropasteurs et la malnutrition protéino-énergétique, déjà endémique. On estime entre 500 millions et plus d'1 milliard de dollars les pertes directes résultant de la trypanosomose (Winrock, 1992 ; Kuzoé 1993 ; FAO, 1994), ce à quoi il faut ajouter les pertes indirectes, souvent difficiles à quantifier (Jankhe *et al.*, 1988 ; Cuisance, 1994). Le manque à gagner équivaut selon les experts à 0.5 millions de tonnes de viande et 1.6 millions de tonnes de lait (de Haan & Bekure, 1991). 26% de la viande et 19% du lait produits en Afrique sub-saharienne émanent de régions envahies par les tsé-tsé (in Swallow, PAAT position paper, com. pers.).

La maladie du sommeil chez l'homme se traduit par 25000 nouveaux cas par an et on estime à 50 millions le nombre de personnes exposées à la maladie (Frézil & Cuisance, 1994 ; Cattand, 1994). 300 000 cas de maladie du sommeil ont été annoncés en Afrique pour l'année 1995 selon les dernières statistiques officielles (Swallow, PAAT position paper).

En Afrique de l'Ouest, des périmètres situés en zone semi-aride ou en zone subhumide ont de grandes potentialités mais sont infestées de glossines ; il en résulte une sous-utilisation des ressources naturelles. Sans la présence de la mouche tsé-tsé, il serait possible d'élever davantage de bovins et de valoriser les pâturages naturels de cette zone. On assiste de plus dans beaucoup de zones rurales à une résurgence de la maladie du sommeil. Ces considérations justifient une lutte contre la trypanosomose visant un assainissement durable du milieu et une mise en valeur des terres. Cette lutte stratégique s'inscrit dans la durée, ne vise pas une éradication mais un contrôle des populations de vecteurs avec une implication croissante des communautés rurales et du secteur privé, dans des zones ayant été définies comme prioritaires du fait de leur potentiel agro-pastoral (Touré & Mortelmans, 1996).

2. LES ACTEURS, LE SYSTEME PATHOGENE

Les trypanosomoses mettent en jeu trois types d'organismes vivants : les hôtes mammifères, « victimes » (mais aussi réservoirs), les parasites, agents étiologiques de la maladie, et les glossines, vecteurs cycliques, voire mécaniques, mais aussi réservoirs de ces derniers (Cuisance, 1998).

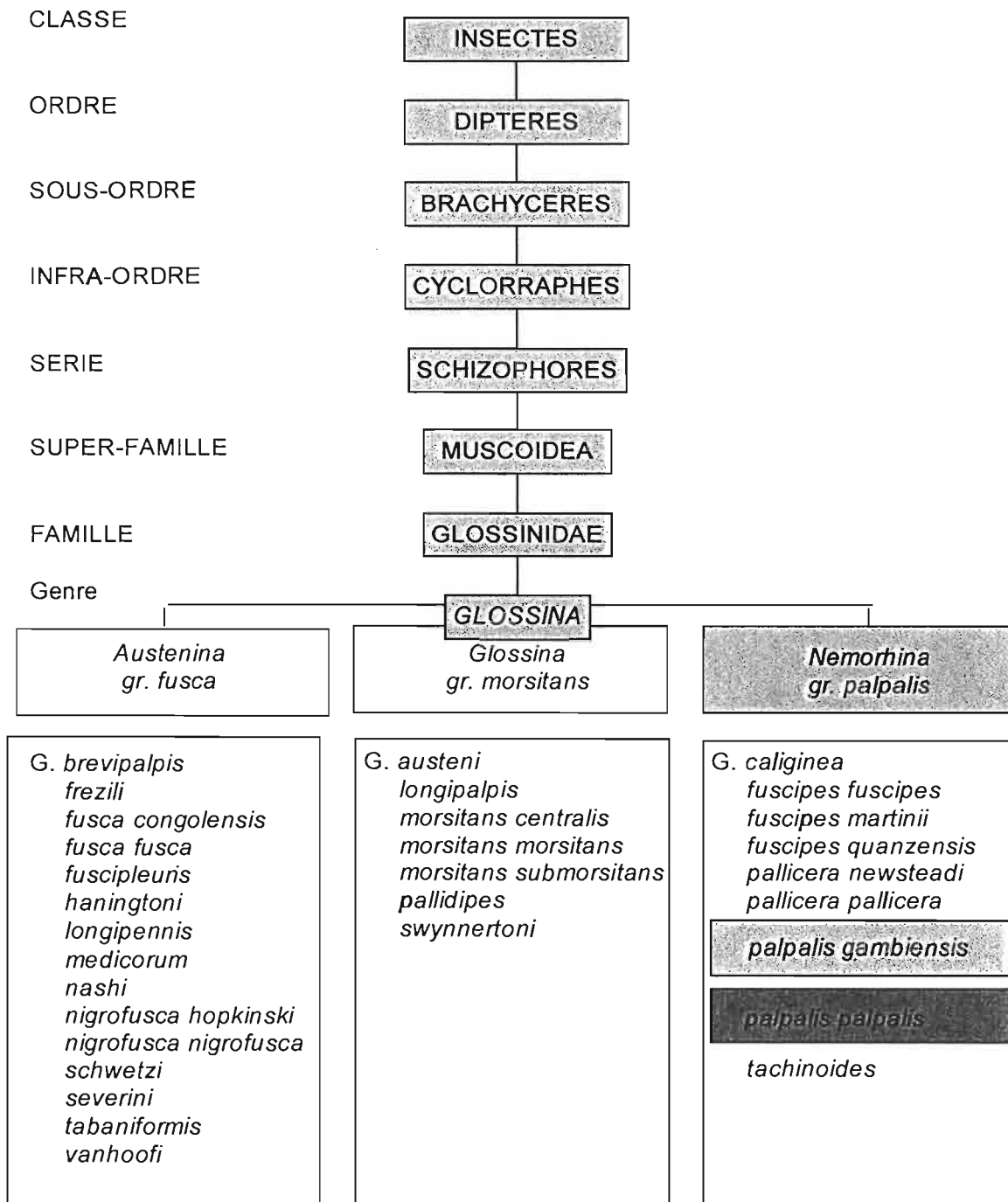
2.1 Les glossines

Tous ces animaux amaigris, ces squelettes ambulants ne sont pas des tuberculeux...; ce sont des victimes de la Glossina palpalis... Il est de toute évidence que le trypanosome est le plus terrible ennemi de l'élevage. Bouffard, médecin-major de 2^e classe : Rapport sur le fonctionnement du laboratoire vaccino-gène et de biologie de Bamako. P 41-67. In Recueil des "Supplément au journal officiel" de l'Afrique Occidentale Française (1912). Rapports de mission - Etudes techniques. Imprimerie du gouvernement général de Gorée.

2.1.1 Présentation

Les glossines, ou mouches tsé-tsé, sont les insectes vecteurs impliqués dans la transmission cyclique des trypanosomoses animales et humaines. Ce sont des Diptères, Brachycères, Cyclorraphes, de la famille des *Glossinidae* qui ne comprend qu'un seul genre (*Glossina*, Wiedemann 1830). Il est lui-même divisé en trois sous-genres (ou « groupes ») sur la base de critères morphologiques (pièces génitales) et écologiques : Sous-genre *Nemorhina* Robineau-Desvoidy, 1830 (groupe *palpalis*, qui comprend l'espèce sujet de ce travail), sous-genre *Glossina* Zumpt, 1935 (groupe *morsitans*), sous-genre *Austenina* Townsend, 1921 (groupe *fusca*) (voir Figure 1). Cet insecte se présente sous la forme d'une mouche allongée, robuste, avec les ailes se croisant typiquement en « lames de ciseaux » dorsalement ; elles sont généralement de couleur brune à noire, mais jamais métallique, et mesurent de 6 à 16 mm (par exemple, *Glossina palpalis* Robineau-Desvoidy 1830, mesure entre 10 et 12 mm et pèse environ 45 mg). Contrairement à d'autres diptères (moustiques, taons), les deux sexes sont hématophages chez les glossines.

Figure 1 : La classification zoologique des glossines



Source : OMS, 1986 modifié

Lors de la piqure (qui dure 20 à 30 secondes), la glossine injecte une salive anticoagulante provenant des deux glandes salivaires et aspire le sang qui est dirigé dans l'intestin moyen après passage par l'œsophage, le jabot, et le proventricule. L'intestin moyen intervient non seulement dans la digestion du repas de sang mais aussi dans la production de moyens de défense de l'insecte contre les trypanosomes présents (production d'agglutinines ou de lectines). C'est aussi à ce niveau que l'on note la présence d'un amas de cellules géantes (ou mycétome) comprenant des symbiotes appelés « Rickettsia-like organisms ». Le rôle de ces organismes reste encore à être précisément défini, mais on sait qu'ils interviennent dans la fertilité (production de vitamine B) et contribuent à l'installation des trypanosomes dans l'intestin moyen, et à leur maturation (Maudlin & Ellis, 1985 ; Maudlin & Welburn, 1987, 1988).

Le corps de la glossine est formé de la tête, qui comprend les pièces buccales (dont l'ensemble est appelé proboscis) adaptées à la piqure ; le thorax porte les ailes (une paire) et les pattes (trois paires), et l'abdomen se termine par les organes génitaux. Ceux-ci ont une grande valeur taxonomique, car ils permettent de séparer *G. palpalis gambiensis* Van der Planck 1949, de la sous-espèce voisine *G. p. palpalis* Robineau-Desvoidy 1830, par l'anatomie des forcipules inférieurs (ou paramères) chez le mâle.

2.1.2 Répartition géographique

Les 31 espèces et sous-espèces de glossines actuellement reconnues sont exclusivement africaines et continentales, avec deux exceptions : l'île de Zanzibar (mais l'éradication des glossines de cette île fut obtenue en 1997, I.A.E.A.) et une poche en Arabie Saoudite. Elles sont réparties entre 15° de latitude Nord et 20° Sud, mais cette dernière limite s'infléchit le long de la côte orientale de l'Afrique jusqu'à 30° Sud (Cuisance, 1998). De manière générale, les glossines sont limitées dans leur distribution par :

- un déficit hygrométrique important associé à de fortes températures (Sahara au Nord)
- de trop faibles températures (au Sud)
- l'altitude : elles sont absentes au-dessus de 2000 m ; ce dernier facteur semble toutefois susceptible d'évoluer, car des glossines ont été récemment capturées à cette altitude (Cuisance, com. pers.)

On peut aussi ajouter comme facteurs limitants majeurs de la répartition des tsé-tsé, le couvert végétal et la présence d'hôtes nourriciers.

G. palpalis s.l. appartient au sous-genre *Nemorhina*, qui renferme 9 espèces ou sous-espèces riveraines d'Afrique occidentale, centrale et orientale. Elle est inféodée à la végétation bordant les cours d'eau ou aux zones pré-forestières ou forestières. Dans cette espèce, on distingue deux sous-espèces vicariantes :

- *G. p. palpalis* vit dans les zones humides et forestières d'Afrique centrale et occidentale, et dans les plantations de café et de cacao.

- *G. palpalis gambiensis*, sujet de ce travail, vit le long des cours d'eau bordant des savanes plus sèches, exclusivement en Afrique occidentale, et sa répartition géographique va du Sénégal à l'ouest au Bénin à l'est.

2.1.3 Biologie et écologie de *Glossina palpalis gambiensis*

Rappelons tout d'abord que c'est en 1830 que Robineau-Desvoidy identifie pour la première fois cette glossine et lui donne le nom de *Nemorhina palpalis*. D'après Machado (1954), le nom *Glossina palpalis* est une convention car aucun néotype n'a été désigné pour remplacer le type perdu (Hegh, 1929). Newstead (1910) distingue *G. palpalis* de *G. fuscipes* ; mais Vanderplanck (1949) lui, divise l'espèce *G. palpalis* en 5 taxons : *G. palpalis gambiensis*, *G. p. palpalis*, *G. fuscipes quanzensis*, *G. fuscipes martinii*, et *G. f. fuscipes*. Mais c'est à Machado, 1954, que l'on doit l'actuelle classification, les taxons *G. palpalis* et *G. fuscipes* étant érigés au rang de véritables espèces polytypiques : l'espèce *G. palpalis* comprend les deux sous espèces *G.p. palpalis* et *G. palpalis gambiensis*, et *G. fuscipes* est divisée en 3 sous-espèces citées ci-dessus.

2.1.3.1 Le biotope

Le milieu de vie (l'ambit de Jackson, 1941) de *G. palpalis gambiensis* est constitué essentiellement des galeries forestières et forêts reliques qui par leur végétation amortissent les variations macroclimatiques. Il est caractérisé par la présence permanente ou temporaire d'eau courante, stagnante, ou souterraine, qui entretient l'humidité atmosphérique et celle du sol. L'humidité atmosphérique à une température donnée est liée au taux de survie chez les glossines (Buxton, 1955). Toutefois, Nash (1948) pense que « il est assez faux de considérer que *G. palpalis* (s.l.) a besoin de beaucoup d'humidité. » Cette espèce est donc considérée comme capable de s'adapter à une assez large gamme de conditions éco-climatiques. On trouve d'ailleurs *G. palpalis gambiensis* dans des biotopes atypiques, les « niayes » du Sénégal (Touré, 1971), dépressions à fond humide de type mangrove, situées près de la côte Atlantique, et occupées par une végétation dense associée à des palmiers à huile.

En zone soudanienne, dans les galeries forestières 90% des *G. palpalis gambiensis* sont localisées transversalement à moins de 1.50 m du cours d'eau durant la journée et de 3 m durant la nuit (Challier, 1982).

G. palpalis gambiensis dépose ses larves en général dans la galerie sous les troncs de bois morts ou entre les racines aériennes, dans les milieux où l'humidité relative avoisine 70%, donc toujours très proches de l'eau, ce qui les rend sensibles aux crues des rivières. On observe des variations saisonnières avec une concentration des gîtes de ponte en milieu ombragé en saison sèche et une plus grande dispersion en saison des pluies (Challier, 1973).

2.1.3.2 La dispersion

Les mouvements des glossines sont généralement considérés comme limités, en particulier ceux des glossines riveraines du groupe *palpalis*. Ces déplacements ont pour cause essentielle l'alimentation, la recherche d'un lieu de repos favorable et, pour les mâles, la recherche des femelles (in Cuisance, 1998). Ces déplacements se font en « va et vient » en amont ou en aval le long de la galerie, par vols linéaires (Cuisance *et al.*, 1985b). En saison des pluies, ils peuvent devenir radiaires, et assez importants (Nash & Page, 1953 ; Politzar *et al.*, 1980), les glossines pouvant alors passer d'un réseau hydrographique à un autre sur 2 km de distance (Cuisance & Février, 1983). Plusieurs expériences de marquage-lâcher-recapture dans divers biotopes ont suggéré que la moyenne de la population ne se déplace que sur 200-300 m (Cuisance *et al.*, 1985b). Toutefois, certains individus peuvent franchir de grandes distances (jusqu'à 22 km en 5 jours pour *G. palpalis gambiensis* au Burkina Faso, Cuisance *et al.*, 1985b). Buxton, 1955, signale que « *G. palpalis* (NDLA : en réalité *G. fuscipes*) peut traverser 3.5 miles de clearing et réenvahir des zones traitées ». Dans les îlots forestiers, ces déplacements seront plus réduits (150 à 1500 mètres, Laveissière, 1986). L'importance épidémiologique de ces mouvements est grande, puisqu'il a été constaté des réinvasions de zones traitées, confirmant les bonnes capacités de déplacements de *G.p. gambiensis* même dans des zones défavorables (Cuisance *et al.*, 1978).

2.1.3.3 La gamme d'hôtes nourriciers

G. palpalis s.l. est aussi considérée comme une glossine opportuniste quant à son spectre d'hôtes nourriciers (Weitz, 1963). A l'instar de *G. tachinoides* et de *G. fuscipes*, aussi du sous-genre *Nemorhina* et caractérisées par un éclectisme important, elle se nourrit sur l'homme et les hôtes domestiques et sauvages (Mulligan, 1970). En zone de forêt, *G. palpalis* peut se nourrir en grande partie sur l'homme, ce qui se traduit en saison sèche lorsque les points d'eau sont restreints, par la notion de « close personal man-fly contact », amenant un grand danger de maladie du sommeil (Nash & Page, 1953).

Mais elle peut aussi piquer les animaux domestiques présents dans les villages lors de ses incursions fréquentes (Laveissière *et al.*, 1986 ; Morlais 1998). En zone de savane, les contacts de *G. palpalis gambiensis* avec l'homme sont moins fréquents et c'est là qu'apparaît son opportunisme : dans une synthèse récente, Clausen *et al.* (1998) analysent les repas de sang de *G. palpalis* sur plusieurs pays et trouvent les résultats suivants : 44% de repas pris sur suidés, 18% sur primates (homme inclus), 18% sur ruminants, 10% sur reptiles et 7% sur autres mammifères. Mais ce type de synthèse, s'il confirme l'opportunisme de l'espèce dans son ensemble, ne peut pas prendre en compte la diversité des situations locales rencontrées (notamment en terme de faune accessible pour les tsé-tsé) et des éventuelles populations génétiquement différentes de glossines. On sait en effet qu'au Burkina Faso, dans la zone de Samorogouan par exemple, 60% des repas de sang analysés montrent que *G. palpalis gambiensis* s'est nourrie sur varan (Bauer *et al.*, 1995). En République Centrafricaine, Gouteux *et al.* (1996) trouvent 83% des repas pris sur reptiles en saison sèche (chez *G. f. fuscipes*). On comprend bien les différences épidémiologiques entraînées par de tels comportements et la nécessité de coupler ces études avec des études génétiques des populations concernées.

2.1.3.4 Cycle de vie

La presque totalité des femelles est fécondée juste après l'éclosion avant la prise du premier repas de sang. En général, les femelles ne s'accouplent qu'une fois. Elles sont larvipares et vont donc déposer (tous les 9 à 10 jours) une larve L3 dans un lieu favorable, le développement des stades larvaires 1 à 3 s'étant accompli dans l'utérus de la mère. Une fois sur le sol, la larve va être active quelques minutes pour s'enfouir, à l'ombre, dans un sol généralement argilo-sableux entre 2 et 8 cm de profondeur. Elle s'immobilise et se transforme en puppe (les glossines sont des insectes pupipares). Dans ce puparium vont se produire les métamorphoses nécessaires à l'apparition du quatrième stade larvaire puis de l'adulte. Cet adulte va émerger au bout de 20 à 80 jours (en moyenne 30 jours à 25°C) par une fente circulaire (Diptères Cyclorrhaphes). La nouvelle mouche adulte qui prend son envol est qualifiée de ténérale (*tener* = mou) et est exempte de trypanosomes. Laveissière (1978), en Côte d'Ivoire chez *G. tachinoides*, estime à environ 10% la proportion de glossines ténérales dans une population stable.

La durée de vie d'une glossine adulte dans la nature varie selon la saison, l'espèce, et le lieu. Elle est optimale en saison des pluies. Des longévités maximales de 7 à 9 mois ont été enregistrées pour *G. palpalis* mais elles sont exceptionnelles (Cuisance, 1998). Il paraît raisonnable d'estimer aux environs d'un mois la durée de vie d'un mâle et deux à trois mois celle d'une femelle en moyenne, les femelles vivant plus longtemps que les mâles.

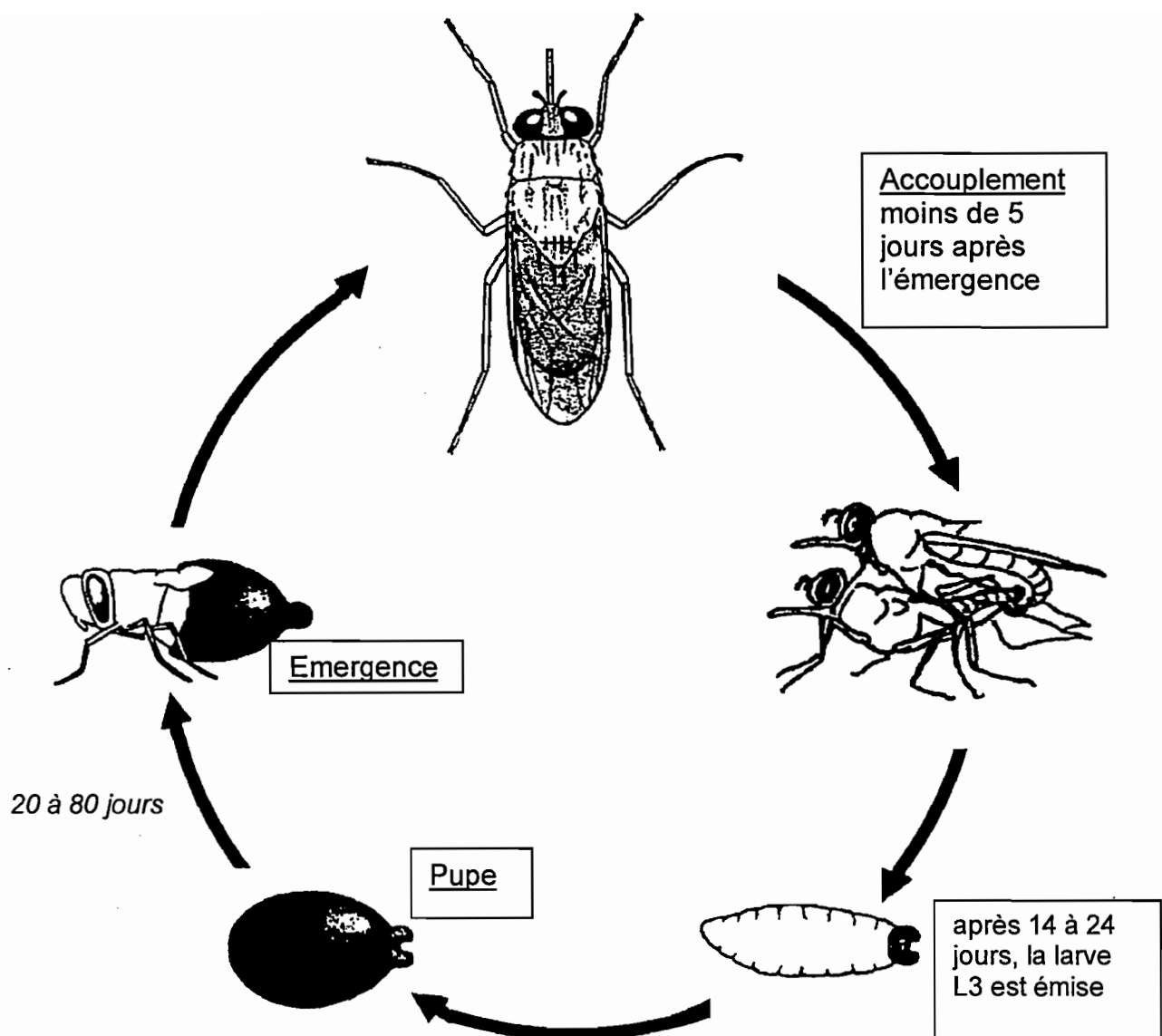


Figure 2 : Cycle de vie de la glossine
(d'après Cuisance, 1998 ; modifié.)

Une femelle, au cours de sa vie, donnera donc naissance dans la nature à moins d'une dizaine de descendants ; ces insectes diffèrent de bien d'autres diptères vecteurs (moustiques, simuliés...) par leur long cycle de développement et leur taux de reproduction très bas.

2.1.4 Aptitude des glossines à s'infecter

La glossine adulte qui éclôt est exempte de trypanosomes ; elle va acquérir ceux-ci en se nourrissant sur un hôte porteur. La glossine peut s'infecter avec un seul trypanosome (Maudlin & Welburn, 1989) et rester infectante toute sa vie (Cuisance, 1998). Le trypanosome ingéré va donc se retrouver dans l'intestin de la glossine (où seuls les trypanosomes pathogènes de type *Nannomonas* et *Trypanozoon* survivront) au contact d'un nouveau milieu. Des interactions entre le parasite et le vecteur vont conditionner l'installation ou non de l'infection, parmi celles-ci :

- les lectines, glycoprotéines sécrétées par les cellules de l'intestin moyen à la suite d'un repas de sang, agglutinent les trypanosomes et inhibent de ce fait l'installation de ceux-ci dans l'intestin (Maudlin & Welburn, 1987).
- la présence de R.L.O. (Rickettsia-like Organisms), *a priori* dans toutes les espèces (Welburn & Gibson, 1989) mais seulement chez certains individus ou certaines populations. Ces organismes symbiotiques (exemple *Wolbachia spp.*) secrètent des enzymes (endochitinase...), qui en hydrolysant la chitine libèrent de la D-glucosamine qui inhibe l'expression trypanolytique des lectines intestinales et donc favorise la réceptivité intestinale de la glossine aux trypanosomes. Ces R.L.O. sont transmis par la mère à sa descendance par voie cytoplasmique (Maudlin & Ellis, 1985).

D'autres interactions plus fines existent, aussi au niveau de la maturation des trypanosomes (voir Maudlin & Welburn, 1994) mais beaucoup de ces mécanismes sont encore mal connus. L'aptitude des glossines à acquérir l'infection est le sujet d'arguments contradictoires qu'il nous a paru intéressant de souligner :

En simplifiant, deux parties en présence:

1. l'une affirme que les glossines ne s'infectent qu'à leur premier repas de sang et que seul celui-ci conditionne ou pas l'infection de la glossine pendant toute sa vie;
2. l'autre pense que les glossines peuvent s'infecter durant toute leur vie à chaque repas pris.

1. Les premiers travaux de Van Hoof *et al.*, 1937 montrent que des mouches sont plus facilement infectées lors du premier repas de sang par *Trypanosoma brucei* (voir aussi

Buxton, 1955 et Wijers, 1958). Il semble en être de même pour *Trypanosoma congolense* (Distelmans *et al.*, 1982).

En général, dans toutes les infections expérimentales, pour que les glossines s'infectent, on donne le repas infectant les premiers jours (J1-J2) après l'émergence (Maudlin & Welburn, 1987), pour que les chances d'infection soient augmentées. Cette plus grande susceptibilité à l'infection des mouches ténérales s'expliquerait par le fait qu'elles ne produisent pas de lectines intestinales, dont la production commence juste après la prise d'un repas de sang (Welburn & Maudlin, 1989). De plus, pendant les périodes larvaires et pupales il y a production de D-glucosamine (inhibant les lectines intestinales) chez les glossines possédant des R.L.O., qui seraient de ce fait plus réceptives à l'infection lors du premier repas de sang (in Cuisance, 1998).

Certains travaux expérimentaux décrivent une diminution de l'infection lorsque l'âge augmente, pour *T. brucei* (Jordan, 1976 ; Welburn & Maudlin, 1989) et pour *T. congolense* (Moloo & Shaw, 1989). Kazadi *et al.*, 1996 observent expérimentalement qu'un premier repas non infectant abaisse les chances d'infection par un deuxième repas infectant, mais avec des nuances selon les espèces de glossines.

Woolhouse *et al.* (1996) pensent que les mouches n'acquièrent une infection durable qu'à une seule occasion (ou pendant une période très courte), et que cette seule infection peut comprendre plusieurs types ou espèces de trypanosomes, reflétant l'infection multiple de l'hôte mammifère.

2. Squire (1954) avec des données de terrain en Sierra Leone, trouve que les taux d'infection de *Trypanosoma vivax* et *T. congolense* chez *G. palpalis* s.l. varient avec la saison dans tous les groupes d'âge (taux plus élevés en saison des pluies), et que les jeunes mouches ne sont pratiquement pas infectées. Il en conclut que les glossines (au moins certaines espèces) sont infectables à tous les âges avec ces deux espèces de trypanosomes.

Woolhouse *et al.* (1993) en analysant les données sur *G. pallidipes*, trouvent que le taux d'infection augmente entre les catégories 4 et 5 d'âge ovarien pour *T. congolense*, et en déduisent que des mouches peuvent s'infecter entre 28 et 38 jours.

Gibson & Ferris (1992) arrivent à "superinfecter" des glossines en leur donnant des repas contenant successivement *T. brucei* puis *T. congolense* et montrent qu'une mouche peut donc acquérir une infection mixte après son premier repas.

McNamara *et al.* (1995) se basant sur le fort taux d'infections mixtes à *T. congolense* de différents types (« savane », « forêt » et « kilifi ») trouvés dans l'intestin des glossines (*G. palpalis* en Côte d'Ivoire), trouvent qu'il y a discordance entre le fait qu'elles ne puissent s'infecter qu'une fois et ce que l'on connaît des différences génétiques et comportementales

entre ces 3 groupes. Ils pensent donc plutôt que les mouches peuvent être infectées de manière séquentielle, au moins avec *T. congolense*.

Selon Woolhouse *et al.* (1996), environ 1% des repas sanguins sont infectants et les mouches peuvent s'infecter jusqu'à l'âge de 40 jours.

Les données de Leak & Rowlands (1996) suggèrent une acquisition continue des infections matures, augmentant avec l'âge, pour au moins 3 espèces avec *T. congolense* : *G. palpalis*, *G. tachinoides*, et *G. tabaniformis*.

Pour synthétiser ces arguments, nous donnerons la vision de Dale *et al.* (1995a), selon laquelle la variation du temps de maturation est un facteur très important pour interpréter les courbes âge-prévalence (et implique des facteurs dont le rôle n'est pas encore élucidé : niveau de parasitémie de l'hôte, souches de trypanosomes, composition du sang de l'hôte...). Selon eux des prévalences de *Trypanozoon* ou de *T. congolense* semblant augmenter avec l'âge sur le terrain reflètent :

1. une susceptibilité à tous les âges, ou
2. une susceptibilité uniquement des mouches jeunes mais une variation du temps de maturation.



Les mouches tsé-tsé sont des insectes Diptères classés dans un genre, *Glossina*. Elles sont réparties en Afrique subsaharienne où elles transmettent les trypanosomoses humaines et animales en prélevant des trypanosomes lors du repas sanguin qu'elles effectuent chez divers hôtes vertébrés. Les femelles s'accouplent en général une seule fois au cours de leur vie. La larve se développe à l'abri dans le corps de la femelle, qui donne naissance à une dizaine de descendants pendant ses deux à trois mois de vie dans la nature. *Glossina palpalis gambiensis* (sous-genre *Nemorhina*), sujet de ce travail, est une glossine dépendant étroitement des cours d'eau, et est répartie en Afrique occidentale entre le Sénégal et le Bénin. Elle est caractérisée par son rôle potentiel de vecteur des trypanosomoses, son éclectisme quant au choix des hôtes nourriciers. La majorité des individus se disperse peu (moins d'un kilomètre), mais certains d'entre eux sont retrouvés à plus de 10 kilomètres de leur origine ; ces déplacements se font principalement de manière linéaire le long du cours d'eau, secondairement en direction radiaire.

2.2 Les hôtes mammifères

Potentiellement tous les mammifères domestiques peuvent être atteints de trypanosomose, et peuvent manifester des signes cliniques et une diminution de productivité, pouvant se traduire par la mort si la maladie n'est pas soignée. On distingue toutefois d'une part des races très sensibles à la maladie (bovins zébu, ovins Bali-Bali) et d'autre part les races autochtones (taurins *Bos taurus* : races Baoulés, N'Dama, Somba ; ovins « Djallonké » ; caprins : chèvre naine de Guinée) qualifiées de trypanotolérantes car elles peuvent survivre dans des zones où les races sensibles ne le pourraient pas.

La faune sauvage est également infectée par les trypanosomes, mais elle semble de manière générale bien tolérer le parasite ; cette caractéristique fait que l'on considère souvent le gibier comme un réservoir de trypanosomes humains et/ou animaux (Mehlitz, 1986) sans pour autant avoir démontré l'identité génétique des trypanosomes entre les différents compartiments des cycles.

L'homme enfin est aussi infecté, uniquement par *T. brucei* type *gambiense* en Afrique de l'ouest et type *rhodesiense* en Afrique de l'Est selon les notions classiques. Toutefois les techniques modernes d'identification remettent en cause ces subdivisions (Truc & Tibayrenc, 1992; Stevens *et al.*, 1994). Il faut noter que l'homme possède des facteurs lytiques (lipoprotéines de haute densité, par exemple) lui permettant d'éliminer les autres trypanosomes (*T. congolense*, *T. vivax*, *T. b. brucei*). Toutefois, il peut arriver que certains de ces taxons soient identifiés chez l'homme (*T. vivax*, Cuisance com. pers. ; *T. congolense*, Truc *et al.*, 1998).

Le traitement des trypanosomoses repose encore la plupart du temps sur des médicaments découverts depuis la première moitié du siècle (suramine, pentamidine, et dérivés arsenicaux), dont certains n'offrent pas les garanties de sécurité requises aujourd'hui (Atouguia & Costa, 1997). En matière de trypanosomose animale africaine, les trypanocides les plus couramment utilisés sont l'acéturate de diminazène (BérénilND, trypanocuratif) et le chlorure d'isométymidium (TrypamidiumND, trypanopréventif), mais de nombreux cas de résistances à ces produits ont été signalés (Authié, 1984 ; Clausen *et al.*, 1992 ; Geerts & Holmes 1998).

Concernant la maladie du sommeil, le traitement repose en première phase sur la pentamidine (pour les infections de type *gambiense*) et en phase tardive sur le melarsoprol, et DFMO (DL-a-difluoromethylornithine) (Atouguia et Costa, 1996), mais ces médicaments, en plus de leur toxicité, sont très coûteux et difficiles à se procurer pour les populations atteintes (notamment le DFMO).

2.3 Les trypanosomes

Les trypanosomes transmis cycliquement par les tsé-tsé et pathogènes pour les mammifères en Afrique subsaharienne se trouvent principalement dans trois sous-genres (Figure 3) : *Trypanozoon* Luhe, 1906, *Nannomonas* Hoare, 1964, et *Duttonella* Chalmers, 1918, sous-genres que l'on distingue à la fois par la morphologie au microscope chez l'hôte vertébré et la localisation chez la glossine (Lloyd & Johnson, 1924).

2.3.1 Les cycles de développement des trypanosomes chez le vecteur

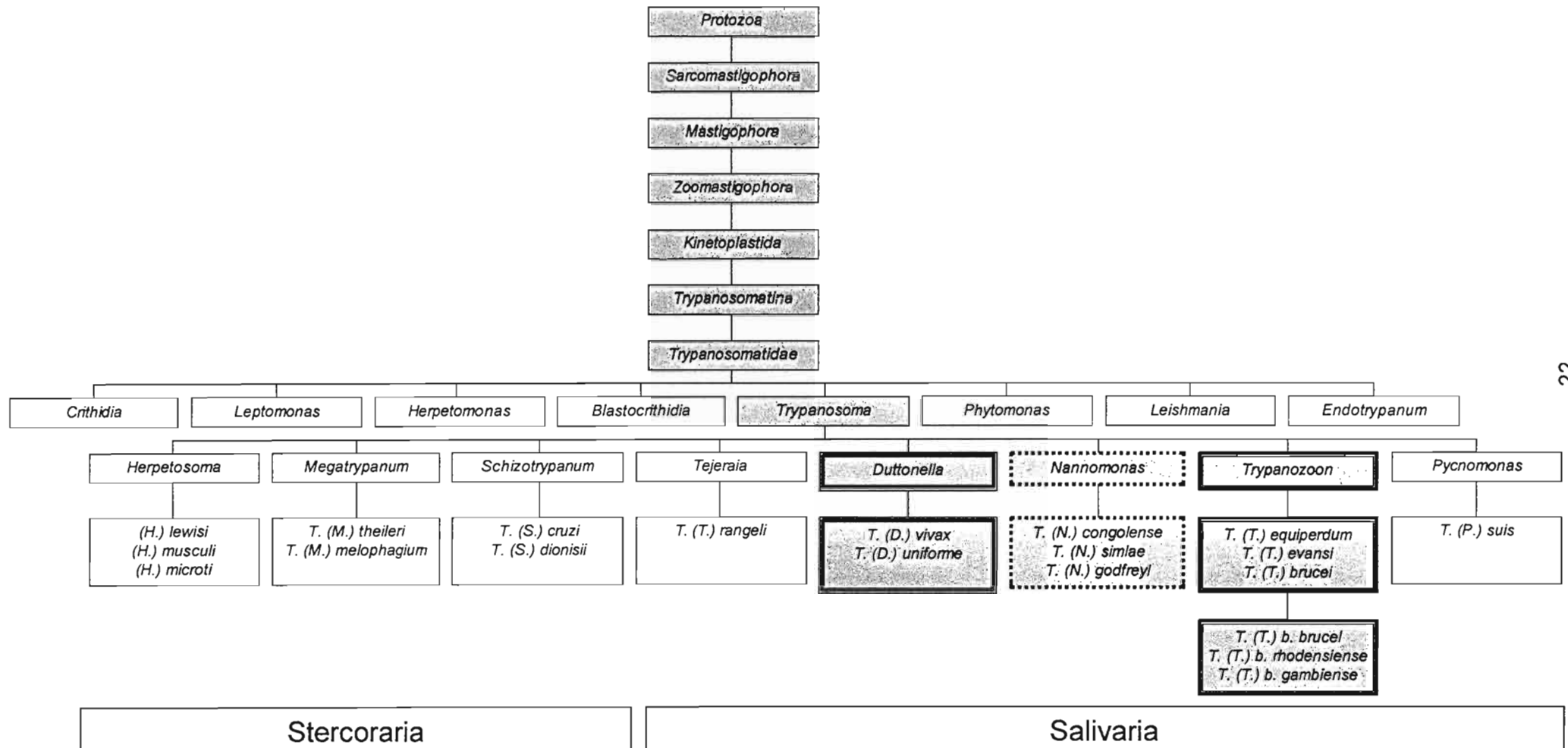
La glossine, lorsqu'elle prend son repas de sang chez un hôte mammifère infecté va, par la même occasion, prélever des trypanosomes. Un seul trypanosome suffit à infecter le diptère qui pourra rester infecté et infectant toute sa vie (Maudlin, 1989), sauf pour *Trypanosoma vivax*, dont l'infection peut disparaître (Djiteye *et al.*, 1992). La durée des cycles varie de 6 à 30 jours environ selon les trypanosomes.

Le cycle le plus simple est celui du sous-genre *Duttonella*, dans lequel *Trypanosoma vivax* (Zieman, 1905) est l'espèce la plus importante économiquement, et dont le développement est limité au proboscis : la glossine absorbe les trypomastigotes sanguins chez le mammifère ; ceux-ci vont soit passer dans l'intestin moyen où ils ne survivront pas, soit se fixer sur les parois du canal alimentaire, puis se multiplier dans le labre, s'en détacher et pénétrer dans l'hypopharynx où ils se transforment en trypomastigotes infectants. Le tout prend au maximum une dizaine de jours. Moloo *et al.* (1989), montrent aussi que le cycle pourrait être initié dans la région œsophagienne.

Les trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense* Broden, 1904, *Trypanosoma simiae* Bruce, 1912, *Trypanosoma godfreyi*, McNamara, 1994) suivent un trajet différent puisque leur cycle passe obligatoirement par l'intestin moyen, où se produit une phase de transformation et de multiplication intense. Ils gagnent ensuite, via la membrane péritrophique, l'œsophage, le pharynx, et le canal alimentaire, puis vont se fixer sur les parois du labre où ils se transforment en épimastigotes, ils pénètrent dans l'hypopharynx où ils deviennent des métatrypanosomes infectants prêts à être inoculés à un nouvel hôte ; la durée moyenne du cycle est de 14 jours mais peut aller jusqu'à plus de 40.

Dans l'espèce *Trypanosoma brucei* s.l. Dutton, 1902 les trypanosomes commencent par le même trajet (transformation et multiplication dans l'intestin moyen), mais remontent en passant par le proventricule où ils pourraient aussi se multiplier. Ils migrent ensuite dans

Figure 3 : Classification des Trypanosomatidae et plus particulièrement du genre *Trypanosoma*



D'après Hoare, 1972 ; Levine *et al.*, 1980 ; modifié

les pièces buccales où il ne se produit pas de transformation, pénètrent dans l'hypopharynx et atteignent les glandes salivaires où après une nouvelle phase de multiplication, ils se transforment en métatrypanosomes infectants ; ils peuvent à ce moment être transmis par la salive de la mouche à un autre hôte. Le sous-genre *Trypanozoon* comprend également *Trypanosoma evansi* Balbiani, 1888, trypanosome pathogène des camélidés principalement, et d'autres mammifères domestiques et sauvages, et *Trypanosoma equiperdum* Döfle, 1901, agent de la « dourine » chez les équidés, seul trypanosome transmis par voie sexuelle.

Rappelons qu'en dehors des trois sous-genres présentés ci-dessus appartenant à la section des *Salivaria*, il existe dans les zones occupées par les tsé-tsé une grande diversité de trypanosomes (dont certains de la section des *Stercoraria*, transmis par les déjections de leurs vecteurs); par exemple les « *T. grayi*-like », (Hoare 1972, Minter-Goedbloed 1993) parasitent les reptiles, mais passent aussi par l'intestin des glossines, d'autres, moins connus (*T. ingens*, Hoare 1972) seraient présents uniquement sur la faune sauvage, et bien d'autres existent encore.

2.3.2 Diagnostic

2.3.2.1 Chez la glossine

Il est important de connaître les taux d'infection chez les glossines, mais aussi l'identité des trypanosomes présents afin d'estimer le risque trypanosomien. La technique classique de dissection du proboscis, des glandes salivaires et de l'intestin moyen (Lloyd & Johnson, 1924) reste la plus utilisée sur le terrain; elle permet l'identification au microscope des trypanosomes au niveau du sous-genre selon leur localisation dans les organes de la glossine. Elle présente toutefois des limites importantes : en effet, la morphologie des trypanosomes chez la glossine étant très voisine dans les sous-genres, on se fie uniquement à la localisation des trypanosomes dans les organes de l'insecte :

- infection des pièces buccales uniquement : *Duttonella* (*T. vivax*)
- infection des pièces buccales et de l'intestin moyen : *Nannomonas* (*T. congolense* ou *T. simiae* ?)
- infection des glandes salivaires : *Trypanozoon* (*T. brucei* s.l.)
- infection de l'intestin moyen uniquement : infection immature non identifiée

La caractérisation ne peut donc aller au-delà du sous-genre, et lorsque des trypanosomes sont présents uniquement dans l'intestin, on ne peut rien en conclure, car il peut s'agir aussi de trypanosomes de reptiles. De même, si des trypanosomes sont présents simultanément dans l'intestin et dans le proboscis, on en déduit la présence de

Nannomonas alors qu'il peut s'agir d'une infection concomitante de *T. vivax* dans les pièces buccales et d'un autre trypanosome dans l'intestin moyen (McNamara & Ferris, 1991). De plus c'est une technique dont la sensibilité est faible, notamment pour détecter les pauci-infections. Des techniques parasitologiques plus sensibles existent pour déceler les trypanosomes chez la glossine (mise en culture des parasites, salivation provoquée sur lame) mais elles ne sont guère applicables sur le terrain.

2.3.2.2 Chez l'hôte mammifère

Nous n'entrerons pas dans les détails concernant toutes les techniques de diagnostic existantes à l'heure actuelle, qu'elles soient directes ou indirectes ; des revues récentes de ces techniques de détection ont déjà été réalisées (Reifenberg, 1996 ; Morlais, 1998). Le lecteur doit tout de même savoir que la détection de l'infection trypanosomienne sur le terrain repose classiquement sur l'examen microscopique de prélèvements biologiques. Au Burkina Faso, nous appliquons sur les bovins la technique de Murray (1977) qui consiste, à partir d'un prélèvement de sang frais à la veine jugulaire, à concentrer les trypanosomes dans l'épiculot d'hématocrite (ou « buffy-coat ») dans un tube capillaire centrifugé 5 minutes à 12000 tours/minute; ce tube est ensuite sectionné à la limite de l'interface globules rouges-buffy-coat à l'aide d'un diamant et la goutte obtenue est étalée entre lame et lamelle et observée au grossissement x400 . Les trypanosomes sont identifiés grâce à leur morphologie et leur motilité (Hoare, 1972). Si cette technique est très spécifique, elle est très peu sensible (700 trypanosomes/ml de sang, Reifenberg, 1996).

Les techniques sérologiques sont appliquées lors d'enquêtes à grande échelle en raison de leur coût modéré ; la recherche des anticorps permet de déterminer le degré de contact des animaux avec le parasite, mais elle ne permet pas la distinction entre espèces de parasites et ne différencie pas une infection active d'une infection passée. Le test de détection des antigènes circulants de trypanosomes à l'aide d'anticorps monoclonaux, mis au point par l'ILRI a suscité beaucoup d'espairs. Les tests de validation réalisés dans plusieurs pays sous l'égide de l'IAEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique) (IAEA, 1997a) ont toutefois montré que ce test n'avait pas la sensibilité et la spécificité requises (Bengaly *et al.*, 1994 ; Delafosse *et al.*, 1996 ; Desquesnes & de La Rocque, 1995 ; Desquesnes, 1996). En trypanosomose humaine, les tests utilisés actuellement en routine sont de type CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomosis) (Magnus, 1978) ou ses dérivés (CATT latex, Jamoneau, 1996) et reposent sur la détection d'anticorps agglutinants. Toutefois, l'existence des antigènes variables de surface chez les trypanosomes pose des problèmes de détection dans certains foyers (in

Morlais, 1998). D'autres difficultés subsistent, par exemple la question de savoir si l'on doit traiter des sujets séropositifs non confirmés parasitologiquement.

En l'état actuel des choses, aucun test mis à part le CATT *T. evansi* (Diall *et al.*, 1994) ne paraît suffisamment performant et économique pour obtenir de manière rapide et fiable une image épidémiologique d'une zone donnée en terme d'importance relative de la trypanosomose.

2.3.2.3 Apport des outils moléculaires

Le développement des techniques moléculaires, en commençant par les sondes ADN (Majiwa *et al.*, 1985 ; Kukla *et al.*, 1987 ; Gibson *et al.*, 1988), puis par la PCR (Moser *et al.*, 1989 ; Masiga *et al.*, 1992 ; Majiwa *et al.*, 1994) a permis de notables améliorations quant à l'identification des trypanosomes circulant dans des foyers différents (Reifenberg, 1996 ; de La Rocque, 1997 ; Morlais, 1998).

Il existe en effet actuellement des amorces permettant l'amplification de 9 groupes taxonomiques différents de trypanosomes supposés pathogènes, dont 6 pour le seul sous-genre *Nannomonas* (voir annexe 1). La PCR appliquée à la détection des trypanosomes chez les glossines a permis des avancées considérables dans la connaissance de l'épidémiologie des trypanosomoses :

- *T. brucei* s.l. est susceptible de transmettre la maladie du sommeil à l'homme en Afrique occidentale et centrale, où selon les notions classiques elle serait due à la « sous-espèce » *T.b. gambiense*, tandis qu'en Afrique de l'est sévirait *T.b. rhodesiense*. *T.b. brucei* infecterait, lui, uniquement les animaux. L'affection humaine d'Afrique de l'Est, dite « rhodésienne », est considérée comme aiguë et fait intervenir la faune sauvage comme réservoir de la maladie. La forme « gambienne », par opposition, sévit sous forme chronique ; le réservoir faune sauvage pourrait jouer un rôle (Mehlitz, 1986) mais son importance est mal connue. Des analyses parasitologiques et/ou sérologiques réalisés sur la faune sauvage ont démontré que certains animaux (phacochère *Phacochoerus aethiopicus*, guib harnaché *Tragelaphus scriptus*, cobe de Buffon *Kobus kob*, waterbuck *Kob defassa*, bubale *Alcelaphus buselaphus*, buffle *Syncerus caffer*, mais aussi le lion *Panthera leo*) étaient infectés par des trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon* (Mattioli *et al.*, 1990 ; Guedegbe *et al.*, 1992 ; Truc *et al.*, 1997). Ces difficultés sont renforcées par le fait que la classification, au sein de l'espèce *T. brucei*, est complexe et contradictoire. Actuellement, une seule entité génétique paraît faire l'unanimité, il s'agit de *T. brucei gambiense* « groupe 1 » (Gibson, 1986) pour lequel il existe des sondes kinétoplastiques semblant spécifiques (Mathieu-Daudé *et al.*, 1994). Cette entité isoenzymatique (zymodème) regroupe toutes les souches isolées sur l'homme en Afrique de l'ouest. Tous les autres stocks montrent une grande hétérogénéité (Godfrey *et al.*, 1990 ; Stevens *et*

al., 1994 ;Truc *et al.*, 1997) et il semble aventureux de vouloir les assigner à une sous-espèce selon l'hôte chez lequel ils ont été trouvés. Certaines souches isolées sur la faune sauvage en Afrique de l'Ouest montrent ainsi de grandes similitudes avec celles isolées sur homme (Truc *et al.*, 1997), entraînant ainsi un important regain d'intérêt pour recherches sur le réservoir « faune sauvage » de ces maladies. Le développement de marqueurs microsatellites chez *T. brucei* semble prometteur à des fins diagnostiques, mais aussi comme marqueur de pathogénicité (G. Cuny, com.pers.).

- Dans le sous-genre *Duttonella* l'espèce économiquement la plus importante est *T. vivax*, très pathogène pour les bovins et les petits ruminants. Outre la transmission cyclique, elle possède la particularité de pouvoir être transmise mécaniquement par les glossines et d'autres insectes (tabanides, stomoxes) ; c'est le cas surtout en Amérique du Sud où c'est son seul mode de transmission, mais aussi dans les zones sans glossines d'Afrique. Les souches transmises de cette manière auraient perdu la capacité à effectuer un cycle chez les glossines (Roubaud, in Gardiner 1989). La diversité génétique de *T. vivax* a souvent été considérée comme peu importante, car les isoenzymes différenciaient avec difficulté les souches sud-américaines et ouest-africaines (Fasogbon *et al.*, 1990 ; Dirie *et al.*, 1993). Des sondes ADN spécifiques de *T. vivax* ont été mises au point à partir desquelles des couples d'amorces pour la PCR ont été définis (Dickin & Gibson, 1989), et utilisés (Desquesnes & Tresse, 1996). Les résultats de terrain ont montré à plusieurs reprises des discordances entre les glossines trouvées infectées uniquement dans le proboscis à l'examen microscopique (interprété comme une infection à *T. vivax*), et la détection de ce taxon par la PCR (Solano *et al.*, 1997c ; annexe 12). Par exemple au Burkina Faso dans la zone de Sidéradougou, plus de 90% de ce type d'infections sont identifiés comme *T. vivax* par PCR, alors que dans le ranch de faune sauvage de Nazinga, à peine 30% de ces mêmes infections sont reconnues par la PCR. Ce même type de résultats est trouvé dans d'autres zones (au Cameroun par exemple, Morlais, 1998). L'hypothèse retenue est que certaines souches de type *Duttonella* circulent, notamment au voisinage de la faune sauvage, et ne sont pas reconnues par les amorces habituelles. En particulier, on ne sait pas si *T. uniforme* (Hoare, 1972) donnerait un signal. L'emploi de nouvelles amorces PCR (Clausen, com. pers.) issues d'une séquence codant pour un antigène spécifique de *T. vivax* (Masake, 1997) nous a permis d'obtenir les bandes spécifiques attendues, confirmant l'identification de *T. vivax* sur ces proboscis infectés de glossines (résultats non publiés). Des études de variabilité génétique sur cette espèce permettraient d'en savoir plus, en particulier sur la pathogénicité potentielle de ces souches apparemment particulières circulant dans les zones cynégétiques.

- Dans le sous-genre *Nannomonas*, on est maintenant capable de différencier *T. congolense* et *T. simiae* alors qu'ils ont le même cycle chez les glossines. C'est dans ce sous-genre qu'on trouve les trypanosomes ayant une grande importance économique pour l'élevage en Afrique, notamment *T. congolense*. *T. simiae*, moins bien connu, est très virulent chez les suidés domestiques, mais inoffensif chez les bovins. Son importance économique n'est toutefois pas à négliger dans le cadre des perspectives sur le renouvellement des ressources protéino-énergétiques dans les pays en développement. L'orientation vers un accroissement de l'élevage des espèces à cycle court, monogastriques (comme le cochon domestique) est d'actualité (Tacher & Letenneur, com. pers.). Nous avons notamment pu montrer que dans certains endroits au Burkina Faso, *G. palpalis gambiensis*, pourtant réputé mauvais vecteur des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* (Agu, 1984 ; Roberts & Gray, 1972) pouvait être vecteur de *T. simiae* (Solano *et al.*, 1996 ; annexe 13). Ce trypanosome, au Burkina Faso, est aussi détecté chez *G. tachinoides* dans une zone où subsiste de la faune sauvage (Lefrançois *et al.*, 1998b), alors que sur le même vecteur, il n'est pas identifié dans la zone de Sidéradougou (Lefrançois *et al.*, 1998a ; annexe 11).

- Au sein de l'espèce *T. congolense*, les deux taxons les plus souvent détectés sur les glossines d'Afrique de l'ouest sont *T. congolense* « savane » et *T. congolense* « forêt » (McNamara *et al.*, 1994 ; 1995 ; Masiga *et al.*, 1996 ; Reifenberg *et al.*, 1997a ; Solano *et al.*, 1995 ; Lefrançois *et al.*, 1998a, b). Ils sont très souvent trouvés de manière concomitante chez les glossines, et infectent beaucoup d'espèces différentes (*G. longipalpis*, *G. p. palpalis*, *G. palpalis gambiensis*, *G. tachinoides*, *G. morsitans submorsitans* pour ne citer que les principales). La PCR permet la détection des infections mixtes, ou multiples, chez ces glossines. Les données épidémiologiques récentes acquises sur le terrain (McNamara *et al.*, 1995 ; Solano *et al.*, 1995 ; Reifenberg *et al.*, 1997a, b ; Lefrançois *et al.*, 1998a) ajoutées aux données génétiques sur l'espèce *T. congolense* (Sidibé, 1996) nous font soupçonner un spectre d'hôte différent pour ces groupes « savane » et « forêt » de *T. congolense*. On explique en effet difficilement leur présence concomitante fréquente chez les glossines mais l'absence générale sauf exception de *T. congolense* forêt chez l'hôte mammifère bovin (Reifenberg *et al.*, 1997b ; Lefrançois *et al.*, 1998a). Il est par contre détecté chez le chien, le porc (Reifenberg *et al.*, 1997b ; Penchenier *et al.*, 1996). Des infections expérimentales en cours ont pour but d'étayer ces hypothèses (Bengaly, en prep.). Ces différences entre groupes taxonomiques pourraient atteindre un niveau élevé, attesté par les différences génétiques trouvées chez *T. congolense* s.l.. Sidibé (1996) suggère en effet une origine polytypique de « l'espèce » (40 RAPD, 20 isoenzymes), ce qui pourrait impliquer l'impossibilité de trouver une sonde diagnostic pour l'ensemble de l'espèce. Signalons les résultats de Stevens (com. pers.), qui en utilisant l'ARN ribosomal 16S, pense être en présence d'une

vraie espèce monotypique ; les différences entre ces résultats pourraient être attribuées aux techniques utilisées.

- Certains auteurs anglophones avaient émis l'hypothèse séduisante d'une spécificité écologique entre des glossines riveraines (*G. palpalis gambiensis*) et le type « forêt » de *T. congolense* d'une part, et d'autre part entre *G. morsitans submorsitans* (glossine savanicole) et *T. congolense* type « savane » (McNamara & Snow, 1991), d'après des travaux en Gambie. Après plusieurs études de terrain menées dans différents pays, la situation apparaît plus complexe (Reifenberg, 1996), puisque l'on trouve notamment des trypanosomes type « forêt » sur des glossines savanicoles (*G. morsitans submorsitans*, ranch de Nazinga au Burkina Faso, Lefrançois *et al.*, 1998b), et des trypanosomes type « savane » sur des glossines ripicoles, voire forestières (*G. palpalis gambiensis* et *G. tachinoides* au Burkina Faso, *G. p. palpalis* et des glossines du groupe *fusca* au Cameroun et en Côte d'Ivoire ; Masiga *et al.*, 1996 ; Reifenberg *et al.*, 1997a ; de La Rocque, 1997 ; Lefrançois *et al.*, 1998a ; Morlais, 1998). Cette complexité est bien illustrée par des infections expérimentales d'un ou plusieurs groupes de trypanosomes infectant simultanément des taxons de glossines (Reifenberg *et al.*, 1997c). Il apparaît ainsi clairement que le génotype des glossines, au niveau infraspécifique, peut influencer sur le développement ou non des infections trypanosomiennes, d'où la nécessité de mener des études génétiques sur ces vecteurs à l'échelle de la population.



Les trypanosomes africains pathogènes pour l'homme et ses animaux domestiques sont regroupés dans trois sous-genres de la section des Salivaria, transmis par la piqûre des glossines. On distingue des hôtes mammifères domestiques sensibles et d'autres, trypanotolérants.

La faune sauvage constitue toujours une inconnue quant aux trypanosomes qu'elle héberge, mais elle est souvent considérée comme un réservoir des pathologies animales, et parfois humaines.

Les techniques de détection des trypanosomes chez la glossine et chez l'hôte vertébré se sont depuis longtemps heurtées à des problèmes de sensibilité et d'identification. Les techniques moléculaires (PCR) appliquées au diagnostic, et à l'épidémiologie sur le terrain, permettent des progrès considérables dans la détection des infections et dans la connaissance de la circulation des trypanosomes dans les foyers de trypanosomose.

Des relations privilégiées trypanosome-vecteur pourraient jouer un rôle important dans la transmission de la maladie, mais peu de connaissances sont encore disponibles sur la caractérisation génétique des populations de vecteurs.

3. CYTOGENETIQUE ET GENETIQUE DES POPULATIONS DE **VECTEURS**

Lutter contre les insectes vecteurs d'agents pathogènes constitue une des meilleures voies pour combattre les maladies qu'ils causent. Encore faut-il savoir quelles sont les populations réellement vectrices jusqu'au sein de l'espèce concernée. En effet, on a vu ces dernières années, grâce à la génétique, des espèces morphologiques de vecteurs (*Anopheles gambiae*, *Simulium damnosum* par exemple) éclater en complexes d'espèces jumelles. Or il est démontré que ces « populations génétiques » au sein d'une même espèce morphologique occupent souvent des biotopes qui leur sont typiques. Elles ont de ce fait des écologies distinctes. De plus, il arrive souvent que la compétence et la capacité vectorielle varient entre ces populations, certaines étant parfois non vectrices, montrant ainsi l'intérêt grandissant et déterminant de l'étude génétique des vecteurs. Ainsi l'identification de ces populations vectrices ainsi que celle des différentes souches de parasites transmis contribueront à mieux comprendre les interactions entre hôtes-vecteurs et parasites. Enfin, dans le cadre des campagnes de lutte contre les vecteurs, ces moyens nouveaux apportent un éclairage utile aux problèmes de réinvasion des zones traitées et aux situations de résistance éventuelle aux insecticides utilisés (Elsen *et al.*, 1991).

Nous présentons brièvement l'état des connaissances actuelles sur la cytogénétique des glossines, longtemps utilisée pour essayer de distinguer des populations, puis nous montrons ce que l'électrophorèse des isoenzymes a apporté sur la connaissance des populations naturelles de glossines, avant d'aborder les marqueurs microsatellites.

Les premières observations de chromosomes chez les glossines (*Glossina morsitans* s.l.) sont rapportées par Slizynski, in VanderPlanck (1948). Mais la première description publiée de chromosomes de glossines est le fait d'Itard (1966) chez *G. tachinoides* Westwood, 1850 (2n=6 chromosomes somatiques) et *G. m. morsitans* Westwood, 1850 (2n=10 chromosomes somatiques). Les années suivantes ont vu la description des chromosomes d'autres espèces de glossines (Riordan, 1968; Maudlin, 1968, 1970 ; revu par Itard, 1973, 1974).

Mis à part Slizynski qui a mis en évidence les chromosomes chez les glossines adultes, toutes les premières observations ont été réalisées chez les larves de dernier stade, ou chez la pupa dans le ganglion nerveux péri-oesophagien ou dans les testicules de la pupa mâle âgée de 8 à 10 jours.

Chez les glossines, le mâle est hétérogamétique (XY) et la femelle homogamétique (XX). L'aneuploïdie du chromosome Y est fréquente et ne semble pas affecter le phénotype ; les individus XO sont stériles.

La première observation de chromosomes polyténiques date de 1970 (Burchard & Baldry; Riordan). Ils sont découverts chez la larve de troisième stade, dans les tissus musculaires sous-cuticulaires. Elsen *et al.* (1989) les mettent en évidence chez l'adulte. Seuls les autosomes et le chromosome X forment des chromosomes polyténiques.

A la fin des années 1970, la carte des chromosomes polyténiques est connue, on est alors capable d'identifier les chromosomes de plusieurs espèces. La cytogénétique suscite des espoirs dans le domaine de la systématique pour la différenciation des sous-espèces, et pour la lutte génétique (Itard, 1973). A ce moment, les caryotypes de 12 espèces de glossines sont décrits, et une certaine homogénéité se dégage dans un même sous-genre : chez *Nemorhina* (groupe *palpalis*), les espèces étudiées possèdent 6 chromosomes (4 grands autosomes et 2 chromosomes sexuels). Dans le sous-genre *Glossina*, on trouve ces mêmes chromosomes plus un nombre variable de petits chromosomes. Enfin les espèces du sous-genre *Austenina* possèdent entre 14 et 20 autosomes plus 2 chromosomes sexuels.

Un polymorphisme chromosomique intraspécifique est trouvé chez *G. m. morsitans* entre des individus originaires de Tanzanie et d'autres de Rhodésie (Jordan *et al.*, 1977). Ce polymorphisme affecte aussi le chromosome Y (Maudlin, 1979). De même chez *G. pallidipes*, le «C-banding» du chromosome Y est totalement différent entre des individus de cette espèce provenant de l'Ouganda et ceux provenant du Zimbabwe, bien que ces populations ne présentent apparemment pas de barrière copulatoire en laboratoire. Chez *G. palpalis*, Gooding (1997), réalise des croisements entre les deux sous-espèces *G.p. palpalis* et *G. palpalis gambiensis* : il trouve que la plupart des mâles F1 sont stériles alors que la majorité des femelles sont fertiles, suivant en cela la règle de Haldane, 1922 : si un sexe est absent, rare, ou stérile en F1 lors de croisements interspécifiques, ce sexe est hétérogamétique. Le principal facteur de stérilité incriminé lors de ces croisements se situe selon cet auteur sur le chromosome X des glossines.

Ce polymorphisme chromosomique intraspécifique fut étudié dans plusieurs taxons par la technique du « Giemsa C-banding » mais Southern (1980) trouve autant de variabilité à l'intérieur qu'entre les espèces et en conclut aux limites de cette technique pour l'étude des relations phylogénétiques entre les espèces de tsé-tsé. La technique du « C-banding » est mise en parallèle avec les isoenzymes lors d'une étude sur deux populations de laboratoire de *G. palpalis gambiensis* qui montrent une susceptibilité différente à une souche de *T. brucei gambiense* (Elsen *et al.*, 1994). Tous les chromosomes montrent du polymorphisme, et des différences sont trouvées entre les

deux populations conspécifiques; les résultats des deux techniques convergent, bien que les isoenzymes montrent une plus grande variabilité.

Les principales études de génétique des populations de glossines ont été réalisées par l'électrophorèse des isoenzymes. Gooding (1981) étudie trois espèces de glossines présentes au Burkina Faso sur cinq loci isoenzymatiques et ne réussit pas à mettre en évidence de variabilité intraspécifique, bien qu'il différencie *G. palpalis gambiensis* de *G. tachinoides* et *G. morsitans submorsitans*. Les études vont ensuite s'étendre à d'autres taxons de glossines en augmentant le nombre de loci utilisés ; Gooding (1990) ne trouve pas de différence significative entre des échantillons de laboratoire et de terrain pour ce qui concerne H (taux d'hétérozygotie) et P (pourcentage de loci polymorphes) sur plusieurs taxons, dont *G. palpalis gambiensis*. En 1991, le même auteur étudie 14 loci enzymatiques sur des populations de laboratoire et trouve *G. palpalis gambiensis* plus proche de *G. f. fuscipes* que de *G. p. palpalis*. Au niveau intraspécifique, des différences sont mises en évidences surtout chez les glossines du groupe « *morsitans* », où Tarimo-Nesbitt (1990), trouve des hétérozygoties différentes entre deux populations de *G. pallidipes* du Kenya. Jaenson (1978) vérifie, par des croisements, qu'un contrôle polygénique est à la base des différences entre deux populations de laboratoire de *G. pallidipes* pour ce qui concerne le temps de copulation, le poids des larves, l'âge de ponte, la durée des périodes interlarvaires. Van Etten (1982) établit que les pics d'activité et les réponses à la température sont sous contrôle génétique. Krafsur *et al.* (1997) mettent en évidence grâce aux isoenzymes une différenciation génétique au sein de l'espèce *G. pallidipes* entre des populations séparées d'environ 2000 kilomètres. Il faut signaler que déjà en 1937, Nash avait trouvé trois différences de teinte chez *G.p. palpalis* au Nigeria associées avec l'habitat et/ou la localisation géographique.

Plusieurs idées fortes développées pour mieux cerner l'épidémiologie des trypanosomoses sont associées à ces études de génétique des populations. Ainsi les travaux de Maudlin *et al.* (1991) suggèrent que la maturation des infections à *T. brucei* s.l. chez les glossines est sous le contrôle d'un gène récessif lié au sexe. Ces mêmes auteurs incriminent les RLO (Rickettsia-like Organisms) dans la capacité des glossines à permettre l'installation des trypanosomes dans l'intestin (Maudlin & Ellis, 1985 ; Maudlin & Welburn, 1987); ces organismes endosymbiontes présents dans l'intestin auraient en effet une héritabilité extra-chromosomique (transmis par le cytoplasme maternel) ; l'idée est que la fréquence des individus porteurs de ces symbiontes varie dans les populations naturelles, ce qui conduit à des variations des taux d'infection et donc du danger potentiel de transmission de la maladie (Maudlin *et al.*, 1990). On pense aussi à introduire des gènes codant pour des protéine anti-trypanosomes dans ces organismes, qui rendraient

ainsi les glossines réfractaires à l'infection (I.A.E.A., 1997b). Une autre piste suivie est la propriété qu'ont certains symbiontes des cellules reproductrices (*Wolbachia spp.*) des glossines (mais aussi d'autres insectes), d'induire des mécanismes de stérilité au sein de populations conspécifiques (Curtis, 1994), propriété qu'ils partagent avec des éléments transposables (type *mariner* de la drosophile). Ces derniers ont aussi été mis en évidence chez les glossines (Blanchetot & Gooding, 1995) et pourraient jouer un rôle de dissémination de l'état réfractaire à l'infection, par exemple (I.A.E.A., 1997b). Dans cette approche, les études de génétique des populations trouvent toute leur importance, il est en effet indispensable de connaître les flux de gènes entre populations conspécifiques afin de savoir comment vont se disséminer ces éléments ou organismes employés (Dale *et al.*, 1995b). En effet, la dynamique de fixation d'un gène introduit ne sera pas la même selon que la population est structurée en au moins deux sous-populations maintenues par des barrières ou des mécanismes d'isolement, ou si elle est en équilibre de Hardy-Weinberg (Lanzaro & Warburg, 1995).

Ces études de génétique des populations peuvent aussi être menées avec des orientations différentes : elles ont notamment permis chez de nombreux vecteurs de distinguer des complexes d'espèces dont certaines sont plus ou moins vectrices que d'autres de la maladie (Hill & Crampton, 1994) : ainsi dans le complexe *An. gambiae s.l.*, l'électrophorèse a permis de différencier *An. gambiae s.s.*, vecteur du paludisme, de *An. quadriannulatus*, espèce zoophile ne présentant pas de danger potentiel pour la transmission de la maladie (in Curtis, 1994). Chez les simulies, vecteurs de l'onchocercose (aussi appelée « cécité des rivières »), l'espèce reconnue classiquement la plus dangereuse a « éclaté » en un complexe d'espèces de capacités vectorielles différentes reconnaissables à l'aide de sondes ADN spécifiques (Post, 1985); il en est de même chez les phlébotomes qui transmettent la leishmaniose (Adamson *et al.*, 1993).

Dans ce dernier cas, un autre aspect relatif à la variabilité génétique des vecteurs conditionne l'épidémiologie de la maladie : en observant deux formes cliniques différentes de leishmaniose à *L. chagasi* en Amérique latine où les parasites étaient semblables, Lanzaro & Warburg (1995) montrent que ces deux types de maladie sont en réalité transmis par deux espèces différentes de phlébotomes. Ces auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle une partie de la variabilité des formes cliniques de leishmaniose pourrait être due à la composition de la salive des vecteurs. Cette modulation de l'effet pathogène des parasites par leurs vecteurs est également décrite par exemple chez les glossines, où des souches de *T. simiae* (parasite des suidés) ont une virulence modifiée selon qu'ils sont transmis par *G. brevipalpis* ou par *G. pallidipes* (Janssen & Wijers, 1974). En descendant au niveau infraspécifique chez les glossines, Reifenberg (1996 ; 1997c) met en évidence au laboratoire des différences significatives de transmission d'un même clone de *T. congolense* par les deux sous-espèces *G. morsitans submorsitans* et *G.m.*

morsitans; chez *G. palpalis*, Elsen *et al.*, 1994 distinguent par l'électrophorèse des isoenzymes et le « C-banding » deux populations de laboratoire de *G. palpalis gambiensis* qui n'ont pas la même compétence vectorielle vis-à-vis de *T. brucei gambiense*.

Rappelons que : la compétence vectorielle est l'aptitude physiologique d'un vecteur à acquérir le pathogène et à le transmettre (Reisen, 1988) et dépend donc uniquement de facteurs intrinsèques au système glossine-trypanosome. La capacité vectorielle est le nombre de nouvelles infections par situation et par jour du fait d'un vecteur (Reisen, 1988) et dépend donc simultanément de la compétence vectorielle et de facteurs du milieu environnant (Cuisance, 1998). On peut dire aussi que « la capacité vectorielle exprime à la fois le degré de coadaptation (ou compatibilité) entre parasite et vecteur et le fonctionnement du système ainsi formé dans un environnement donné. » (Rodhain & Perez, 1985).

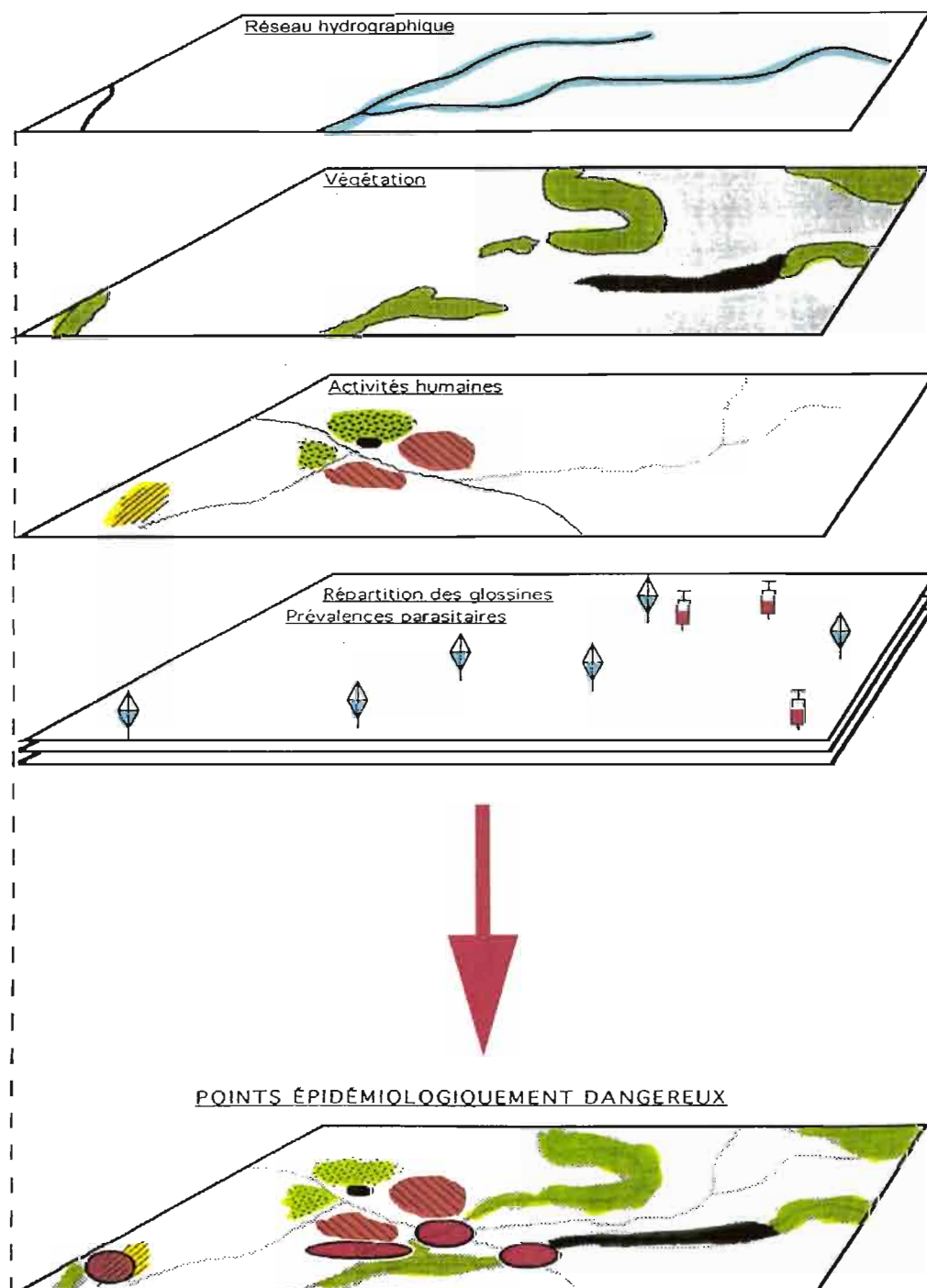


Glossina palpalis s.l. possède six chromosomes, dont deux sexuels. Le mâle porte l'Y et la femelle est homogamétique, XX. L'étude du polymorphisme des chromosomes chez plusieurs espèces de glossines a montré des variabilités intra et interspécifiques. L'électrophorèse des isoenzymes a aussi été appliquée, mais a montré ses limites pour des études génétiques au niveau intraspécifique. Il apparaît un besoin croissant d'obtenir ces informations sur les populations de vecteurs afin de les relier à l'épidémiologie et au contrôle des trypanosomoses :

- influence de la variabilité génétique des glossines sur leur capacité vectorielle
- conséquences de la structuration des populations lors de l'emploi de méthodes de lutte génétiques
- caractérisation génétique et marquage des populations de glossines comme couche d'informations dans la prévision spatiale du risque.

Figure 4 : Couches d'informations permettant la mise en évidence des points épidémiologiquement dangereux.

Source : de La Rocque, 1997 ; modifié.



L'avènement d'une nouvelle classe de marqueurs moléculaires offrant *a priori* des possibilités nouvelles en terme de quantité et de qualité d'information, l'ADN microsatellite (voir ci-dessous), nous a donc permis d'initier cette étude dans le but de mieux comprendre les flux de gènes entre populations naturelles au sein d'une même espèce de glossine. En intégrant une nouvelle « couche d'informations » à celles récoltées simultanément sur les trypanosomes présents dans les zones d'étude sur ces mêmes glossines, on affine les connaissances sur le système hôte-parasite, lui-même inclus dans un ensemble ordonné de données environnementales précises (voir Figure 4), l'objectif étant de définir précisément une situation épidémiologique et d'en tirer les meilleures stratégies d'intervention.

4. LES MARQUEURS MICROSATELLITES : UN OUTIL RECENT

4.1 Description et définition

Les gènes représentent des « oasis » dans le « désert » génomique (Epplen, 1992). La plupart des séquences répétées ne contribuent pas au phénotype des organismes eucaryotes. Leur plus importante signification en est actuellement l'usage fait dans le diagnostic. Ces éléments répétés peuvent être classés de la manière suivante :

1. Les séquences répétées dispersées :

-LINES : Long Interspersed Repeat Elements (plusieurs kilobases)

-SINES : Short Interspersed Repeat Elements : taille inférieure à 500 paires de bases (pb) ; certaines séquences sont connues (séquence ALU, répétée des milliers de fois et distribuée non aléatoirement).

2. Les séquences répétées en tandem :

-ADN satellite classique : le motif répété mesure aux environs de la centaine de pb.

-Minisatellites : les motifs répétés sont constitués de 6 à 30 pb.

-Microsatellites : encore appelés SRS (Simple Repeat Sequences) ou STR (Short Tandem Repeats) (Tautz, 1989; Tautz & Schlotterer, 1994). Une séquence microsatellite est constituée d'un nombre variable ($n > 6$) de répétitions en tandem d'un court motif (2, 3, 4 ou 5 nucléotides), dont la taille totale n'excède pas en général 200 paires de bases. Les microsatellites sont localisés majoritairement entre les gènes, dans les régions 5'-3' non transcrites, et dans les introns des gènes.

4.2 Polymorphisme et mutations

On met en évidence un polymorphisme de longueur qui reflète la variation du nombre de répétitions du motif de base entre individus.

Des mutations sont à l'origine de ce polymorphisme. Ici, seuls les événements mutationnels impliquant un gain ou une perte du nombre de motifs répétés sont détectables (Weber & Wong, 1993). Ces mutations ne semblent pas être le résultat de recombinaisons mais plutôt de mécanismes intrachromatidiques (glissement de la polymérase lors de la réplication de l'ADN, Levinson & Gutman, 1987). Selon Weber (1990), plus le motif répété est long, plus les loci sont variables et informatifs. Les taux de mutation sont variables selon les loci et les organismes (10^{-2} à 10^{-5}) et sont très supérieurs à ceux trouvés chez la plupart des marqueurs classiquement utilisés (isoenzymes ou RFLP) (Hughes & Queller, 1993 ; Jarne & Lagoda, 1996), ce qui permet d'observer beaucoup plus de variabilité (Dallas *et al.*, 1994 ; Weber & Wong, 1993). Plusieurs modèles ont été présentés et testés dans le but d'expliquer le mécanisme des mutations intervenant dans ces séquences (Weber & Wong, 1993 ; Estoup *et al.*, 1995a ; Shriver *et al.*, 1993, Godstein et Clark, 1995 ; Di Rienzo *et al.*, 1994) mais nous ne rentrerons pas dans les détails ; précisons qu'actuellement, on pense que les microsatellites évoluent différemment des isoenzymes, chez lesquels chaque allèle, lorsqu'une mutation se produit, est censé donner naissance à un nouvel allèle (I.A.M. : Infinite Allele Model). Pour les microsatellites, la nature bidirectionnelle des mutations (gain ou perte d'une unité de répétition, modèle type SMM : Stepwise Mutation Model, Valdès *et al.*, 1993) peut produire des allèles identiques par la taille mais non par descendance, ce qui d'ailleurs limite leur utilité pour des études de phylogénie faisant intervenir des unités taxonomiques éloignées à cause de l'homoplasie de taille ainsi générée (Jarne & Lagoda, 1996).

4.3 Principales applications

Les applications liées à ces marqueurs microsatellites foisonnent et prennent une importance croissante dans nos sociétés.

- Sciences légales : tests de paternité (Epplen, 1992), identité génétique d'individus (Schwaiger *et al.*, 1992).
- Cartographie du génome humain (Coullin *et al.*, 1994 ; Weissenbach & DeChenay, 1992), mais aussi d'insectes vecteurs (*An. gambiae*, Zheng *et al.*, 1993).

- Recherche de facteurs causant certaines maladies, ou de marqueurs liés à ces gènes de maladie (maladie de Huntington, syndrome de fragilité du chromosome X, dystrophie myotonique, cancers...)
- Et bien sûr les applications en nombre croissant en génétique des populations :
 - * chez des insectes sociaux : abeilles (Estoup et al, 1995b, 1995c); guêpes (Hughes & Queller, 1993); fourmis (Gertsch et al., 1995).
 - * pour des études de biodiversité :
 - gestion de populations menacées d'extinction ou ayant subi des réductions d'effectifs, des fragmentations d'habitat : cétacés (Amos et al., 1993 ; Valsecchi & Amos, 1996), buffle d'Afrique (Simonsen et al., 1998) , cerfs d'Asie (Abernethy, 1994) , kangourous (Spencer et al., 1995), ours blanc (Paetkau et al., 1995).
 - connaissance de la structure sociale : canidés et félidés sauvages (Roy et al., 1994 ; Menotti-Raymond & O'Brien, 1995).
 - * dans les études sur les vecteurs : *Simulium damnosum*, Dumas et al. (1998); *Anopheles gambiae*, Kamau et al. (1998) ; *Aedes aegypti* Ravel com. pers., Fayoux, com. pers. ; *Ixodes ricinus*, Delaye et al. (1998).

4.4. Utilisation en génétique des populations

Chaque zone de répétition est un locus et chaque nombre de répétitions est un allèle. Lorsqu'on connaît une séquence microsatellite donnée, on peut définir de part et d'autre du motif deux amorces qui vont être utilisées pour amplifier par PCR le motif microsatellite dont la longueur sera ensuite visualisée sur gel. Si le locus est polymorphe, des individus différents auront un nombre de répétitions du motif différent, et donc des tailles (allèles) différentes.

- Ces allèles sont transmis de manière mendélienne chez beaucoup d'organismes, ce qui autorise à tester les hypothèses classiques de génétique des populations (équilibre de Hardy-Weinberg...).
- Cette transmission se fait de manière codominante ; on peut donc observer des hétérozygotes, qui présenteront 2 bandes sur un gel. Prenons l'exemple d'un locus microsatellite dont le motif répété est AT, et où les amorces et la séquence flanquante mesurent 160 paires de bases : un père 180 pb (motif : (AT)₁₀) et une mère 188 pb (AT)₁₄ donneront un enfant 180-188 (10-14) : l'enfant chez un taxon diploïde hérite d'un chromosome paternel et d'un maternel. Ici il présente donc deux bandes (voir Solano et al., 1997b ; annexe 10). Notons que dans ce cas, le père et la mère ne présenteront qu'une bande (phénotype 180 pour le père, et 188 pour la mère), qui est interprétée

comme génotype : 180-180 pour le père, et 188-188 pour la mère dans le cas d'un locus situé sur un autosome pour un organisme diploïde.

-Les loci microsatellites sont supposés neutres vis-à-vis de la sélection. Cette propriété est renforcée par :
 - l'abondance de ces loci dans le génome (plus de 30 000, Weber, 1990) ;
 - la localisation de la plupart d'entre eux en dehors des régions codantes.

Cette hypothèse n'est toutefois pas valide pour quelques-uns des loci microsatellites directement associés avec des phénotypes de maladie, localisés dans des régions codantes, ou très liés à des loci soumis à sélection (par exemple ce sont souvent des motifs trinuécléotidiques type GTG qui sont associés à des maladies) ; de même il peut exister une taille limite des allèles à certains loci.

-Ces séquences microsatellites présentent un haut degré de polymorphisme et d'hétérozygotie qui permet l'accès à une quantité importante d'information basée sur les fréquences alléliques. Dans l'état actuel des connaissances, les marqueurs microsatellites sont réputés être les mieux adaptés à l'étude des relations entre espèces très proches ou entre populations d'une même espèce (Bruford & Wayne, 1993 ; Bowcock *et al.*, 1994). Ils pourraient être de moindre utilité pour des taxons plus éloignés à cause des limites de variation du nombre de répétitions : les distances génétiques atteindraient vite des valeurs maximales (Goldstein *et al.*, 1995a), et les phénomènes d'homoplasie de taille (identité par état et non par descendance) auraient plus de chances d'apparaître (Estoup *et al.*, 1995a).

Afin d'illustrer quelques caractéristiques des microsatellites, une comparaison de différents types de marqueurs utilisés en génétique des populations est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Comparaison de plusieurs types de marqueurs génétiques utilisés en génétique des populations.

Caractéristiques	Isoenzymes	RAPD	Minisatellites	PCR-RFLP	Microsatellites
détection	+++	+++	-	+++	+
polymorphisme	+	+++	++	+	+++
codominance	oui	non	oui	oui	oui
travail sur matériel dégradé ou en quantité faible	-	-	0	+	+++
transfert en PD (coût, standardisation, faisabilité)	+	0	-	-	+

RAPD= Random Amplified Polymorphic DNA ; RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism ; PD= Pays en Développement. Les « appréciations » varient de « +++ » (très adapté à la caractéristique présentée) à « - » (pas adapté), en passant par « ++ », « + », et « 0 » (neutre).

5. L'ANALYSE MORPHOMETRIQUE : DE NOUVELLES POSSIBILITES

La morphométrie a été largement utilisée chez les insectes (voir Daly, 1985 pour revue). Associée aux études de génétique, elle permet de faire intervenir l'effet d'autres gènes que ceux sur lesquels porte l'analyse génétique. Les organes, leur taille et leur conformation, reflètent souvent l'effet de l'action de plusieurs gènes modulés par l'environnement. Les mesures sont souvent effectuées sur l'aile, organe dont la taille est proportionnelle à celle du corps (Bursell, 1960). Chez les glossines, cet organe présente la particularité de posséder une cellule « en hache », qui est fréquemment retenue pour les mesures (Buxton, 1955 ; Mulligan, 1970). Les études morphométriques ont (re)pris assez récemment leur essor grâce à toutes les techniques de mesures semi-automatisées limitant ainsi l'erreur de mesure par le facteur « humain ». Ces travaux permettent de représenter des données morphologiques de manière numérique et graphique, et de tester mathématiquement des hypothèses par une gamme très large d'analyses statistiques (multivariées...). Les différences morphologiques entre populations naturelles reflètent à la fois des différences environnementales et génétiques et l'héritabilité des caractères morphométriques est analysée par les méthodes de génétique quantitative (Falconer, 1981). Ainsi chez les diptères, la variation de la longueur de l'aile est influencée par le régime de nutrition des larves (Hillesheim & Stearns, 1991), les conditions climatiques (Kitthawee *et al.*, 1992), ou même le parasitisme larvaire (Siegel *et al.*, 1992). On observe ainsi des variations de taille selon la saison chez les phlébotomes (Ogusuku *et al.*, 1993). Chez les glossines, au niveau intraspécifique, De la Rocque *et al.* (1998) montrent chez *G. tachinoides* des variations significatives de la taille de l'aile selon la saison ou le biotope. Les études morphométriques ont aussi permis d'identifier des populations de réinvasion après lutte chimique, chez les réduves vectrices de la maladie de Chagas (Dujardin *et al.*, 1997a) et chez les simuliés impliquées dans la transmission de l'onchocercose (Garms, 1991).

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

1. RECHERCHE DES MICROSATELLITES

La mise au point des microsatellites chez un organisme donné comprend trois phases : leur détection, leur clonage, et leur séquençage afin de déterminer la séquence des régions flanquant le microsatellite, étape nécessaire à la fabrication des amorces utilisées ultérieurement pour amplifier l'ADN par PCR.

1.1 Détection et clonage

Afin de rechercher des séquences d'ADN contenant des motifs microsatellites, une banque génomique partielle a été créée à partir d'une colonie de *G. palpalis gambiensis* provenant de l'insectarium commun CIRAD/ORSTOM : 60 individus adultes ont été prélevés, seule leur partie antérieure a été broyée (à cause de possibles résidus de repas de sang dans l'intestin) et une extraction d'ADN a été réalisée à l'aide d'un protocole classique phénol/chloroforme (Maniatis *et al.*, 1982). Après précipitation dans l'éthanol, nous avons obtenu environ 60µg d'ADN génomique.

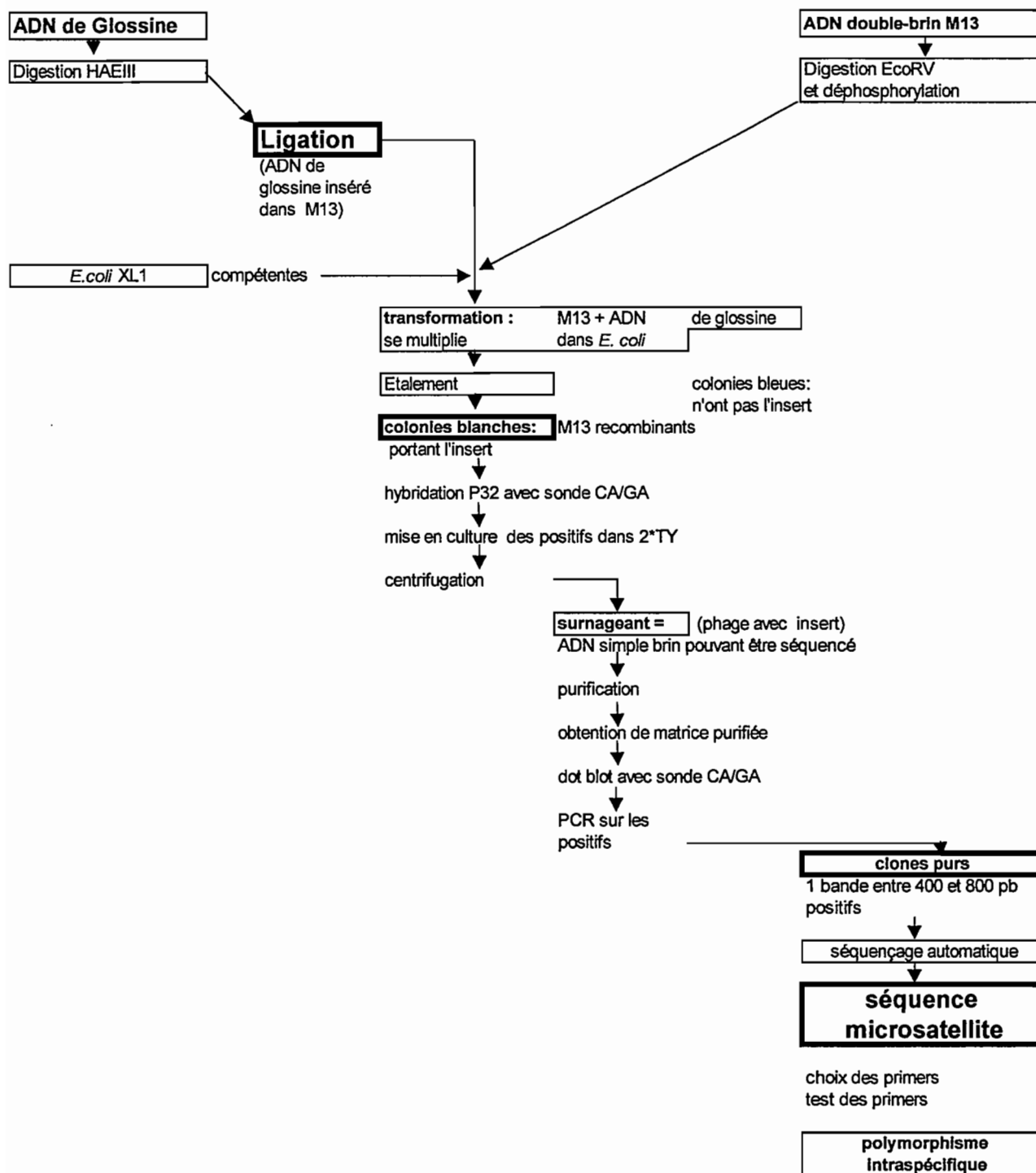
20 µg de cet ADN sont digérés (voir Figure 5) par une enzyme de restriction (HaeIII) qui coupe l'ADN chaque fois qu'elle rencontre une séquence de type [GG|CC] (coupure à bouts francs).

L'ADN ainsi digéré est déposé sur un gel d'agarose « low-melting » avec un marqueur de taille et seuls les fragments compris entre 300 et 600 pb sont sélectionnés pour la suite du protocole, par élution du gel. Après purification à l'aide d'un kit commercial (GeneClean), l'ADN est inséré dans le bactériophage M13 à l'aide de la T4 DNA ligase. Le phage a, lui, été digéré par l'enzyme EcoRV (coupure à bouts francs) et déphosphorylé, permettant ainsi l'insertion aléatoire des fragments d'ADN de glossine (phase de ligation).

Puis le bactériophage est utilisé pour transformer des bactéries *Escherichia coli* (XL1 Blue cells, Stratagène) que l'on a auparavant rendues compétentes et auxquelles est infligé un choc électrique permettant l'entrée du phage.

Ces bactéries sont ensemencées sur boîtes de Pétri, et on différencie les bactériophages ayant intégré un fragment d'ADN de ceux ne l'ayant pas intégré : l'enzyme β -galactosidase est en effet inactivée lors de l'insertion du fragment d'ADN, ce qui empêche

Figure 5 : Clonage et séquençage dans M13 pour la recherche de séquences microsatellites (CA/GT)_n et (GA/CT)_n.



l'hydrolyse de son substrat (X-gal : 5-bromo-4 chloro-3 indolyl- β -galactoside), et donc n'induit pas la formation d'une couleur bleue (bromochloroindole); ceci a comme conséquence une reconnaissance des phages recombinants (couleur blanche) de ceux n'ayant pas intégré l'insert (couleur bleue).

Après transfert des colonies de bactéries portant le bactériophage et l'ADN sur des membranes de nylon (Hybond, AMERSHAM), une hybridation est réalisée avec les sondes oligonucléotidiques microsatellites (CA) $_n$ /(GA) $_n$ marquées au phosphore dCTP α^{32} P (kit AMERSHAM de random priming, MEGAPRIME).

Après autoradiographie, les clones positifs (donnant un signal de radioactivité) sont donc repérés et sélectionnés, c'est avec ceux-là que va se poursuivre la détection des microsatellites.

Les clones positifs sont piqués à partir des boîtes de culture et mis à pousser dans un milieu nutritif (2*TY). Une centrifugation est réalisée afin de séparer le culot contenant les bactéries du surnageant où se trouve le phage portant l'insert d'ADN simple brin.

Puis une PCR est réalisée à l'aide des amorces M13 universelles « forward » et « reverse »; ces amorces, placées de part et d'autre du site d'insertion, servent à confirmer sur gel la présence du fragment inséré, à connaître sa taille approximative, et à détecter de possibles mélanges (lors du repiquage des clones, selon leur densité il arrive que plusieurs d'entre eux soient prélevés simultanément). Il faut à ce moment procéder à des ré-étalements des clones à l'aide de gammes de dilutions appropriées, jusqu'à obtenir des clones purs qui peuvent être séquencés.

1.2 Séquençage et choix des amorces

Nous avons effectué le séquençage des clones ayant donné une réponse positive à l'hybridation radioactive sur un séquenceur automatique (Taq Dye Primer Sequencing Kit, Applied Biosystems) par la méthode classique de « Dideoxy Chain Termination » (Sanger *et al.*, 1977) .

Après avoir identifié les séquences microsatellites, il faut définir des amorces de part et d'autre de ce motif afin de le rendre amplifiable par PCR; ces amorces doivent obéir aux critères suivants :

- encadrer le motif microsatellite, mais ne pas être situées trop près de celui-ci à cause de l'instabilité des séquences flanquant ce microsatellite (Callen *et al.*, 1993 ; Grimaldi & Crouau-Roy, 1997).

- donner un produit d'amplification de taille comprise entre environ 150 et 300 paires de bases, de manière à ensuite pouvoir séparer les fragments différant de quelques nucléotides sur le support le plus adapté (la séparation est plus précise pour de petits fragments que pour des gros).
- les amorces doivent elles-mêmes avoir une taille d'une vingtaine de nucléotides afin d'assurer une hybridation spécifique (température d'hybridation supérieure à 45°C) ; elles doivent comprendre au minimum 50% de G-C (liaisons plus solides), et ne pas présenter de structure secondaire, qui produirait des hybridations entre amorces.

Le choix des amorces a été réalisé à l'aide du programme OLIGO® v.1.2.

Après avoir testé les amorces sur l'ADN de la banque génomique et avoir observé un produit d'amplification clair et reproductible (optimisation des conditions PCR, de la température d'hybridation...), il faut :

- établir si le locus utilisé est polymorphe : observe-t-on des signaux PCR différant par la taille sur un échantillon de quelques individus ?
- établir de manière précise la taille de ces signaux (allèles) afin d'être capable de différencier dans notre cas des allèles ayant deux nucléotides d'écart (ce qui correspond à un motif (GT)).

1.3 Etalonnage des allèles

La méthode la plus précise est de réaliser un gel de séquence (gel de polyacrylamide 6% dénaturant, avec 8M d'urée) en incorporant du ^{35}S dans la réaction PCR, sous forme de d-ATP. Les échantillons après PCR sont déposés sur le gel, révélés par autoradiographie, et comparés à une séquence de référence, en l'occurrence celle du bactériophage M13 (kit AMERSHAM) ; on obtient ainsi les tailles des allèles au nucléotide près (Parker *et al.*, 1993).

Précisons que cette technique, bien que très précise, est assez lourde à mettre en œuvre notamment dans les conditions de laboratoire de pays en développement. La révélation en ^{35}S a donc été utilisée uniquement pour l'étalonnage des allèles.

2. CONDITIONS D'AMPLIFICATION ET DE REVELATION DES ALLELES MICROSATELLITES

La plupart des analyses ayant été réalisée au CIRDES, nous avons dû changer de support de révélation des allèles. Nous présentons en annexes 3 et 4 les conditions de PCR utilisées pour les analyses sur les glossines capturées sur le terrain, ainsi que les deux types de support utilisés : au CIRDES, la migration des produits PCR s'est faite en gel d'agarose à 4% coloré au Bromure d'éthidium, facile à utiliser, et qui présente un niveau de résolution correct pour des différences de 4 nucléotides, mais difficile pour révéler des différences d'une unité de répétition (2 nucléotides).

Dans un second temps seront présentés les résultats obtenus à Montpellier avec le second type de support utilisé : le gel de polyacrylamide 10% non-dénaturant, qui permet une détermination plus précise de la taille des allèles.

3. MATERIEL BIOLOGIQUE

3.1 Glossines d'insectarium

La banque génomique utilisée pour la recherche des microsatellites, ainsi que les premiers tests d'établissement du polymorphisme des locus étudiés, et les tests d'hérédité mendélienne des allèles, ont été réalisés à partir des *G. palpalis gambiensis* de l'insectarium commun CIRAD-ORSTOM. Cette colonie a démarré à partir de glossines capturées dans la région de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, à partir de 1972; celles-ci ont été adaptées et développées à l'IEMVT Maisons-Alfort (Clair *et al.*, 1976 ; Sellin *et al.*, 1977), puis transférées au CIRDES pour une production de masse (Taze *et al.*, 1978 ; Sellin *et al.*, 1979 ; Cuisance & Politzar, 1981) qui continue actuellement, aussi bien pour des activités de formation, que pour divers essais biologiques ou en prévision de programmes de lutte par lâchers de mâles stériles (Bauer & Kaboré, com. pers.). La colonie de l'insectarium de Maisons-Alfort a été transférée à Montpellier en 1991, et comprend actuellement environ 1500 femelles reproductrices.

Dans cet insectarium existent aussi d'autres taxons de glossines, sur lesquels nous avons testé les microsatellites isolés de *G. palpalis gambiensis*, afin de voir s'il était possible d'étendre ce type d'études génétiques à d'autres espèces sans avoir à refaire une banque génomique : il s'agit notamment de *G. f. fuscipes* et *G. tachinoides* pour le sous-genre

Nemorhina, et de *G. morsitans submorsitans* et *G. m. morsitans* pour le sous-genre *Glossina*. Dans un second temps, ce criblage fut élargi à d'autres taxons qui n'existaient pas dans l'insectarium, il s'agit notamment de *G. p. palpalis* du Cameroun (aimablement fournies par I. Morlais), et aussi de *G. caliginea*, *G. pallicera* (sous-genre *Nemorhina*), et *G. fusca* s.l. (sous-genre *Austenina*) (J.M. Bodo, com. pers.).

Après avoir établi le polymorphisme des locus microsatellites sur des *G. palpalis gambiensis* d'insectarium, nous avons débuté les études génétiques sur des populations naturelles de ce taxon. La majorité des glossines capturées viennent du Burkina Faso, de la zone agropastorale de Sédarougou, et du C.E.Z.I.E.T. (Centre d'Encadrement des Zones d'Intensification de l'Elevage Traditionnel) de Samorogouan; nous avons aussi voulu couvrir d'autres zones de la répartition géographique de ce taxon, qui va du Sénégal à l'Ouest au Bénin à l'Est, et nous avons pu bénéficier de glossines du Sénégal et du Mali.

3.2 Populations naturelles

3.2.1 Mali

Ces mouches nous ont été aimablement fournies par le Dr. O. DIALL (Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako) ; elles proviennent de la zone de Tienfala-Baguinda, située aux alentours de Bamako, où elles sont tenues responsables du maintien d'un foyer actif de trypanosomose animale à *T. vivax* ; ces mouches présentaient des taux d'infection variant de 6-10% à 20-25% dans le proboscis (*T. vivax*) (Diall, com.pers.).

3.2.2 Sénégal

Les glossines ont été capturées au niveau du club hippique dans le parc de Haan (périphérie de Dakar ; J. SEIGNOT) et sont donc éloignées géographiquement des autres glossines étudiées ; ces mouches présentent de plus la particularité de survivre dans un milieu propre à cette région lagunaire, appelé les niayes : ce sont des cordons dunaires où sont présentes des formations végétales comprenant en particulier des palmiers à huile (*Elaeis guineensis*) (Touré, 1971).

Figure 6 : Répartition géographique des glossines étudiées



Note : les glossines proviennent des environs des villes soulignées en rouge (Dakar, Bamako, Bobo-Dioulasso).

3.2.3 Burkina Faso : Présentation des zones d'étude

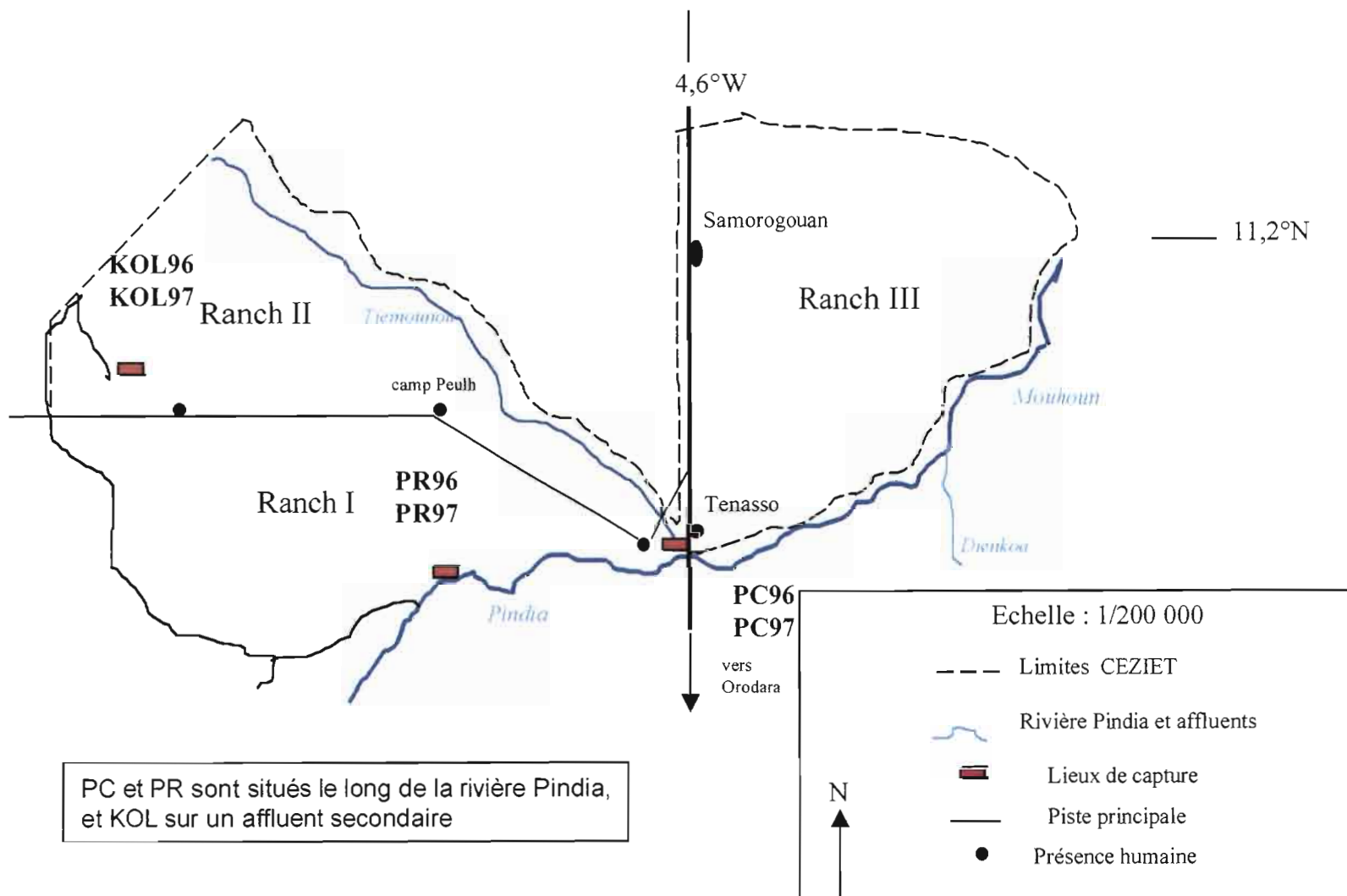
Deux zones ont été retenues dans le cadre de ce travail afin de capturer *G. palpalis gambiensis* : la zone de Sidéradougou et celle de Samorogouan. Elles sont situées au sud-ouest du pays et éloignées l'une de l'autre d'environ 100 kilomètres. Le climat, de type soudano-guinéen, y est marqué par l'alternance d'une saison sèche de la mi-octobre à la mi-mai (d'abord « froide » jusqu'en janvier, puis chaude) et d'une saison des pluies de mi-mai à mi-octobre.

3.2.3.1 Samorogouan

Cette zone est située à une centaine de kilomètres de Bobo-Dioulasso, et comprise aux environs de 11°20 de latitude nord et 5° de longitude ouest (carte de la Figure 7). L'ensemble correspond à la savane sud-soudanienne à *Isobertinia doka* parcourue par des galeries bordant la rivière principale « Pindia » et ses affluents. Après avoir identifié la principale contrainte à la production dans cette zone comme étant la Trypanosomose Animale Africaine, un projet de lutte financé par la Banque Mondiale a été mis en œuvre par le CIRDES. En 1990, la zone abritait entre 12 et 15000 têtes de bovins. Trois espèces de glossines étaient présentes : *G. morsitans submorsitans*, *G. tachinoides*, et *G. palpalis gambiensis*. La lutte, basée sur des traitements stratégiques épicutanés du bétail par des pyrèthrinoïdes a permis d'éliminer de la zone les deux premières espèces citées. *G. p. gambiensis* a toujours été capturée pendant la durée du projet (arrêté fin 1993), probablement du fait de sa capacité à se maintenir en se nourrissant sur les reptiles (Bauer *et al.*, 1995). Une forte pression glossinienne ainsi que des résistances aux trypanocides d'une souche de *T. congolense* ont été mises en évidence (Clausen *et al.*, 1992).

Deux opérations de capture ont été réalisées pour ce qui concerne le présent travail : l'une en décembre 1996 (saison sèche froide), l'autre en juin 1997 (saison des pluies). trois lieux de capture ont été prospectés : deux le long de la rivière Pindia, séparés d'environ 10 km (PC et PR), et un au nord de la zone sur un affluent d'un réseau hydrographique distinct (KOL). Sur l'ensemble Pindia (PC+PR) et à KOL, 8 pièges biconiques (Challier & Laveissière, 1973) et 8 pièges monoconiques « Vavoua » (Laveissière & Grébaut, 1990) étaient disposés en alternance et relevés quotidiennement.

Figure 7 : Localisation des points de capture à Samorogouan



3.2.3.2 Sidéradougou

La zone de Sidéradougou se situe au sud de Bobo-Dioulasso sous la falaise de Banfora (carte de la Figure 8) et couvre une surface de 3500 km². Le travail mené dans cette zone fait partie de l'action thématique programmée (ATP) du CIRAD « Identification des facteurs discriminants de la présence des glossines » (D. Cuisance, S. de La Rocque, G. de Wispelaere), et prend en compte le volet « Génétique des populations ». Les captures faites dans ce cadre ont été réalisées une année après celles de de La Rocque (1997) (menées au cours de la saison sèche 1996) auxquelles étaient associées de nombreuses couches d'informations : identification des formations végétales, parcellaire agricole, cartographie de la zone, distribution des parasites, morphopédologie, typologie d'élevages, recensements des bovins, etc.

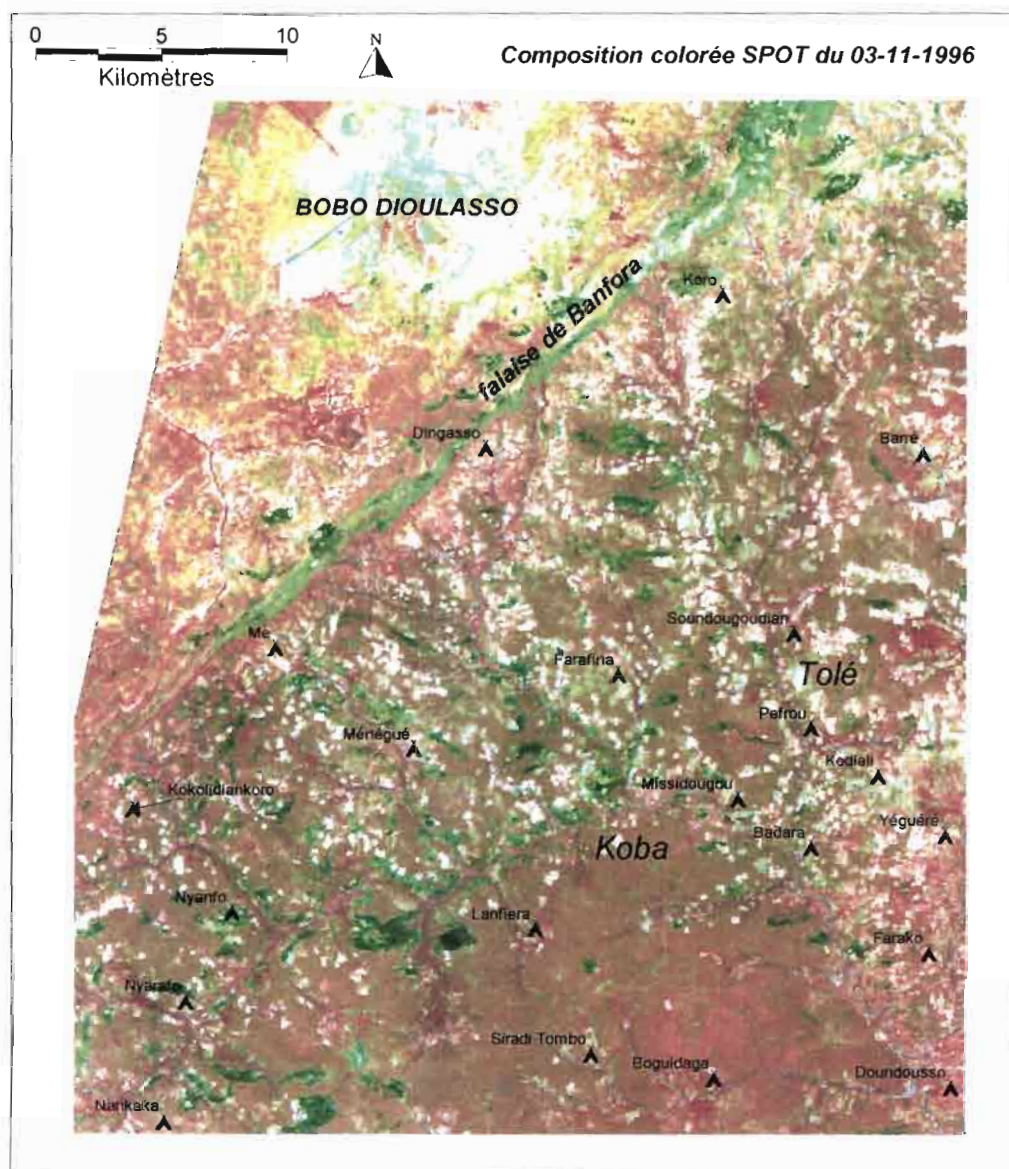
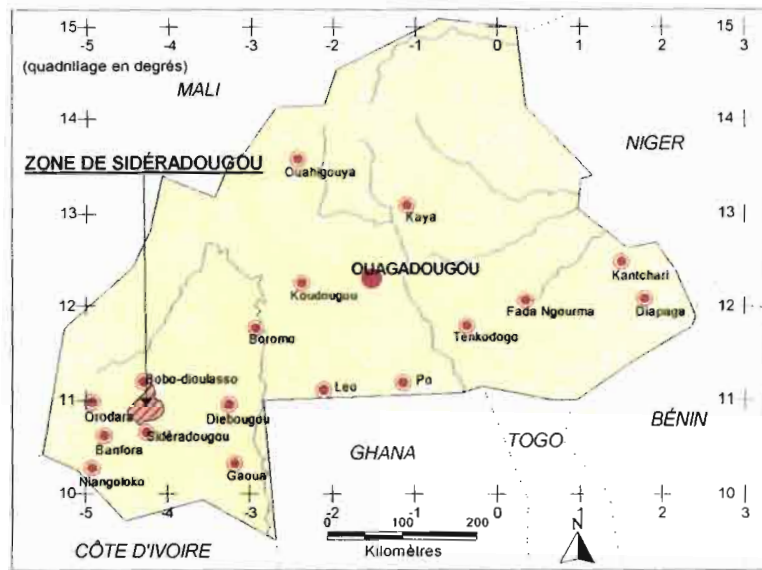
Il nous faut préciser que cette zone était déjà bien connue, car une enquête entomologique très fine fut réalisée en 1980-1982 sur plus de 600 kilomètres de réseau hydrographique ainsi qu'en savane (Cuisance *et al.*, 1985a). A la suite de cette enquête, une campagne de lutte utilisant une combinaison d'écrans imprégnés d'insecticides et des lâchers de mâles stériles fut mise en place et aboutit à l'élimination des trois taxons de glossines de la zone (*G. morsitans submorsitans*, *G. tachinoides*, *G. palpalis gambiensis*) au cours de l'année 1984 (Poltzar & Cuisance, 1984 ; Mérot *et al.*, 1984 ; Cuisance *et al.*, 1985a). Toutefois, l'arrêt de l'entretien des barrières d'isolement mises en place suite à des événements intérieurs, vit la réinvasion de la zone par les deux espèces de glossines ripicoles *G. palpalis gambiensis* et *G. tachinoides* dès 1986 (Bauer *et al.*, 1987).

Les piégeages réalisés dans le cadre du présent travail ont eu lieu :

- en fin de saison sèche chaude 1997 : en mars vers le village de Yéguéré, côté est de la zone, sur une vingtaine de kilomètres le long de la rivière Koba, sur des points au préalable identifiés par de La Rocque (1997); en mai à Nyarafo, côté ouest, le long de la rivière Koba et dans une formation boisée particulière (dite « bois sacré »), située aux abords du village de Nyarafo ;

- en saison sèche froide (janvier 1998) dans les mêmes lieux. Le même protocole de piégeage qu'à Samorogouan a été retenu. Chaque point étant géoréférencé au GPS (Global Positioning System), les informations collectées autour de chacun de ces points par de la Rocque (1997) ont pu être utilisées.

Figure 8 : Localisation de la zone d'étude de Sédéradougou.



3.2.4 Travail effectué sur le terrain

Ce travail sur le terrain concerne uniquement les glossines capturées au Burkina Faso, celles du Sénégal et du Mali nous ayant été envoyées entières.

Après la récolte quotidienne des cages contenant les glossines prises au piège, celles-ci sont amenées au campement, et les analyses suivantes sont réalisées sur place pour chaque individu :

- ▣ Identification morphologique de l'espèce, tri par sexe, dénombrement.
- ▣ Prélèvement de 3 pattes à l'aide de pinces pour les analyses génétiques, et dépôt de ces pattes dans un tube Eppendorf 0.5 ml à sec, numéroté. Les pinces sont rincées à l'eau de javel puis à l'eau stérile et essuyées entre chaque individu.
- ▣ Prélèvement et montage à sec entre lame et lamelle des ailes pour les analyses morphométriques ultérieures.
- ▣ Dissection (dans l'ordre chronologique) des pièces buccales, de l'intestin moyen et des glandes salivaires, pour la recherche des trypanosomes au microscope (grossissement 250 ou 400), uniquement sur les glossines non-ténérales (les ténérales, venant d'éclore, sont exemptes de trypanosomes). Si un organe est trouvé infecté par des trypanosomes sur la glossine disséquée, chaque organe est collecté séparément et mis dans un tube eppendorf contenant 50µl d'eau distillée stérile, sauf le proboscis mis dans un tube sec. Entre chaque organe collecté les pinces subissent le même traitement que ci-dessus, ainsi que les pinces servant à la dissection. Les tubes ainsi conditionnés sont gardés en glacière jusqu'au laboratoire du CIRDES où la PCR sera mise en œuvre pour identifier les trypanosomes.
- ▣ Estimation de l'état de réplétion de la mouche ; lorsque des résidus de sang en quantité suffisante sont trouvés dans l'intestin, ils sont récoltés sur papier Whatman N°1 pour être analysés au CIRDES, afin de connaître l'identité de l'hôte nourricier.
- ▣ Dissection des ovaires des femelles pour déterminer leur âge physiologique.

Simultanément à ces deux enquêtes entomologiques, des prélèvements sanguins sont réalisés sur les animaux domestiques présents dans les villages avoisinants. Ces prélèvements sont examinés au microscope par la technique de Murray *et al.*, 1977 (observation du « buffy-coat » entre lame et lamelle sur microscope à fond noir), et aussi par PCR sur ce même buffy-coat lorsque les animaux sont trouvés infectés en parasitologie ou ont un hématoците inférieur à 25% (Lefrançois *et al.*, 1998a).

Sur le terrain, l'opération se déroule de la manière suivante : deux tubes capillaires à microhématocrite par animal sont collectés à partir du prélèvement sanguin fait sur tube (type « vacutainer ») hépariné ; l'un sert à la lecture de l'hématocrite après centrifugation, puis est sectionné à l'aide d'un diamant au niveau du buffy-coat, et la couche leucocytaire est étalée sur une lame, puis recouverte par une lamelle et observée au microscope (x400). Si l'animal est trouvé infecté ou possède un hématocrite inférieur à 25 (signe d'anémie), le second tube capillaire est cassé de la même manière, et le buffy-coat est déposé dans un tube eppendorf contenant 30 µl d'eau distillée stérile. L'ensemble est vigoureusement mélangé et conservé en glacière jusqu'au retour au laboratoire.

3.2.5 Traitements au laboratoire

De retour au CIRDES à Bobo-Dioulasso, les traitements suivants sont réalisés :

Caractérisation des trypanosomes chez les glossines et chez les mammifères : une résine commerciale (READYAMP, Promega) voisine du Chelex (BIORAD) est utilisée suivant un protocole dérivé de Penchenier *et al.* (1996) (in Lefrançois *et al.*, 1998a).

Les amorces employées pour la PCR figurent en annexe 1, et les conditions PCR utilisées en annexe 2.

Tous les échantillons (pattes et organes) sont conservés à -20°C.

Analyse des repas de sang (Kaboré *et al.*, 1994) : la technique utilisée est un ELISA sandwich utilisant des anticorps spécifiques d'espèces de vertébrés, produits sur des poules. Ils servent, d'une part à sensibiliser les plaques ELISA, et d'autre part, associés à la peroxydase, à révéler la présence de l'antigène. En fonction des espèces animales domestiques ou sauvages présentées dans la zone, trois séries d'anticorps spécifiques d'espèces sont utilisées :

- la première série comprend les taxons suivants : homme, varan, porc domestique, potamochère, ruminant s.l., suidé s.l., phacochère, oiseau s.l. ;
- si le test est positif pour les ruminants, la seconde série aborde les espèces suivantes : bovin, chèvre, céphalophe, bubale, mouton, buffle, guib harnaché, cob ;
- si les échantillons n'ont pas donné de réponse, une troisième série est réalisée comprenant : chien, éléphant, hippopotame, rat, âne, poule, crocodile, lion.

Analyse génétique : ajout de 250 µl d'une solution aqueuse de Chelex 5% (BIORAD) dans chaque tube ; incubation 1 heure à 56°C et 30 minutes à 95°C. Cette résine a la propriété de chélater les ions divalents catalyseurs des réactions de dégradation de l'ADN (Walsh *et al.*, 1991). Toutes les lourdeurs des protocoles impliquant des

extractions d'ADN par les méthodes classiques (type phénol-chloroforme) sont ainsi évitées.

Avant chaque PCR, les tubes sont centrifugés 2 minutes, 10 µl de la solution sont prélevés (les protocoles sont détaillés en annexes 3 et 4).

4. INTERPRETATION DES DONNEES GENETIQUES

4.1 Détermination du génotype des individus

Après l'amplification par PCR des séquences microsatellites et visualisation sous lumière ultraviolette des produits PCR, une bande ou deux bandes par individu sont apparues. Les tailles de ces bandes ont été relevées de manière précise ; tous les individus analysés ont eu leur produit PCR déposé au minimum deux fois sur gel d'agarose, avec la possibilité de plusieurs migrations par produit PCR (le volume final de réaction est de 50µl, et on en dépose 12µl sur le gel).

Si on observe deux bandes, l'individu est interprété comme étant hétérozygote ; si une seule bande est observée l'individu est considéré homozygote (il a deux fois la même bande, puisque l'on a affaire à une espèce diploïde). Ceci est valable dans le cas de loci autosomaux. En revanche, lorsqu'un locus se trouve sur le chromosome X, les mâles monrent systématiquement une seule bande (sexe hétérogamétique), et les femelles, une ou deux ; s'il est situé sur le chromosome Y, les femelles ne donnent pas de signaux d'amplification (sauf si des anomalies chromosomiques sont mises en évidence).

Ainsi d'après les bandes observées sur gel, on en déduit le génotype des glossines aux loci étudiés. Les tailles des bandes (allèles) sont codées à l'aide d'un code à deux chiffres, l'allèle le plus léger observé sur l'ensemble de l'échantillon recevant le code 01.

4.2 Tests génétiques effectués

Trois logiciels d'analyse de génétique des populations ont été utilisés de manière complémentaire : GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) versions 1.2 et 3.1, FSTAT (Goudet, 1996), et GENETIX v.3.3 (Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F, 1996-1998). Le choix du logiciel utilisé selon le paramètre mesuré figure sur le tableau 2.

Tableau 2 : Choix du logiciel employé selon la paramètre génétique étudié.

Paramètre mesuré	logiciel utilisé
Déficit d'hétérozygotes intra pop	GENEPOP (si 1 population) FSTAT (si plusieurs)
Déséquilibre de liaison	GENEPOP
Différenciation interpopulation	FSTAT
Distances génétiques	GENETIX
Test du modèle d'isolement par la distance	GENEPOP

Les analyses intra et interpopulations ont été réalisées principalement à l'aide des deux logiciels GENEPOP et FSTAT.

Le test du déficit d'hétérozygotes de GENEPOP est réalisé à l'aide de la méthode des chaînes de Markov (Guo & Thomson, 1992) lorsque plus de 4 allèles sont présents au locus analysé. Les valeurs proposées par défaut ont été prises pour les paramètres des chaînes de Markov (100 démémorisations, 50 batches, 1000 itérations par batch). On obtient ainsi une probabilité et son écart-type de rejeter l'hypothèse nulle (H_0 = il y a équilibre de Hardy-Weinberg) si elle est vraie. Lorsque cette dernière recouvre le seuil d'erreur choisi (5%), on augmente les paramètres des chaînes (100 batches et 10000 itérations/batch). Lorsque moins de 4 allèles sont présents, le test exact est fait par énumération complète. L'hypothèse alternative choisie est systématiquement : H_1 =déficit d'hétérozygotes.

Les tests proposés par FSTAT utilisés dans ce travail sont basés sur des permutations (nous avons choisi 10000), soit d'allèles entre individus au sein des populations (significativité du F_{is}), soit des génotypes entre les populations (significativité du F_{st}) (voir ci-dessous).

4.2.1 Analyses intrapopulation

Dans chaque population, les tests effectués permettent de mesurer :

- le nombre moyen d'allèles par locus,
- les hétérozygoties observée (par comptage) et attendue selon Nei en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg; l'écart entre ces deux valeurs donne le F_{is} de Wright (1951) et son estimateur non biaisé f (Weir & Cockerham, 1984) : ils mesurent l'écart entre le nombre d'hétérozygotes observés et attendus **au sein** d'une population donnée ; Ce F_{is} varie entre -1 (aucun homozygote) et +1 (aucun hétérozygote) et est égal à 0 en cas de panmixie parfaite ; on teste un écart significatif à la panmixie par la procédure Genepop.

- Le déséquilibre de liaison génotypique entre paires de loci : on teste l'écart à l'hypothèse nulle d'indépendance entre paires de loci par population. Un déséquilibre de liaison significatif suggère, soit une liaison physique entre les deux loci (s'ils sont par exemple très proches), soit un système de reproduction non panmictique (absence de recombinaison). Si aucun déséquilibre n'est observé (seuil de 5%), on considère que les deux loci apportent chacun une information indépendante.
- Nous avons également comparé la moyenne des valeurs du F_{is} par échantillon (15 populations), mesurées à chaque locus par un test de comparaison de deux séries de valeurs appariées (test de Wilcoxon); on teste l'hypothèse que les moyennes ne sont pas différentes ; un test significatif indiquerait qu'une contrainte particulière pèse sur un locus.

4.2.2 Analyses interpopulation

Elles consistent essentiellement en la mesure des différences de fréquence allélique ou de leur variance entre les populations. On utilise le F_{st} de Wright, 1951, mesuré par son estimateur non biaisé Θ (Weir & Cockerham, 1984), qui est la composante de la variance entre les populations. Ce paramètre est encore appelé « indice de fixation » ou « mesure de l'effet Wahlund » (Goudet, 1995), il mesure la différenciation génétique **entre** les populations.

On teste si ce paramètre donne des valeurs significatives par permutation des génotypes entre les populations (procédure FSTAT), l'hypothèse nulle étant que les génotypes sont indépendants des populations échantillonnées. Nous n'avons pas réalisé ce test sur les allèles car pour ce faire, il eut fallu que les allèles soient distribués au hasard dans les individus, ce qui n'est pas le cas lorsque par exemple, le déficit d'hétérozygotes est significatif au sein d'une population (Goudet, 1995).

A partir des fréquences alléliques et du F_{st} , différentes mesures assimilées à des distances génétiques ont été réalisées. L'objectif n'était jamais d'inférer des relations phylogénétiques entre les échantillons, mais uniquement de représenter les relations phénétiques existant entre ces échantillons. Nous avons également testé si les différences génétiques entre populations augmentaient avec la distance géographique, en comparant les matrices de distance génétique aux distances géographiques, et en réalisant des tests de Mantel (Manly, 1985) par permutation ; les tests de Mantel ont été réalisés directement sur le F_{st} , ou sur plusieurs estimations des distances génétiques :

- $-\ln(1 - F_{st})$ peut être assimilé à une distance génétique (Reynolds *et al.*, 1983)
- $F_{st}/(1 - F_{st})$ est utilisé pour étudier des espèces occupant un habitat de type linéaire (Rousset, 1997)

- La distance génétique de Nei non biaisée (Nei, 1978) présente l'avantage de pouvoir être comparée à beaucoup d'autres travaux utilisant cette distance.

Ces distances peuvent être visualisées sur un dendrogramme par la méthode de l'UPGMA (Unweighted Pair Group using Mathematical Average) utilisant l'algorithme PHYLIP (Felsenstein, 1989).

Lorsqu'une série de tests statistiques est réalisée pour un paramètre donné. (par exemple, déséquilibre de liaison entre paires de loci sur chaque population), la procédure séquentielle de Bonferroni est appliquée (Rice, 1989) : on compare la valeur significative la plus petite obtenue pour P avec le rapport entre le seuil d'erreur choisi (5%) et le nombre de tests réalisés : cette correction permet de s'affranchir de l'erreur statistique de type 1 (trouver une différence significative alors qu'elle ne l'est pas), qui augmente automatiquement avec le nombre de tests réalisés.

4.2.3 Stratégies d'analyse

Les 15 populations ont été analysées avec les paramètres présentés ci-dessus. Une fois cette première analyse réalisée, différents regroupements de populations ont été faits, avec pour objectif d'évaluer la structuration des populations de *G. palpalis gambiensis* :

- d'un pays à l'autre, à une échelle « macrogéographique » ;
- à Samorogouan, entre la saison sèche et la saison des pluies car l'échantillonnage l'a permis;
- à Sidéradougou, compte tenu de toutes les informations collectées (de La Rocque, 1997) et du protocole de piégeage effectué, de mesurer cette structuration le long d'un même réseau hydrographique, de comparer quand cela était possible la structuration des populations entre les deux années de capture, et de croiser cette information avec celles recueillies sur l'épidémiologie de la trypanosomose dans cette zone.

4.2.4 Analyse Factorielle des Correspondances

Cette analyse a été réalisée sur la zone de Sidéradougou du fait du maximum d'informations disponibles. Elle a été faite sur les génotypes multilocus « bruts » et a pour but de visualiser la distribution de ces génotypes selon les axes qui sont constitués par les allèles. L'objectif est de déceler une structuration des individus d'après la représentation spatiale des génotypes ou groupes de génotypes. L'AFC a été faite en utilisant le logiciel Praxème R&D™. Seules les femelles ont pu être retenues (voir

Résultats), et certains individus ont dû être éliminés, soit qu'un allèle était manquant, soit qu'ils étaient « mal classés », faussant l'analyse.

5. ANALYSES MORPHOMETRIQUES

Des mesures de taille des ailes ont été réalisées afin d'appuyer les données génétiques. Le principe est que la taille des ailes des insectes est proportionnelle à celle du corps (Bursell, 1960). Chez les glossines, la taille des individus peut être corrélée avec leurs réserves nutritives, leur taux de mortalité, et/ou les conditions climatiques (Dransfield & Brightwell, 1989).

Différents paramètres morphométriques ont été relevés sur les ailes des glossines grâce à un logiciel de mesures semi-automatiques (Fly Picture Measurement) mis au point par L. Petiteau, B. Geoffroy, F. Borne & D. Cuisance (CIRAD EMVT-AMIS/ORSTOM). Ce logiciel a été utilisé pour le même type de mesures chez *G. tachinoides* (de La Rocque *et al.*, 1998).

Dans le présent travail, les mesures ont été réalisées uniquement sur *G. palpalis gambiensis* du Sénégal, et de la zone de Sidéradougou sur les glossines capturées lors des enquêtes de 1998 (bois de Nyarafo et Yéguéré). Lorsque cela a été possible, les mesures ont été réalisées sur les individus dont les génotypes étaient connus. Cela a été le cas pour les glossines du Sénégal et au Burkina Faso, dans la zone de Sidéradougou uniquement pour l'année 1998, sur quelques individus des populations NBO98, NKO98 et YEN98.

Pour réaliser ces mesures, les opérations suivantes sont faites : les ailes sont montées à sec entre lame et lamelle (cette dernière est scotchée à la lame) en respectant leur côté d'origine afin d'éviter les biais liés à l'asymétrie possible des organes (Bruckner, 1976). La préparation est observée à la loupe binoculaire au grossissement 75, sur laquelle est adaptée une caméra CANON reliée à un ordinateur. L'image est capturée sur l'écran et enregistrée.

Les mesures sont réalisées grâce au logiciel FPM (Fly Picture Measurement) : sur l'écran de l'ordinateur, huit points remarquables sont sélectionnés selon le protocole de Geoffroy & Cuisance (com. pers.) (voir Figure 9) : les cinq premiers permettent la mesure de la surface de la cellule en hache, les trois derniers servent à mesurer la longueur en millimètres des trois segments figurés, ainsi que leurs rapports.

Les moyennes, variances sont ainsi déterminées et comparées à l'aide de tests statistiques (EPIINFO) entre les populations, les sexes, les saisons de capture.

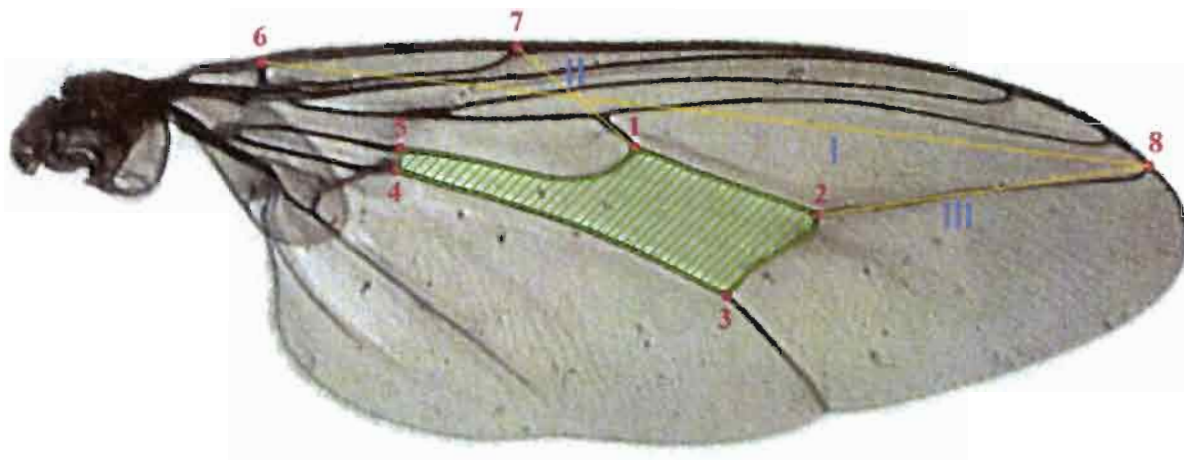


Figure 9 : Aile de la glossine visualisée sur le logiciel « Fly Picture Measurement ».

Les points numérotés de 1 à 8 sont les points que l'opérateur doit saisir à l'aide de la souris, à l'ordinateur. Les cinq premiers permettent de déterminer la surface de la cellule en hache (figurée en vert hachuré), les points 6, 7 et 8 permettent de mesurer la longueur des segments numérotés I, II, et III sur la figure.

De La Rocque *et al.* (1998) ont montré qu'il existe des différences significatives de taille des ailes sur *G. tachinoides* selon la saison, le sexe et le biotope fréquenté.

Prenant en compte ces résultats, les mesures ont été réalisées sur des glossines capturées du même sexe (femelles) et sur le même côté de l'aile (gauche), et capturées dans la même semaine en ce qui concerne la zone de Sidéradougou (Nyarafo et Yéguéré). Les effectifs sur lesquels portent les mesures sont donc :

Nyarafo=NBO98+NKO98 28 femelles (aile gauche)

Yéguéré=YEN98 21 femelles (aile gauche)

Sénégal=SENE 23 femelles (aile gauche)

Chapitre 3 :

Résultats

1. OBTENTION DES MICROSATELLITES

Sur un total d'environ 2800 clones M13 recombinants obtenus sur les boîtes de Pétri, 50 clones positifs ont été obtenus après criblage de la banque génomique par les oligonucléotides marqués au dCTP $\alpha^{32}\text{P}$; puis 11 après une deuxième hybridation (dot-blot) de confirmation, les faux-positifs ayant sans doute pour origine les faibles conditions de stringence employées.

Après séquençage, trois microsatellites ont ainsi été identifiés (voir Figure 10). Sur les autres clones apparus positifs, soit il s'est produit une hybridation avec des motifs (GT) non répétés en tandem, soit des motifs microsatellites étaient présents, mais trop près du site d'insertion pour pouvoir définir des amorces (pour deux d'entre eux). Notons que l'un des trois microsatellites (locus 69.22) est un (TA), alors que l'on s'attendait à trouver des (GT) ou des (CT). L'explication nous en a été fournie lors du séquençage plus en aval du motif microsatellite, qui a révélé la présence d'un autre (GT) répété, situé environ 200 nucléotides plus loin.

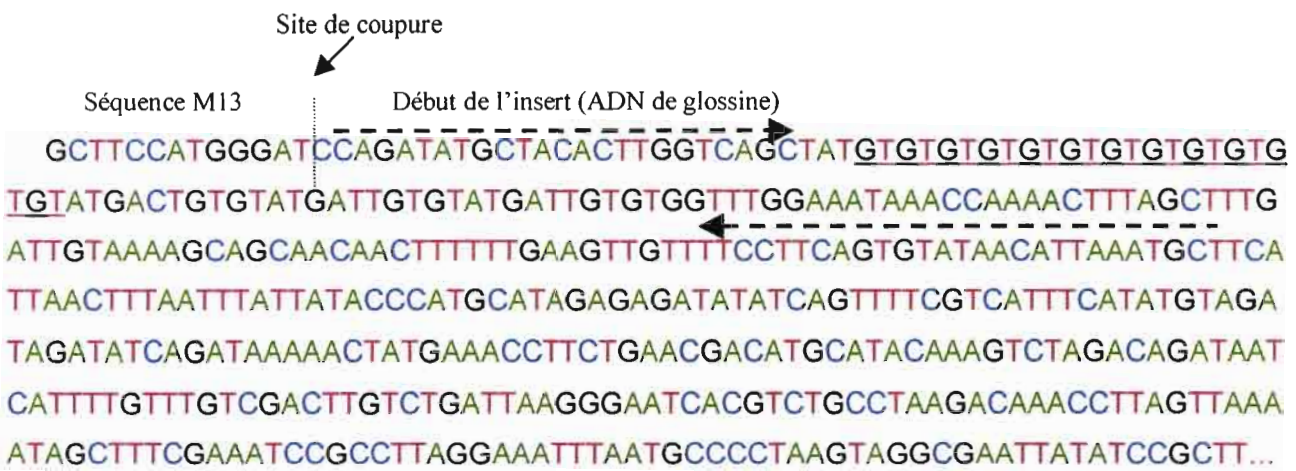
2. GLOSSINES D'INSECTARIUM

2.1 Polymorphisme des séquences microsatellites chez *Glossina palpalis* *gambiensis*

Dans un premier temps, nous avons vérifié que sur 8 individus issus de l'insectarium, les 3 loci microsatellites obtenus étaient polymorphes (voir tableau 3).

Ils montrent des bandes de taille comprise entre 160 et 200 paires de bases (la taille de l'allèle séquencé à chaque locus est respectivement de 181 pb, 176 pb, et 196 pb ; voir Solano *et al.*, 1997a, annexe 9). Étant donné le plus fort polymorphisme des deux premiers loci, les analyses suivantes concernent uniquement ceux-ci. Selon la nomenclature de Weber (1990), la séquence 55.3 est considérée comme un microsatellite imparfait (un GC sépare les 2 suites de GT), les deux autres sont parfaits.

Figure 10 : Exemple de séquence microsatellite isolée de *Glossina palpalis gambiensis* (locus 19.62).



Le motif microsatellite est souligné. Les deux amorces PCR (l'une en amont, l'autre en aval du motif) sont signalées par des flèches en pointillé au-dessus des nucléotides correspondants.

Tableau 3 : Polymorphisme des trois loci microsatellites sur huit individus de *G. palpalis gambiensis* d'insectarium.

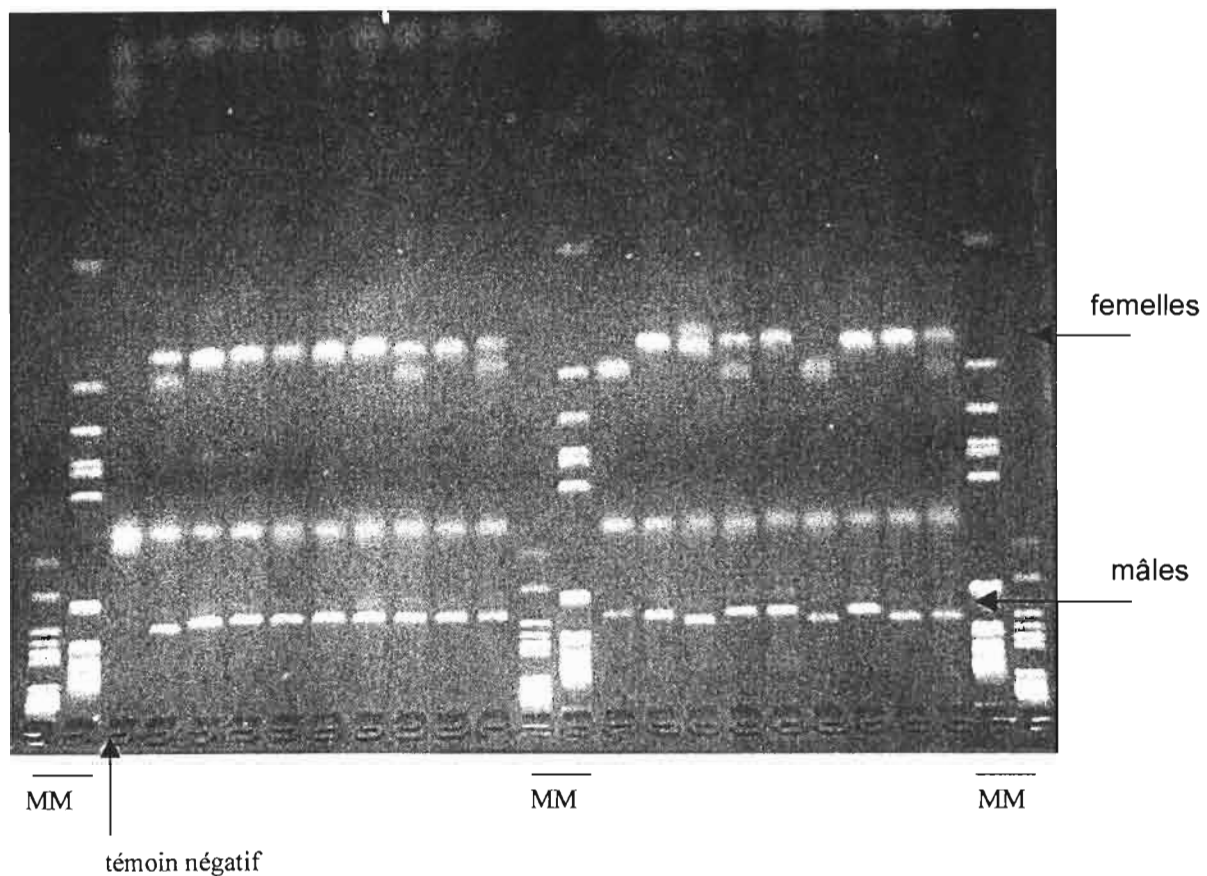
Locus	Motif Microsatellite	Nombre d'alleles	séquence des amorces
55.3	(GT) ₁₄ (GC)(GT) ₄	4	GTACTCAACGTGGTGCTTAAAGTTG GTCTGAGATAGGACCATTATCG
19.62	(GT) ₁₂	3	GTCTATACGATGTGAACCAAGTCG GCATTTAATGTTATACACTGAAGG
69.22	(TA) ₁₀	2	CAAACTCGACCAAATTGACCG CGATAATGATACGATTAAATCAAACC

2.2 Transmission des allèles entre générations chez *Glossina palpalis gambiensis*

Ce protocole a été réalisé afin de vérifier l'héritabilité mendélienne des allèles à chaque locus. Pour des raisons techniques, cette expérience n'a été réalisée que pour deux loci microsatellites :

- Quinze mâles et quinze femelles fraîchement éclos ont été choisis au hasard. Ils ont été identifiés et mis dans des cages individuelles. Une patte leur a été enlevée, à partir de laquelle le génotype de ces individus a été établi aux deux loci considérés.
- Afin de vérifier la transmission des allèles à la génération suivante, on a constitué dix couples selon les génotypes trouvés, chacun dans une cage, afin qu'ils se reproduisent et donnent naissance à une F1. On a ensuite analysé les individus de cette F1. En raison des effectifs limités (moins de dix descendants par femelle) et de la mortalité, nous n'avons pas pu effectuer d'analyse de fréquences alléliques sur ces individus ; nous nous sommes contentés d'observer si les bandes présentes chez les parents étaient bien transmises à la génération suivante. Ce type d'approche a également été utilisé chez d'autres organismes afin de vérifier la présence éventuelle d'allèles nuls (Pemberton *et al.*, 1995), ces allèles nuls pouvant conduire à des interprétations erronées de déficit apparent d'hétérozygotes comme nous le verrons par la suite.

Figure 11 : Gel d'agarose 4% sur les individus d'insectarium de *G. palpalis gambiensis*.



MM= marqueur de poids moléculaire.

Sur ce gel figurent deux migrations successives, après PCR (locus 19.62) sur les pattes des glossines issues de l'insectarium. La première migration a été réalisée sur les femelles, qui montrent des individus à une bande (homozygotes) ou à deux bandes (hétérozygotes). La seconde (plus bas) montre les mâles (toujours une seule bande). On voit aussi les traces des amorces utilisées pour la PCR, entre la migration des mâles et des femelles, et au-dessus des femelles. Cette photo a été prise après 3h de migration (pour les femelles), et 1h30 pour les mâles, l'interprétation se fait en général au bout de 8 heures.

Sept des dix couples répartis dans des cages ont donné une F1. Dans une huitième cage, deux mâles de génotype différent ont été placés avec une femelle.

Un total de 26 individus F1 ont été analysés issus de ces huit cages.

Pour chacun des deux loci analysés, respectivement 4 et 6 allèles ont été observés.

Les mâles ont toujours montré une seule bande alors que les femelles en montraient une ou deux (voir photo Figure 11). Certains mâles F1, au vu des génotypes parentaux, auraient pu être hétérozygotes, mais ont toujours montré uniquement la bande maternelle (par exemple les individus IA, IB, IF). Nous en avons déduit que les deux loci étaient situés sur le chromosome X. Nous avons retrouvé ce type de déterminisme des bandes sur les glossines « sauvages », ce qui a confirmé cette hypothèse. Ceci explique le codage à un seul chiffre pour les mâles (voir annexe 5), le second étant codé « 00 » systématiquement, ce qui permet de les inclure dans les analyses de différenciation interpopulation. Pour la suite des analyses sur ces deux loci, seules les femelles ont été prises en compte pour les tests « intrapopulation » car des écarts aux proportions attendues d'hétérozygotes ne peuvent être mesurées que sur celles-ci (les mâles ne sont jamais hétérozygotes car ils ont un seul chromosome X).

L'analyse de ces individus d'insectarium a aussi montré que les deux loci ne présentaient pas de déséquilibre de liaison significatif : bien qu'ils soient apparemment situés tous les deux sur le chromosome X, la distance les séparant doit être assez importante pour ne pas interdire la recombinaison, de même que le système de reproduction ne l'empêche pas.

On considère donc que les deux loci apportent chacun une information indépendante.

Pendant l'expérience, aucune exception à la transmission mendélienne des allèles d'une génération à l'autre n'a été mise en évidence. Les bandes parentales ont été systématiquement retrouvées dans la F1 ; lorsque l'individu F1 était de sexe mâle, nous avons toujours observé la bande du chromosome X maternel (exemple, dans le couple FI4/MI5, ou FI10/MI8, voir annexe 5), lorsque c'était une femelle, elle était soit homozygote si les deux parents avaient le même allèle, soit hétérozygote.

Cette expérience nous a donc permis de noter l'absence d'allèles nuls dans le cadre de cet échantillon d'insectarium ; on soupçonne la présence d'allèles nuls lorsqu'une bande présente chez les géniteurs n'est pas retrouvée dans la F1 (Pemberton *et al.*, 1995). Ce phénomène peut se traduire par une absence totale de produit de migration sur le gel (cas d'un homozygote pour l'allèle nul), ou par l'observation d'une seule bande alors qu'on attendait un hétérozygote (cas d'un hétérozygote allèle visible-allèle nul). Dans notre cas, un individu (IS) n'a donné aucun signal, mais nous pensons à un problème

d'ordre technique car cette absence de bande chez cet individu se trouve pour les deux loci.

Nous montrons par la même occasion que l'on peut réaliser des « tests de paternité » sur les glossines avec la 8^e cage, où la seule femelle née de FI2 possède la même bande que le mâle MI2 aux deux loci considérés, indiquant que cet individu est son père, aux « dépens » du mâle MI4. Retenons aussi que, amputées d'une patte, les glossines des 2 sexes sont encore capables de se reproduire !

L'observation des résultats nous indique que pour l'échantillonnage des populations naturelles, l'effort sera porté sur l'analyse génétique des femelles, car toutes les interprétations liées au système de reproduction et aux analyses intrapopulations ne pourront se faire que sur celles-ci (absence totale d'hétérozygotes mâles) ; des mâles seront toutefois prélevés afin :
- de vérifier qu'ils ne présentent pas d'allèles différents des femelles dans une localité donnée (test de différenciation génétique GENEPOP sur les allèles)

- de les inclure dans les analyses interpopulationnelles pour en augmenter la robustesse par augmentation de l'effectif analysé : mais comme ils sont « haploïdes », on les rend artificiellement homozygotes en leur ajoutant le même allèle que celui observé (car les logiciels ne tiennent pas compte de l'information s'il n'y a qu'un seul allèle), puis on enlève la moitié de l'effectif afin de conserver le même nombre d'allèles au total.

2.3 Extension à d'autres taxons

Tableau 4 : Présence/absence de produits d'amplification chez les autres taxons.

Locus	Taille des bandes (pb)				
	<i>G.p.palpalis</i>	<i>G.f.fuscipes</i>	<i>G.tachinoides</i>	<i>G.morsitans</i> <i>submorsitans</i>	<i>G.m.morsitans</i>
55.3	175, 171	181, 185	non	non	non
19.62	170, 174	174, 182	160	non	non
69.22	194, 200	192	non	non	non

Toutes les glossines du sous-genre *Nemorhina* (groupe *palpalis*) donnent un signal d'amplification clair et reproductible pour au moins un locus. Chez *G. p. palpalis* et *G.f.fuscipes*, ces signaux sont obtenus aux trois loci et les individus montrent un polymorphisme de taille à chaque locus (voir Tableau 4).

G.f.fuscipes, ces signaux sont obtenus aux trois loci et les individus montrent un polymorphisme de taille à chaque locus (voir Tableau 4).

En revanche, aucun locus ne donne de produit d'amplification visible chez les glossines du sous-genre *morsitans*.

Nous nous devons de relativiser ces résultats car seuls deux individus de chaque population ont été prélevés dans ce cadre ; il s'agissait en effet juste d'observer une présence éventuelle de produits d'amplification. Ces résultats suggèrent la possible extension de ce type d'études à d'autres taxons, au moins du sous-genre *Nemorhina*.

Nous avons eu confirmation de cette apparente conservation des séquences flanquant les microsatellites dans le sous-genre *Nemorhina* sur des glossines issues de populations naturelles au Cameroun : il s'agit de *G. caliginea* et *G. pallicera* qui donnent des signaux interprétables et polymorphes aux trois loci testés ; en revanche aucun des trois loci n'est amplifié chez *G. fusca* s.l. (sous-genre *Austenina* ou groupe *fusca*) (Bodo, Morlais, com. pers.).

3. POPULATIONS NATURELLES DE GLOSSINA PALPALIS

GAMBIENSIS

Au total, 15 échantillons (que l'on appellera « population ») représentant plus de 600 glossines sauvages ont été constitués, et analysés sur agarose 4% aux deux premiers loci (55.3 et 19.62). Ces échantillons ont été définis d'après leur localisation géographique et leur effectif dans les captures :

- Sénégal : 1 population appelée SENE, 29 individus
- Mali : 1 population appelée MALI, 21 individus
- Burkina Faso : Samorogouan : 5 populations, KOL, PC et PR répliquées (l'une en 96, l'autre en 97 ; PR n'a pas été répliquée), 180 individus.

Sidéradougou : 8 populations : dont 5 en 1997, qui se localisent sur le réseau hydrographique du Koba (voir carte Figure 15), d'ouest en est :

NBO bois de Nyarafo, NKO galerie le long du Koba vers Nyarafo,

KOB galerie sur le Koba à mi-chemine entre Nyarafo et Yéguéré

YEN galerie partie nord du Koba avant l'embranchement avec le Tolé près du village de Yéguéré, YES galerie au sud de la précédente.

Trois réplicats ont été réalisés en 1998 sur NBO, NKB et YEN. Au total, 360 individus provenant de cette zone de Sidéradougou ont été analysés.

Les résultats seront présentés en allant du macro- vers le micro-géographique. Nous décrivons d'abord les résultats génétiques obtenus sur l'ensemble des échantillons ; puis l'on s'intéressera ensuite à l'ensemble des données récoltées (entomologie, parasitologie, analyse des repas de sang, puis résultats génétiques) par zone d'étude.

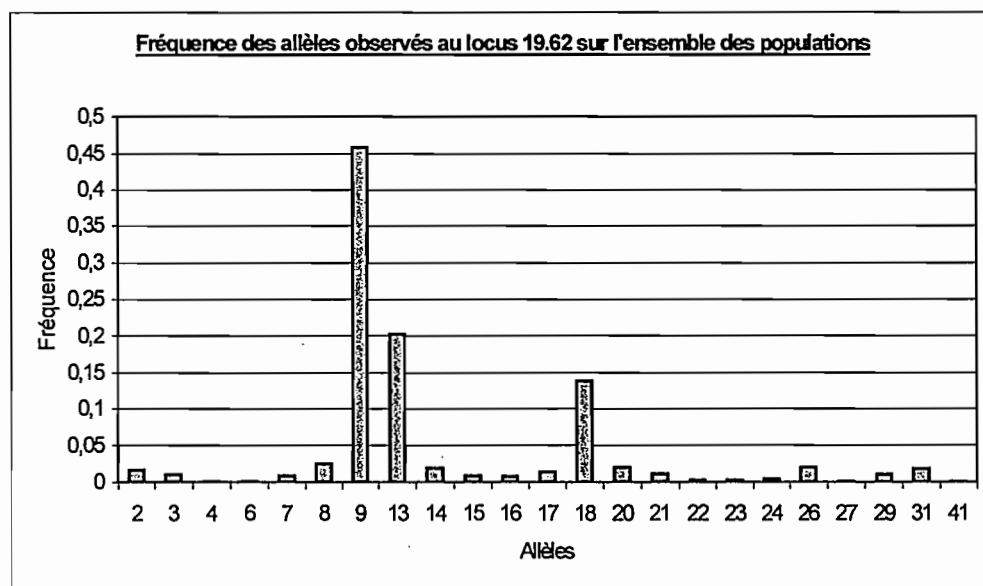
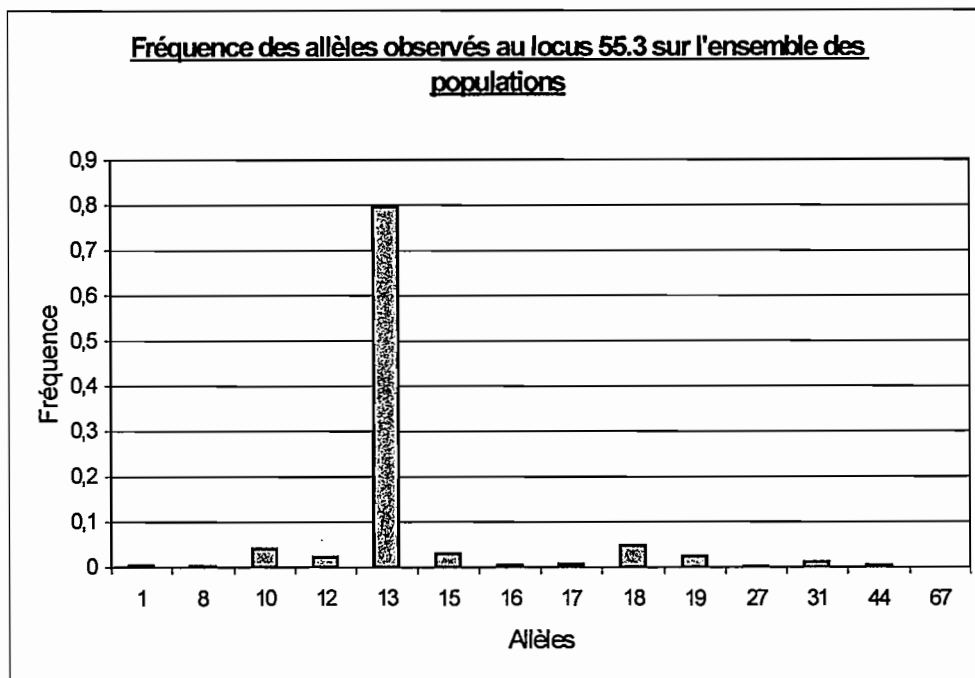
3.1 Résultats génétiques et morphométriques obtenus sur l'ensemble des populations

Les loci 55.3 et 19.62 ont respectivement montré au total 14 et 23 allèles. Les fréquences alléliques moyennes regroupées sur l'ensemble de l'échantillon sont représentées sur les graphiques de la Figure 12. Notons que certains allèles sont rares ($p < 0.01$) et interviendront peu dans les analyses.

Le locus 55.3 présente une distribution unimodale des allèles, avec un allèle largement majoritaire, et un indice de diversité génique de Nei, $H_{exp} = 0.37$. Cette distribution explique que les valeurs de la diversité génique moyenne comprises entre 0.33 et 0.61 ne soient pas très élevées pour des loci microsatellites, si on les compare à d'autres travaux sur les microsatellites d'insectes (Hughes & Queller, 1993 ; Goldstein & Clark, 1995 ; Estoup *et al.*, 1995 ; Lehman *et al.*, 1997 ; Dumas *et al.*, 1998). Le fait que le locus 55.3 soit moins polymorphe semble explicable par la structure du motif microsatellite, interrompu (voir tableau 3). Cette interruption stabiliserait la séquence, ce qui la rendrait moins polymorphe, mais aussi moins sujette aux phénomènes d'homoplasie de taille (Estoup *et al.*, 1995d).

Sur le locus 19.62 en revanche, la distribution est bi, voire tri-modale, et des variations de fréquence allélique sont plus attendues à ce locus entre les populations. $H_{exp} = 0.72$. La majorité de l'information génétique sera portée par ce locus.

Figure 12 : Représentation des fréquences alléliques observées sur l'ensemble de l'échantillon aux deux loci (en agarose). Les allèles sont représentés par leur code.



3.1.1 Analyses génétiques intrapopulation

Ces analyses ont porté sur les 370 femelles réparties dans 15 « populations » telles qu'elles sont représentées sur le tableau 5. Notons qu'à Samorogouan, ne figure pas PR97 en raison d'un faible effectif (voir par ailleurs la section « Résultats entomologiques »), et que les résultats portant sur des échantillons de moins de 15 femelles (soit 30 produits alléliques) sont sujets à caution.

Nous avons auparavant comparé les valeurs du F_{is} obtenues pour chaque locus, et réalisé un test de comparaison par paires (test du signe de Wilcoxon). Ce test n'étant pas significatif, nous en concluons qu'aucune contrainte ne pèse sur un locus plus que sur l'autre. Autrement dit, les deux loci, indépendants, apportent de plus une information homogène.

On peut déjà noter une majorité de valeurs positives du F_{is} (déficit d'hétérozygotes au sein d'une population) sur lesquelles nous reviendrons, indiquant un déficit d'hétérozygotes par rapport aux prédictions d'Hardy-Weinberg, généralisé à l'ensemble de l'échantillon pour les 2 loci : 7 tests sur les 15 réalisés indiquent des déficits d'hétérozygotes significatifs. Il semble tout de même que les valeurs les plus significatives sont rencontrées pour les glossines du Burkina Faso, dans la zone de Sidéradougou.

Les échantillons du Mali et du Sénégal ne montrent pas de déficit d'hétérozygotes et à Samorogouan les valeurs observées sont proches de celles attendues, sauf pour PR96 mais sur un très faible effectif.

Le nombre moyen d'allèles par locus et par population oscille entre 3.5, valeur la plus faible sur les glossines du Sénégal, et 9 pour Yéguéré, côté est de la zone de Sidéradougou.

Sur 15 tests de déséquilibre de liaison réalisés (un test pour deux loci sur chaque population), une seule valeur significative ($p < 0.05$, qui indiquerait que les deux loci sont liés dans la population) a été obtenue. Cette valeur ne reste pas significative si on applique la procédure de Bonferroni : autrement dit, sur 15 tests, il se peut que l'on trouve une telle valeur par pur effet aléatoire. Ce test gagnerait en efficacité s'il était réalisé sur plus de loci. Dans le cadre de ce travail, nous considérerons donc que les deux loci sont indépendants.

Tableau 5 : Résultats obtenus aux 2 loci microsatellites en agarose 4% sur l'ensemble des populations.

pop	Hexp	Ho	Nbre moyen allèles/locus	Fis moyen	Nbre de femelles	Localisation géographique
NBO97	0,5497	0,4143	5,5	0,272 p<0,0001	21	Sidéradougou BF
NKO97	0,4625	0,3552	6	0,198 p<0,05	39	Sidéradougou BF
KOB97	0,5107	0,5	5	0,053 p<0,05	16	Sidéradougou BF
NKO98	0,5605	0,5625	6	0,029 ns	16	Sidéradougou BF
NBO98	0,5328	0,3625	4,5	0,331 p<0,0001	40	Sidéradougou BF
YEN97	0,5231	0,4391	9	0,081 p<0,0001	49	Sidéradougou BF
YES97	0,4821	0,4629	7,5	0,061 ns	24	Sidéradougou BF
YEN98	0,381	0,381	6	0,024 ns	21	Sidéradougou BF
SENE	0,4978	0,4931	3,5	0,033 ns	23	Dakar SENEGAL
MALI	0,5838	0,5526	8	0,08 ns	19	Tienfala MALI
KOL96	0,4863	0,4942	6	0,016 ns	19	Samorogouan BF
PC96	0,6105	0,5593	7	0,109 ns	23	Samorogouan BF
PR96	0,566	0,3447	6	0,426 p<0,0001	12	Samorogouan BF
PC97	0,3395	0,3889	4,5	-0,087 ns	9	Samorogouan BF
KOL97	0,5212	0,4872	9	0,078 p<0,05	39	Samorogouan BF

Sur l'ensemble des échantillons, **Fis=0.131** (p<0.0001), et **Fst= 0.055** (p<0.0001).

Hexp : diversité génique de Nei ; Ho : Hétérozygotie observée ; à chaque valeur du Fis est associée la valeur du test exact du déficit d'hétérozygotes (Genepop). Les valeurs significatives sont en gras.

Sur toutes les comparaisons effectuées entre mâles et femelles d'une même population (à Sidéradougou et à Samorogouan la première année de capture), les deux sexes ne présentaient jamais de différences de fréquences alléliques significatives. En conséquence, du fait de la localisation des microsatellites sur le chromosome X, la priorité sera donnée à l'analyse des femelles sur les glossines capturées ultérieurement.

3.1.2 Analyses génétiques interpopulations

Le F_{st} (coefficient mesurant la structuration génique entre les populations) sur l'ensemble de l'échantillon (voir tableau 5) est très significatif ($p < 0.0001$) ; ce résultat indique que les génotypes des individus ne sont pas issus du même pool de gènes, certaines populations sont génétiquement distinctes des autres.

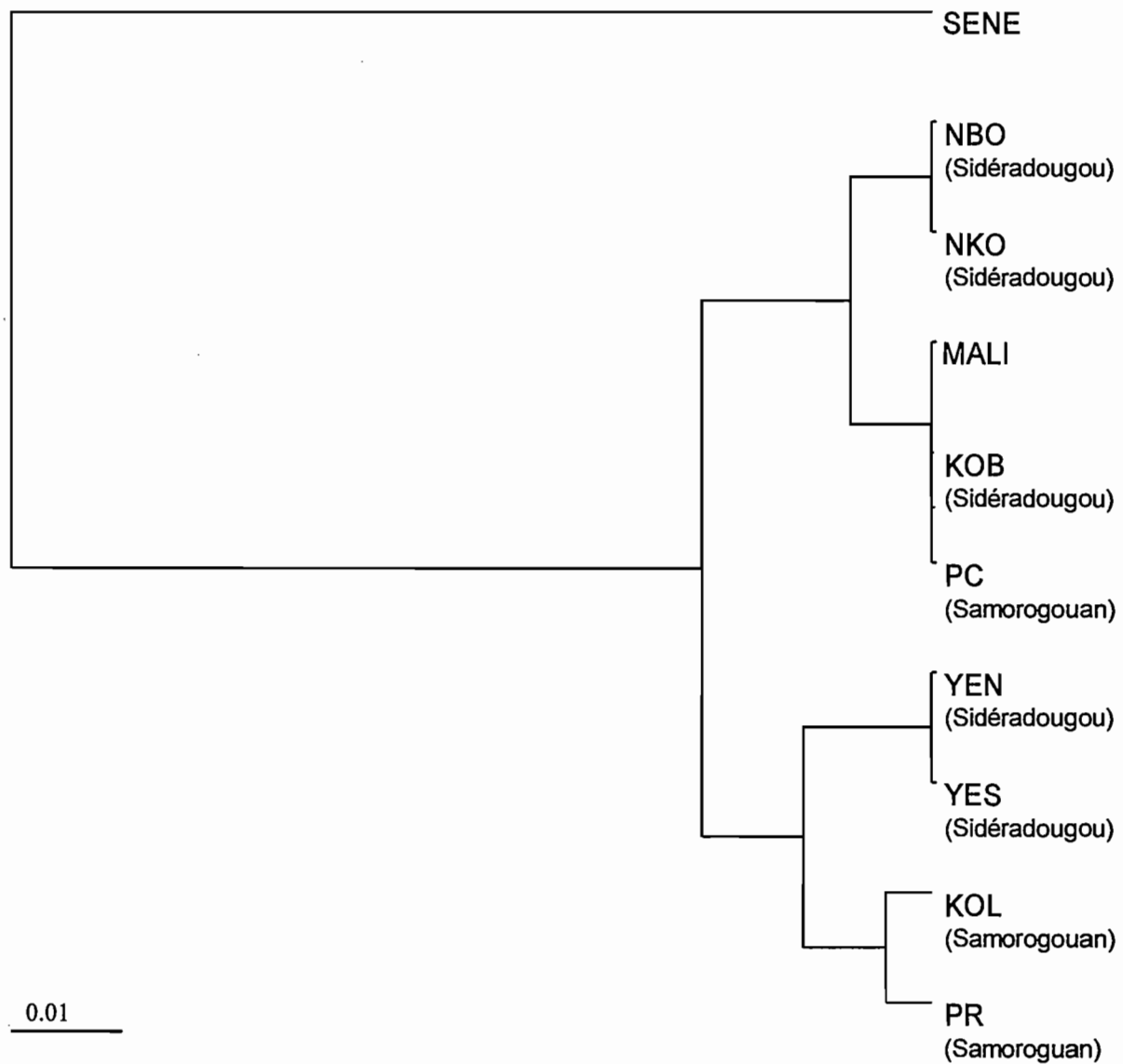
Parmi celles-ci, l'échantillon du Sénégal se différencie aisément de l'ensemble des autres glossines par des valeurs de F_{st} élevées (la plupart supérieures à 0.1, voir matrice des F_{st} en annexe 7). On peut visualiser la répartition des échantillons selon leurs ressemblances génétiques sur le dendrogramme construit à partir de la transformation de F_{st} en $F_{st}/(1-F_{st})$ (Rousset, 1997) sur toutes les populations prises sur une année, ce qui ne fait pas intervenir le facteur « temps » (Figure 13).

Ce dendrogramme nous montre que exceptées les glossines du Sénégal, très différentes de toutes les autres, les populations géographiquement voisines ne sont pas toujours celles qui sont génétiquement les plus proches.

Les différences intra-site (à Sidéradougou par exemple) sont ainsi parfois plus importantes que les différences inter-sites. La population du Mali notamment, ne montre ainsi aucune différenciation par rapport aux glossines du Burkina Faso (notons que l'on obtient le même dendrogramme avec $-\ln(1-F_{st})$ (Reynolds *et al.*, 1983).

Les résultats obtenus ne peuvent apparemment pas s'expliquer par un simple modèle d'isolement génétique des populations de *G. palpalis gambiensis* par la distance géographique (les tests de Mantel réalisés en prenant toutes les populations d'une année donnée, et en essayant de corrélérer la distance géographique à la distance génétique ne donnent aucun résultat significatif). Il semble donc que d'autres facteurs que l'éloignement géographique influent sur la structuration des populations de *G. palpalis gambiensis*.

Figure 13 :Dendrogramme représentant les distances génétiques (Fst/1-Fst) entre les populations étudiées (deux loci microsatellites en agarose) sur une année de capture.



Rappel : A Sidéradougou, on a d'ouest en est, NBO: Nyarafo Bois. NKO : Nyarafo, le long du Koba.
KOB : Le long du Koba. YEN : Yeguéré Nord. YES : Yeguéré Sud
A Samorogouan, PC et PR sont sur la Pindia, Kol plus au Nord sur un affluent.

3.1.3 Apport des analyses morphométriques

Les résultats des mesures réalisées sur les ailes de *G. palpalis gambiensis* sont présentés en annexe 6.

Les glossines du Sénégal se sont montrées significativement plus petites que les glossines de la zone de Sidéradougou :

- Les mesures du segment 2 diffèrent significativement.
- Le rapport seg1/seg2 diffère aussi significativement semblant indiquer, soit que la différence traduit une conformation distincte de l'aile, soit qu'elle concerne le positionnement de la cellule en hache.
- Cette cellule en hache est significativement plus grande chez les mouches du Burkina Faso que chez celles du Sénégal.

A l'intérieur de la zone de Sidéradougou, ces mesures n'ont montré aucune différence significative entre les glossines de Nyarafo (à l'Ouest) et celles de Yéguéré (à l'Est).

Si l'on se place maintenant au niveau des deux zones agro-pastorales étudiées au Burkina Faso, à Samorogouan et à Sidéradougou, on obtient les résultats suivants. Ces résultats sont présentés, pour chaque zone, dans l'ordre chronologique des travaux effectués sur le terrain puis au laboratoire : entomologie, parasitologie, repas de sang, et analyses PCR : caractérisation des trypanosomes puis analyse génétique des loci microsatellites.

3.2 Résultats épidémiologiques et génétiques obtenus dans la zone de Samorogouan, au Burkina Faso

3.2.1 Entomologie et parasitologie

- En décembre 1996 (saison sèche), 365 *G. palpalis gambiensis* ont été capturées avec des relevés à 24h et 48h après pose des pièges. Elles se répartissent de la manière suivante (Tableau 6).

Tableau 6 : Effectifs de *G. palpalis gambiensis* capturés à Samorogouan en décembre 1996.

Zone	mâles	femelles	indéterminés	total
Kol96	126	46	3	175
PR96	23	35	0	58
PC96	52	76	4	132
Total	201	157	7	365

Composition des captures suivant le sexe : 56% mâles, 44% femelles, soit une sex-ratio M/F= 1,27/1.

La Densité Apparente (DAP) moyenne sur la zone est de **9,6** glossines/piège/jour avec un maximum de 22 sur PC96 où une présence humaine importante est notée.

On a constaté que sur cette zone en saison sèche, le piège monoconique Vavoua a capturé 67% des *G. palpalis gambiensis* contre 33% seulement pour le biconique.

- En juin 1997 (saison des pluies), le même protocole a été réalisé mais les relevés ont été faits seulement sur 24h (sauf à KOL97) en raison des conditions difficiles d'accès dues à l'arrivée des pluies. Les effectifs capturés sont figurés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Effectifs de *G. palpalis gambiensis* capturés à Samorogouan en juin 1997.

Zone	mâles	femelles	indéterminés	total
Kol97	16	44	0	60
PR97	19	5	0	24
PC97	1	9	0	10
Total	36	58	0	94

Composition des captures suivant le sexe : 40% mâles, 60% femelles, soit sex-ratio M/F=0.68/1.

Composition spécifique des captures sur l'ensemble des saisons : 100% *Glossina palpalis gambiensis*. Aucune *G. tachinoides* et aucune *G.morsitans submorsitans* ne furent capturées alors qu'elles l'étaient régulièrement avant les opérations de lutte.

Sur 76 glossines disséquées, une seule fut trouvée infectée, uniquement dans l'intestin moyen (taux d'infection= 1.3%). La PCR fut mise en œuvre pour identifier cette infection, mais aucun signal n'est apparu avec les huit couples d'amorces testés.

3.2.2 Analyse des repas de sang

39 glossines étaient suffisamment gorgées afin de permettre l'identification de l'hôte sur lequel elles s'étaient nourries. 23 repas (soit 59%) ont été pris sur varan (*Varanus niloticus*), 7 sur bovins (18%), le reste concerne divers taxons : 2 repas sur équidés, éléphant, homme, 1 sur phacochère, oiseau, ruminant s.l. (Rayaisse , Kabore, com.pers.). Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées au Burkina Faso sur *G. palpalis gambiensis* et qui avaient montré une préférence trophique pour les reptiles. Challier, 1973 dans la forêt du Kou, aux alentours de Bobo-Dioulasso trouve 54% de repas pris sur reptiles, et Bauer *et al.* (1995) en trouvent 76% à Samorogouan.

3.2.3 Analyses génétiques à Samorogouan

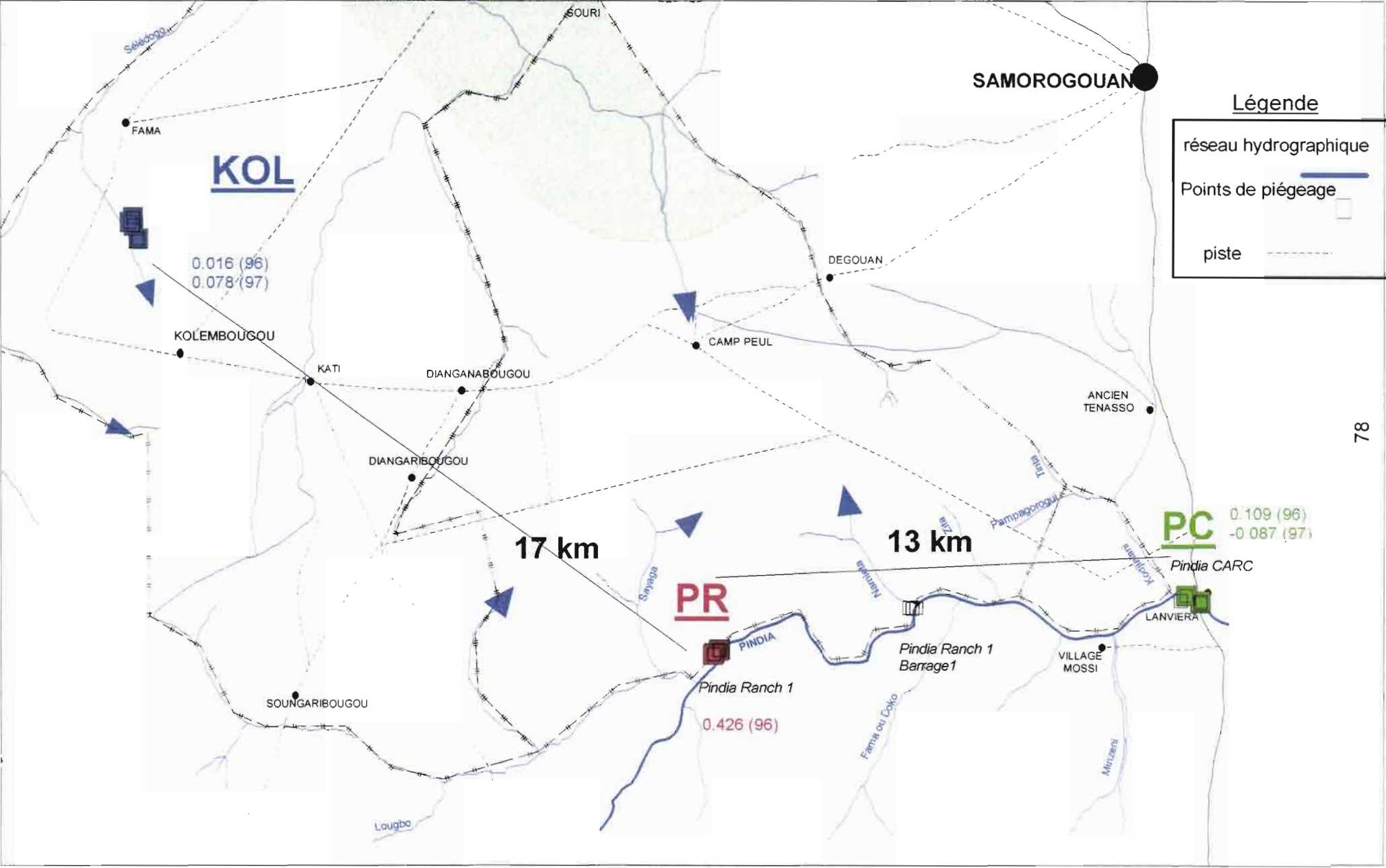
Les cinq populations analysées (en priorité les femelles) représentent un effectif de 182 *G. palpalis gambiensis*, réparties en : 112 en décembre 96 et 70 en juin 97. Respectivement 11 et 21 allèles ont été observés au locus 55.3 et 19.62 sur l'ensemble des mouches de la zone.

Le F_{is} moyen sur les femelles des cinq populations a une valeur de 0.111 ($p < 0.01$), indiquant un déficit significatif d'hétérozygotes. En ajoutant les mâles à l'analyse pour le calcul du F_{st} , on obtient une valeur moyenne de 0.012, légèrement significative ($p < 0.05$) (ceci représente le calcul sur l'ensemble des deux années).

Toutefois, si on sépare les saisons, le F_{st} n'est plus significatif; le F_{is} reste tout de même significativement élevé dans l'échantillon de décembre 1996 le long de la rivière Pindia (voir Figure 14).

Les fréquences alléliques et génotypiques ne varient pas significativement selon les localités dans cette zone ; on observe toutefois moins d'hétérozygotes que ce que l'on attendait au sein des deux populations de la Pindia (PC96, $F_{is} = +0.109$; PR96, $F_{is} = +0.426$, mais seulement sur 11 femelles). Dans cette zone, les populations échantillonnées ne semblent pas montrer de structuration génétique. Il semble que la saison des pluies permette un meilleur brassage des individus au sein de la zone, car aucune entrave au flux génique n'est observée pendant les captures du mois de juin ; nous resterons toutefois prudents en rappelant que, si aucune différence n'est mise en évidence dans cette étude, cela ne signifie pas forcément qu'elles n'existent pas, car nous ne disposons que de deux loci polymorphes.

Figure 14 : Samorogouan, valeurs du Fis par localité et par année.



3.3 Résultats épidémiologiques et génétiques obtenus dans la zone de Sidéradougou, au Burkina faso

3.3.1 Entomologie et parasitologie

3.3.1.1 A Nyarafo, ouest de la zone

* Les captures réalisées au mois de mai 1997 (fin de saison sèche chaude) ont donné les résultats suivants pour les 2 espèces collectées (les populations concernées sont NBO97 (bois), NKO97 et KOB 97 le long du lit principal du Koba).

Tableau 8 : Résultats des captures et dissections de *Glossina palpalis gambiensis* à Nyarafo en mai 1997 (fin de saison sèche chaude).

<i>Glossina p. gambiensis</i>	capturées	disséquées	prélevées pour analyse génétique	infectées
mâles	108	47	64	13
femelles	79	42	78	14
TOTAL	187	89	142	27

Taux d'infection = 30,34% Sex-Ratio M/F= 1,37
(mâles = 27,67%; femelles = 33,33%)

Glossina tachinoides

	capturées	disséquées	infectées
TOTAL	242	19	6

Nombre total de glossines capturées = 429

DAP totale = 19.06

DAP totale Gpg = 8,31

Dans cette zone de Nyarafo et à cette saison, le taux d'infection chez *G. palpalis gambiensis* est très élevé (30.3%). Il est supérieur aux chiffres habituellement rencontrés pour ce taxon, qui oscillent plutôt généralement entre 0 et 8% (Squire, 1954 ; Bauer *et al.*, 1995 ; Solano *et al.*, 1996; mais voir Djiteye, 1997). Lors des dissections, les

trypanosomes ont été rencontrés uniquement dans l'intestin moyen ou dans le proboscis (respectivement 13 et 14 cas sur 27 *G. palpalis gambiensis* infectées), mais jamais simultanément dans les deux organes ; aucun trypanosome n'a été trouvé dans les glandes salivaires.

* Captures de janvier 1998 (saison sèche froide) (Tableau 9)

Elles ont concerné les populations NBO98 et NKO98. Seule est prise en compte *G. palpalis gambiensis* (45 *G. tachinoides* ont également été capturées).

Tableau 9 : Résultats des captures et dissections de *Glossina palpalis gambiensis* à Nyarafo en janvier 1998 (saison sèche froide).

	capturées	disséquées	prélevées pour analyse génétique	infectées
mâles	143	16	16	0
femelles	101	53	56	5
TOTAL	244	69	72	5

Taux d'infection =	7%	Sex-Ratio M/F= 1.41
(mâles = 0%; femelles = 9.4%)		

La DAP totale *G. palpalis gambiensis* en janvier 1998= **31,48**, avec une densité très forte sur l'un des pièges situés dans le bois (96 glossines/piège/jour).

Les taux d'infection des mâles et des femelles ne diffèrent pas significativement.

3.3.1.2 A Yéguéré, est de la zone

* En mars 1997, les captures suivantes ont été faites du côté est, le long de la rivière Koba (les populations concernées sont YEN97 et YES97) (tableau 10).

Tableau 10 : Résultats des captures et des dissections de *G. palpalis gambiensis* à Yéguéré, mars 1997 (saison sèche chaude).

	capturées	disséquées	prélevées pour génétique	infectées
mâles	66	18	52	0
femelles	95	21	77	2
TOTAL	161	39	129	2
Taux d'infection = 5,13%		Sex-Ratio		
(mâles = 0%; femelles = 9,5%)		M/F= 0.69		

Egalement 140 mâles et 22 femelles *G. tachinoides* ont été capturées.

La DAP de *G. palpalis gambiensis* était inférieure à 5 glossines/piège/jour.

- En janvier 1998, uniquement la partie nord de la localité a été de nouveau prospectée (YEN98), avant le croisement avec le Tolé.

Tableau 11 : Résultats des captures et des dissections de *G. palpalis gambiensis* à Yéguéré, janvier 1998 (saison sèche froide).

Gpg capturées	prélevées pour génétique	disséquées	infectées
21 f	21 f	11 f	0
7 m	7 m	7 m	0
total 28	28	18	0
DAP : 3,73	Sex-Ratio		
	M/F= 0.33		

Les densités étaient très faibles, et parmi les glossines disséquées aucune n'a montré de trypanosomes.

Notons que les sex-ratio des capturées sont en faveur des mâles à Nyarafo, des femelles à Yéguéré.

3.3.2 Caractérisation par PCR des trypanosomes présents chez Glossina palpalis gambiensis

3.3.2.1 A Nyarafo

* Sur les 27 infections décelées en 1997, 15 ont donné un signal PCR spécifique du couple d'amorces utilisé, à la taille attendue. Les 12 cas non identifiés sont tous des infections de l'intestin moyen uniquement.

Sur ces 15 glossines dont l'infection a été identifiée, 13 étaient infectées par *T. vivax* (dans le proboscis), dont une qui avait une infection mûre mixte (*T. congolense* « forêt »/*T. vivax*), et 2 étaient infectées dans l'intestin moyen par *T. congolense* type forêt.

* Les glossines infectées en 1998 l'étaient uniquement dans l'intestin moyen, la PCR n'a permis d'identifier aucune des 5 infections.

Rappelons qu'à Nyarafo, des glossines sont capturées dans le bois sur l'affluent du Koba, et aussi le long du cours principal de la rivière. De toutes les glossines capturées uniquement dans le bois de Nyarafo lors de ces deux enquêtes (1997 et 1998), et qui étaient infectées (soit 16 *G. palpalis gambiensis*), 14 étaient infectées uniquement dans l'intestin moyen. Sur ces dernières, les analyses PCR n'ont pas permis d'identifier les trypanosomes présents dans 13 cas (la 14^e infection étant due à *T. congolense* forêt).

3.3.2.2 A Yéguéré

En mars 1997, les deux *G. palpalis gambiensis* infectées l'étaient uniquement dans le proboscis (au microscope). La PCR a permis d'identifier deux infections à *T. vivax*, dont l'une était mixte avec *T. congolense* « forêt » dans l'intestin moyen.

3.3.3 Taux d'infection et caractérisation des trypanosomes chez les animaux des producteurs locaux

Parallèlement aux deux enquêtes entomologiques, des prélèvements ont été réalisés dans des élevages de la zone, à Nyarafo et à Yéguéré (voir aussi de La Rocque, 1996). Un total de 123 prélèvements ont été réalisés (voir Tableau 12).

Nous ne discuterons pas de ces résultats en termes réels de prévalence, car ils ont été réalisés souvent à la demande des éleveurs, dont certains étaient soucieux de l'état sanitaire de leurs animaux. On peut simplement constater que cette inquiétude était justifiée, notamment sur les animaux de Nyarafo dont plus de 50% ont été trouvés infectés à l'examen microscopique.

Tableau 12 : Répartition des prélèvements et des infections décelées selon les hôtes mammifères.

Animaux prélevés	Nyarafo (ouest)	Infectés (au mlcroscope)	Yéguéré (est)	Infectés (au mlcroscope)
bovins	49	28	38	4
caprins	9	3	4	1
ovins	2	1	12	1
porcins	2	0	4	0
chiens	0	0	3	0

En PCR, seuls les animaux trouvés infectés ou dont l'hématocrite était inférieur à 25 (signe d'une forte anémie) ont été analysés (83 animaux). Ces prélèvements ont surtout apporté les informations suivantes :

- Sur l'ensemble de la zone et uniquement sur les bovins, 64% des trypanosomes identifiés appartiennent au groupe savane de *T. congolense*, suivi par *T. vivax* (16%). Chez les petits ruminants (seulement 15 analyses PCR), *T. vivax* représente le taxon majoritaire (46%) (à Nyarafo, c'est le seul trypanosome trouvé sur ces mammifères).
- La PCR s'est révélée un outil très efficace pour l'identification des parasites circulants (90% d'identification chez les animaux infectés), mais surtout sur les animaux trouvés négatifs en microscopie et qui avaient un hématocrite inférieur à 25 : 50% d'entre eux ont été trouvés positifs par l'examen PCR (Lefrançois *et al.*, 1998a).

3.3.4 Analyse des repas de sang

Sur l'ensemble de la zone lors des prospections effectuées dans le cadre du présent travail, 21 repas de sang ont pu être identifiés. La source la plus fréquente de nourriture

pour *G. palpalis gambiensis* a été les reptiles (notamment le varan) à 38%, suivie des Suidés (24%), et divers autres animaux en moindre quantité dont les bovins et l'homme.

L'année précédente sur l'ensemble de la saison sèche dans la zone de Sidéradougou, de La Rocque (1996) avait aussi trouvé un taux d'infection relativement élevé (12.1%) chez *G. palpalis gambiensis*. Les reptiles constituaient la majorité des sources de repas de sang identifiées (34.5% sur 233 résidus collectés), et parallèlement beaucoup des infections de l'intestin moyen (71%) n'avaient pas été identifiées par la PCR (Lefrançois et al., 1998a).

Cette situation contraste avec celle présente chez l'autre espèce de la zone, *G. tachinoides*, chez qui la majorité des infections sont dues à *T. vivax* (47%) et qui semble montrer une préférence trophique pour les ruminants (46.3%) (Lefrançois et al., 1998a).

3.3.5 Synthèse des données épidémiologiques recueillies sur les glossines dans la zone de Sidéradougou

En analysant finement la situation d'un point de vue spatial, de La Rocque (1997) met en évidence deux situations épidémiologiques distinctes entre l'ouest et l'est de la zone chez *G. tachinoides* :



- A l'Ouest (Nyarafo), les glossines se nourrissent essentiellement sur reptiles et suidés, et sont infectées essentiellement dans l'intestin moyen, par des trypanosomes dont la majorité ne donne pas de signal PCR avec les amorces utilisées ; nous attribuons ces infections en majorité à des trypanosomes de reptiles (Lefrançois et al., 1998a).
- A l'Est (Yéguéré), les glossines piquent préférentiellement les bovins et sont infectées par des trypanosomes pathogènes.

Les données du présent travail, indiquent le même type de « structuration épidémiologique » chez *G. palpalis gambiensis* ; en effet, si nous cumulons les données acquises sur les dissections de *G. palpalis gambiensis* en 1996, 1997 et 1998, nous obtenons les résultats suivants.

Tableau 13 : Taux d'identification par PCR des infections trouvées chez *G. palpalis gambiensis*

Pourcentage d'identification de l'infection par PCR	Zone ouest (Nyarafo)	Zone est (Yéguéré)
<i>G. palpalis gambiensis</i>	28/117 (23,9%)	7/8 (87.5%)

note : Le nombre d'identifications par PCR est rapporté aux glossines infectées.

Ce tableau montre aussi que très peu de *G. palpalis gambiensis* infectées ont été trouvées côté est, indiquant que les taux d'infection par examen microscopique diffèrent également, ce qui n'était pas le cas chez *G. tachinoides*.

3.3.6 Analyses génétiques

Un total de 360 glossines ont été analysées aux deux loci, dont 260 en 1997 et 100 en 1998. Cet écart entre les deux années est dû au fait que nous avons choisi de ré-échantillonner en 98 les 3 lieux qui nous avaient paru les plus intéressants après les résultats obtenus sur l'année 97 : NBO, NKO et YEN.

Tableau 14 : Rappel des Résultats génétiques pour chaque population à Sidéradougou sur deux loci en agarose chez les femelles.

Population	F_{is} p	Nbre de femelles analysées
NBO97	0.272 <0.0001	21
NKO97	0.198 <0.05	39
KOB97	0.053 ns	16
NBO98	0.331 <0.0001	40
NKO98	0.029 ns	16
YEN97	0.081 <0.001	49
YES97	0.061 ns	24
YEN98	0.024 ns	21

Note : les valeurs significatives du F_{is} ($p < 0.05$) sont en gras.

Le tableau 14 restreint à la zone de Sidéradougou les résultats généraux montrés dans le tableau 5. Il montre que des valeurs significatives du F_{is} sont obtenues, notamment du

côté ouest de la zone (NBO97, NBO 98, NKO97 ; mais aussi YEN97 à l'est, voir la carte Figure 15). La valeur moyenne pour l'ensemble de la zone sur les deux années est de 0.155 et est hautement significative ($p < 0.0001$). Elle s'accompagne, lorsqu'on inclut les mâles, d'un indice F_{st} de 0.045, lui aussi hautement significatif ($p < 0.0001$), indicateur d'une structuration génétique des populations de glossines capturées dans la zone.

Lorsqu'on examine l'ensemble de la zone par année, la différenciation entre les localités persiste de manière significative, $F_{st97} = 0.029$ ($p < 0.0001$) ; $F_{st98} = 0.072$ ($p < 0.0001$). Entre les 3 localités ouest (NBO, NKO, KOB) et les 2 localités est (YEN et YES), $F_{st} = 0.04$, $p < 0.0001$; si on prend ce F_{st} à l'intérieur de ces deux ensembles, les valeurs ne sont plus significatives. La matrice des F_{st} entre paires de populations dans cette zone de Sidéradougou est illustrée par le dendrogramme de la Figure 16.

Figure 15 : Valeurs du Fis chez *G. palpalis gambiensis* dans la zone de Sidéradoukou.

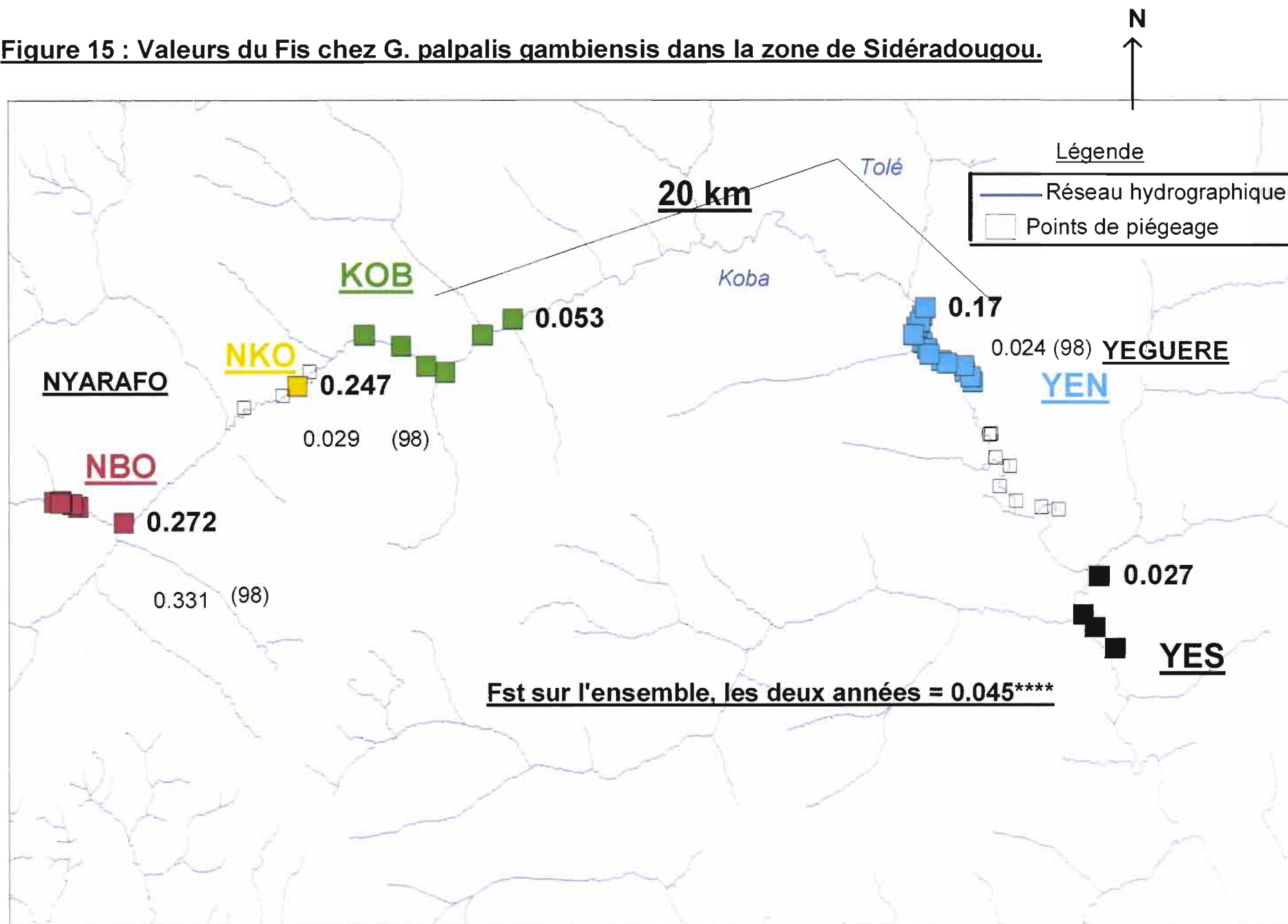
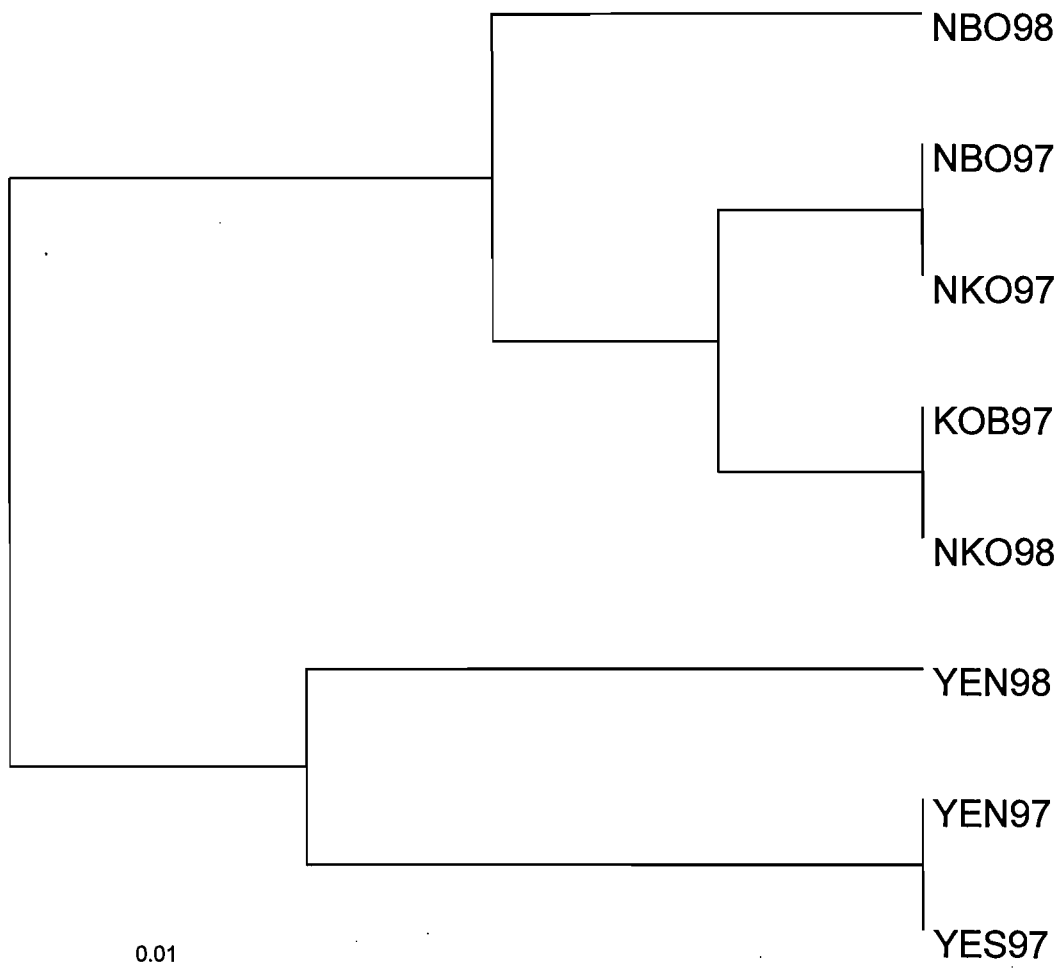


Figure 16 : Dendrogramme représentant les valeurs du Fst chez *G. palpalis gambiensis* dans la zone de Sidéradougou en 1997 et 1998



NBO= Nyarafo bois, NKO= Nyarafo le long du Koba, KOB= le long du Koba entre Nyarafo et Yéguéré
YEN= Yéguéré Nord, YES= Yéguéré Sud.

Ces premiers résultats avec les deux loci en agarose sont donc en faveur d'une structuration des populations de *G. palpalis gambiensis* sur une échelle de quelques kilomètres sur le réseau hydrographique du Koba à Sidéradougou, avec des populations génétiquement distinctes entre l'ouest et l'est de la zone.

Entre années, au même site, les valeurs de F_{st} ne sont pas significatives, semblant indiquer peu de changement dans la structure des populations selon la saison et aussi des mouvements limités au sein des populations étudiées.

En conclusion de cette première analyse sur l'ensemble de l'échantillon, nous pouvons tirer les enseignements suivants :



- les deux loci microsatellites polymorphes apportent chacun une information indépendante et cumulable, avec l'inconvénient d'avoir un locus (55.3) moins informatif que l'autre (19.62).
- les mâles et les femelles dans chaque population ne sont pas différents génétiquement, ce qui autorise à prélever plus de femelles afin d'avoir une information complète sur les deux loci situés sur le chromosome X.
- certains résultats génétiques soulèvent des interrogations auxquelles nous n'avons pour le moment pas de réponse :
 - * il faudrait être capable d'expliquer les F_{is} significativement élevés à NBO, NKO et YEN en 97, et qui le sont restés en 98 pour NBO, dans la zone de Sidéradougou;
 - * des différences entre les populations sont aussi mises en évidence, et à ce stade de l'analyse, on peut déjà affirmer qu'au niveau intraspécifique, les glossines du Sénégal se différencient du reste de l'échantillon. En revanche, lorsqu'on descend à une échelle spatiale plus fine, bien que l'on soit capable de déceler des différences entre populations conspécifiques d'un terroir donné sur une échelle de quelques kilomètres (zone de Sidéradougou, par exemple), des populations géographiquement plus lointaines (Mali) viennent « s'intercaler » sur le dendrogramme, entre les branches des populations du Burkina Faso.

Pour expliquer ces résultats, nous présentons deux types d'hypothèses, généralisables à d'autres organismes dans un premier temps, dont nous discuterons en particulier pour les glossines plus loin .

a) Hypothèse biologique

Une hypothèse classique, visant à expliquer les F_{is} significatifs, est connue sous le nom d'**effet Wahlund** : le fait de regrouper artificiellement deux populations en équilibre de Hardy-Weinberg mais qui sont génétiquement distinctes génère automatiquement un déficit en hétérozygotes dans la population regroupée (in Hartl & Clark, 1989). Ce regroupement artificiel peut être dû à différents facteurs :

- *stratégie d'échantillonnage* : regroupement de populations spatialement, ou temporellement distinctes ;
- *mélange d'espèces* : deux ou plusieurs espèces cryptiques vivant en sympatrie, n'échangeraient donc pas de gènes ;
- *mode de reproduction* : croisements entre individus apparentés (consanguinité) ou accouplements systématiques entre génotypes semblables (homogamie).

b) Hypothèse technique

Elle peut être la conséquence des mécanismes suivants.

- l'existence d'allèles nuls, qui nous ferait prendre des vrais hétérozygotes pour des homozygotes apparents ; ces allèles nuls peuvent refléter des mutations (insertion, délétion, substitution) dans la séquence flanquant le motif microsatellite et peuvent affecter l'efficacité de l'hybridation entre les amorces et l'ADN (Koorey *et al.*, 1993 ; Callen *et al.*, 1993 ; Gertsch *et al.*, 1995) et surgissent notamment lorsque les amorces désignées pour la PCR sont placées au voisinage immédiat du motif répété. Pour pallier ce type de problèmes, une solution possible consiste à redéfinir des amorces plus éloignées du motif, réamplifier les échantillons, et observer si le déficit d'hétérozygotes diminue après cette nouvelle analyse (Paetkau & Strobeck, 1995); c'est par exemple ce qui a été fait dans une étude récente sur les simules (Dumas *et al.*, 1998). Dans le présent travail, nous étions dans l'impossibilité de redéfinir des amorces à cause du manque de place entre le site d'insertion et la séquence microsatellite.

- certains hétérozygotes pour des allèles différant d'un grand nombre de répétitions pourraient être amplifiés à des vitesses différentes lors de la réaction PCR, et ne seraient pas visibles lors de la révélation (Wall *et al.*, 1993). La réalisation de PCR asymétriques (dans laquelle une des deux amorces est présente en quantité très supérieure à l'autre) peut résoudre ce type de problèmes (DeMeeus, com.pers.). D'autre part, pour expliquer le manque de différenciation entre les glossines du Mali et celles du Burkina Faso, à part le nombre réduit de loci étudiés, on peut évoquer l'existence de contraintes pesant sur la taille des allèles (Nauta & Weissing, 1996), qui limiterait le potentiel de différenciation génétique aux loci microsatellites entre populations ayant divergé depuis longtemps (voir aussi Garza *et al.*, 1995).
- la présence d'hétérozygotes d'allèles proches, ne différant par la taille que par une ou deux unités de répétition (soit 2 ou 4 nucléotides) ; le support employé pour la révélation des produits PCR (agarose 4%) ne nous aurait pas permis de détecter ces hétérozygotes lorsqu'ils étaient présents, augmentant ainsi artificiellement les valeurs du F_{is} . Précisons que ce type de révélation en agarose 4% avait déjà été utilisé dans d'autres études pour révéler des allèles microsatellites (Goldstein & Clark, 1995).

Pour tester cette dernière hypothèse, nous avons donc décidé de refaire une analyse de ces allèles microsatellites en gel de polyacrylamide 10% sur le locus 19.62, le plus informatif. Les résultats présentés vont donc tenir compte des génotypes aux deux loci, le premier étant toujours pris en compte par l'interprétation en agarose. Nous partons de l'idée suivante : l'agarose étant *a priori* le moins résolutif, les différences observées entre les bandes reflètent une différence réelle, voire sous-estimée, des variations interpopulationnelles. Au pire, nous sommes passés « à côté » d'autres différences existant, mais invisibles en agarose. Nous n'avons donc pas inféré d'erreurs lors de la première interprétation, mais nous obtenons sans doute moins d'informations que ce qui existe réellement, d'autant que nous avons utilisé seulement deux loci. Nous avons donc ajouté le troisième locus (69.22) à l'analyse des génotypes des glossines, uniquement de la zone de Sidéradougou pour des raisons logistiques.

Au niveau de l'analyse intrapopulationnelle, nous soupçonnons que les déficits apparents d'hétérozygotes sont dûs, en partie au moins, au manque de résolution de l'agarose pour des échelles aussi fines de taille.

3.4 Résultats supplémentaires obtenus avec les microsatellites

3.4.1 Sur l'ensemble des populations

Nous avons choisi de refaire l'analyse sur six populations que nous considérons représentatives de l'échantillon, par la taille de leur effectif, les questions soulevées dans les pages précédentes, la quantité d'informations recueillies à leur sujet, et leur origine géographique.

On peut résumer la différence entre les deux techniques par le tableau suivant où sont indiqués les changements de valeur du F_{is} moyen sur les deux loci selon les populations concernées :

Tableau 15 : Comparaison des valeurs du F_{is} obtenues selon le support de révélation des allèles.

Population	nbre de femelles	F_{is} « agarose »	F_{is} « acrylamide »
NBO97 (bois de Nyarafo)	20	0.272	0.231
NKO97 (Réseau du Koba près du bois)	39	0.198	0.124
NBO98 (bois de Nyarafo)	38	0.331	0.271
YEN97 (Yéguéré, est de la zone de Sidéradougou)	45	0.081	-0.006
PC96 (Samorogouan)	18	0.109	0.088
MALI	17	0.080	0.037
Ensemble échantillon	232	0.181	0.124

Note : l'effectif total figuré ($n=232$) tient compte des mâles ré-analysés, mais le F_{is} est mesuré uniquement sur les femelles.

Toutes les valeurs du F_{is} diminuent lorsque les allèles sont révélés en polyacrylamide, certaines devenant de plus, non significatives (NKO et YEN). Le F_{is} moyen sur l'ensemble de l'échantillon diminue aussi, mais reste hautement significatif ($p < 0.0001$).

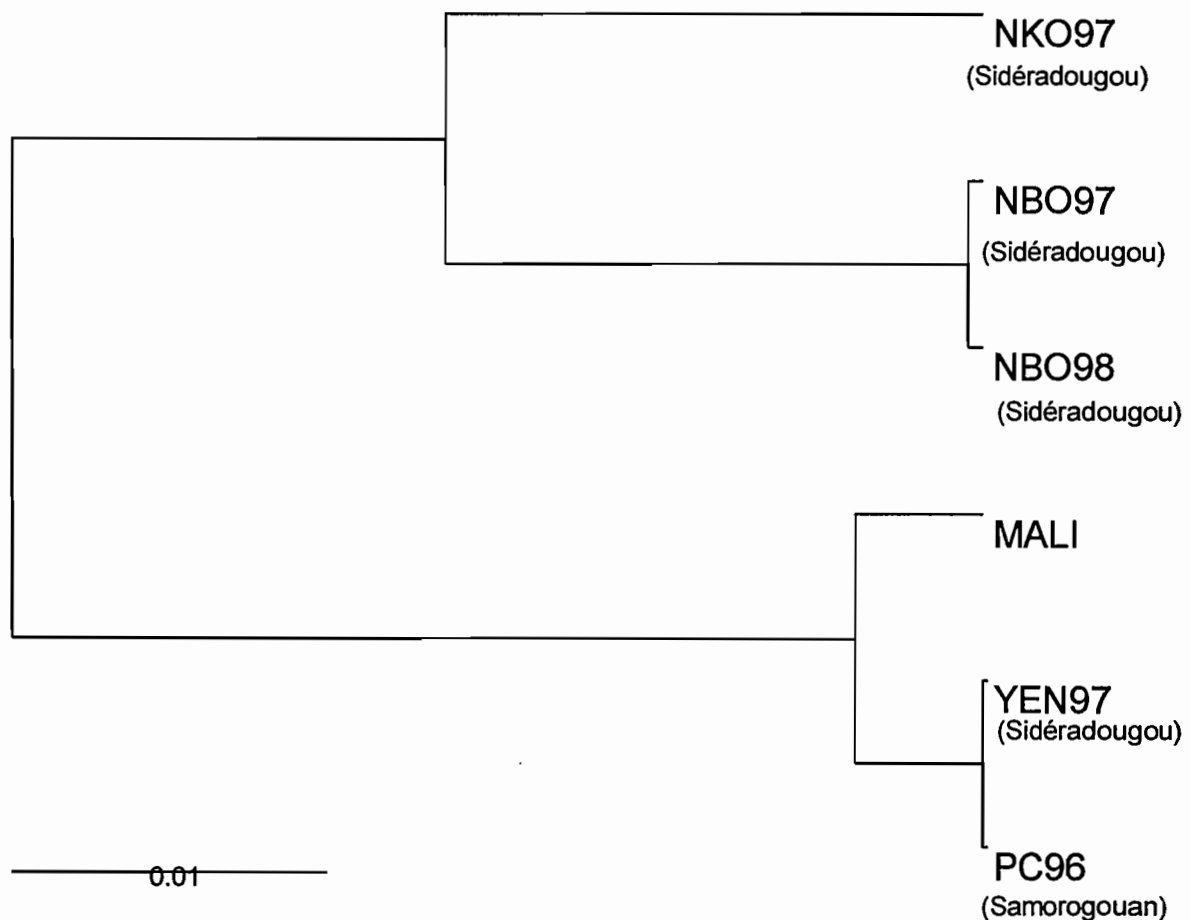
Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle dans notre étude, l'agarose n'était pas assez résolutif pour révéler des hétérozygotes d'allèles microsatellites proches par la taille.

Tenant compte de ces nouveaux résultats, nous allons pouvoir élaborer des hypothèses plus solides afin d'expliquer les points où subsistent des interrogations. Au niveau des relations entre les populations, le F_{st} moyen reste du même ordre que celui trouvé en agarose et indique une valeur hautement significative (**$F_{st}=0.034$** , $p < 0.0001$) entre les différents groupes d'individus, confirmant l'existence d'une structuration des populations.

On peut illustrer ces relations en construisant un dendrogramme basé sur la distance génétique de Nei entre ces six populations (Figure 17). On obtient la même représentation en utilisant les autres paramètres déjà décrits, mais l'avantage de la distance de Nei est qu'on peut la comparer facilement à d'autres études. Cette représentation nous permet de voir une différenciation entre les populations de Nyarafo, groupées ensemble dans la partie haute, et le groupe formé des trois populations restantes, à l'intérieur duquel aucune différence n'est observée entre Yéguéré (est Sidéradougou) et Samorogouan. La population du Mali est mieux individualisée maintenant, mais elle reste proche ($d_{Nei} < 0.01$) de ces deux dernières.

Après cette nouvelle analyse, on a ainsi dans Sidéradougou, une subdivision génétique des populations de *G. palpalis gambiensis* entre l'ouest de la zone (qui présente de plus de fortes valeurs du F_{is}), et l'est, où les glossines restent génétiquement peu différentes de populations beaucoup plus éloignées géographiquement (Samorogouan, et le Mali). Dans ce dernier groupe, les populations paraissent se reproduire comme des unités panmictiques car aucun déséquilibre n'est détecté par rapport aux proportions attendues en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg.

Figure 17 :Dendrogramme représentant les distances de Nei entre les six populations (locus 19.62 en polyacrylamide).



NBO= Nyarafo bois, NKO= Nyarafo le long du Koba, à l'ouest de la zone de Sidéradougou
YEN= éguéré Nord, côté Est de Sidéradougou; PC= Pindia Camp, à Samorogouan.



En résumant l'ensemble des résultats obtenus sur ces deux loci polymorphes, on voit émerger trois groupes génétiques dans les populations étudiées de *G. palpalis gambiensis* en Afrique de l'Ouest :

les glossines de la région des « niayes » au Sénégal, très différentes des autres, avec des distances de Nei élevées, comprises entre 0.10 (avec le Mali) et 0.30-0.40 (avec les populations du sud-ouest du Burkina Faso). Cette distinction est renforcée par les résultats de l'analyse morphométrique, qui nous indique que les glossines prises au Sénégal sont significativement plus petites que celles de Sidéradougou.

la population de Nyarafo, dans la zone de Sidéradougou, est différente des glossines situées à une vingtaine de kilomètres dans la même zone, à Yéguéré ; mais des éclaircissements restent à apporter sur sa structure génétique, et sur les forts déficits en hétérozygotes observés au sein de ces populations.

le troisième groupe rassemblerait les glossines de Yéguéré, de Samorogouan, et du Mali. Ces populations restent pratiquement « indifférenciables » dans le cadre de notre étude.

Ces résultats nous amènent à essayer d'analyser les flux géniques et leurs implications sur l'épidémiologie de la trypanosomose dans la zone de Sidéradougou, en incluant les autres couches d'informations recueillies dans le cadre de l'ATP, ainsi que les résultats obtenus sur le troisième locus dans la zone de Nyarafo où subsistent des points obscurs.

3.4.2 Dans la zone de Sidéradougou, deux échelles spatiales de structuration génétique des populations de *Glossina palpalis gambiensis*

3.4.2.1 Entre l'ouest et l'est de la zone

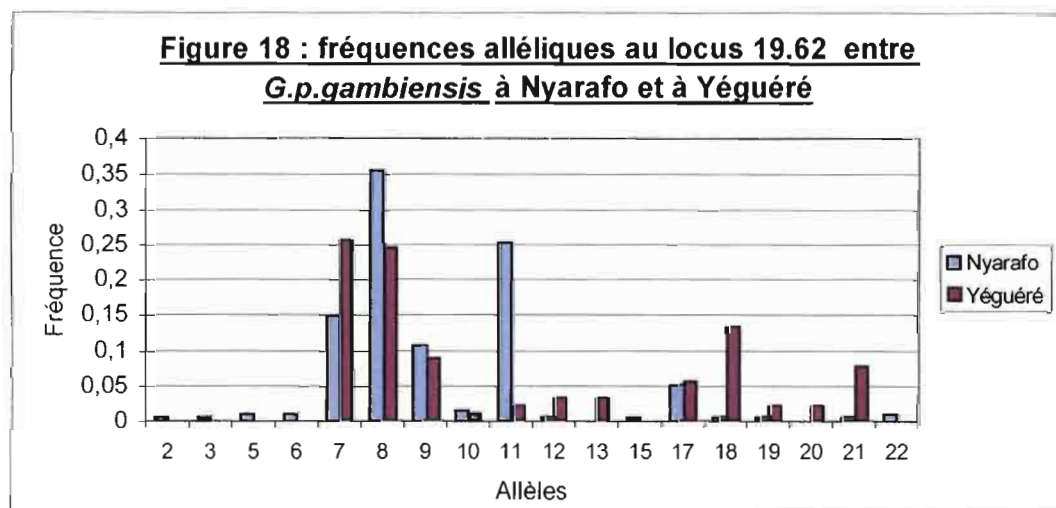
Avec les informations recueillies sur les deux loci polymorphes, les glossines capturées dans la zone de Sidéradougou semblent montrer une différenciation génétique entre l'Ouest et l'Est du réseau hydrographique du Koba. Si on regroupe les populations de l'ouest (97 femelles) et qu'on les compare avec les mouches de Yéguéré (est, 45 femelles), on obtient :

F_{is} ouest=0.224 ; F_{is} est=-0.006 ; F_{is} moyen=0.153 ($p<0.0001$)

F_{st} moyen=0.039 ($p<0.0001$)

On peut visualiser cette différenciation par un graphique représentant les fréquences alléliques des deux groupes de populations au locus 19.62 (Figure 18).

Le F_{st} obtenu équivaldrait, en terme de flux génique entre le côté ouest et est de la zone, à un échange de 6,13 individus par génération. Ceci représente le calcul du nombre de migrants : $Ne*m=(1-F_{st})/4*F_{st}$, estimation du flux génique dans un modèle en îles (Wright, 1969) entre paires de populations à l'équilibre mutation/dérive.



Rappelons aussi qu'avaient été trouvées, chez *G. palpalis gambiensis*, des différences dans les taux d'infection entre l'ouest et l'est de la zone, mais aussi dans l'identification des trypanosomes infectant ces glossines, et dans le sex-ratio des captures.

3.4.2.2 Le cas particulier du bois de Nyarafo

L'analyse du troisième locus (69.22) a été mise en œuvre sur les trois populations de Nyarafo, situées à l'ouest de la zone (NBO97, NBO98, NKO97), qui montraient de fortes valeurs du F_{is} et qui sont regroupées ensemble sur le dendrogramme (voir Tableau 16). Les trois loci montrent respectivement 8, 18, et 8 allèles sur l'ensemble des 147 individus. Contrairement aux deux autres loci, des mâles sont trouvés hétérozygotes au 3^e locus indiquant que ce locus est situé sur un autosome.

Tableau 16: Résultats génétiques obtenus en combinant les trois loci microsatellites.

Pop	H exp.	H obs.	Nbre moyen d'allèles/locus	Nbre femelles analysées	Valeur F_{is} (p)
NBO97	0,6314	0,4665	6	19	0,297 $p < 0,01$
NKO97	0,5272	0,5049	7	38	0,059 ns
NBO98	0,5721	0,4284	6,67	40	0,267 $p < 0,0001$

Rappelons que NBO est constitué principalement par les glossines du bois de Nyarafo, alors que NKO abrite des mouches capturées le long du réseau principal du Koba à un peu plus de 5 km du bois.

Le F_{is} moyen sur les trois échantillons est de **0.20 ($p < 0.0001$)** et le $F_{st} = 0.022$ ($p < 0.01$), indiquant une légère différenciation génétique dans ce groupe de « populations ». Aucun déséquilibre de liaison entre les trois loci pris deux par deux n'est observé sur cet échantillon.

Revenons à présent sur les hypothèses pouvant expliquer ce très fort déséquilibre par rapport aux proportions attendues en cas de panmixie.

- D'un point de vue technique, seule la présence d'allèles nuls à une forte fréquence pourrait expliquer un aussi fort déséquilibre ; il nous faudrait alors admettre que ces allèles ne sont plus du tout présents à NKO, ce qui paraît peu probable d'après le peu de structuration observée entre les groupes NBO et NKO. On peut toutefois calculer la fréquence de l'allèle nul nécessaire à expliquer le déficit d'hétérozygotes dans chacune des populations. Pour cela, deux calculs sont possibles :

- celui de Chakraborty *et al.* (1992) : si r = fréquence allèle nul, $r = (H_e - H_o) / (H_e + H_o)$
- celui de Brookfield (1996) : $r = (H_e - H_o) / (1 + H_e)$.

La différence entre les deux méthodes vient du fait qu'on compte comme un résultat (Brookfield, 1996) ou comme un problème technique (Chakraborty *et al.*, 1992) le fait de

ne pas obtenir de signal PCR sur un individu donné à un locus considéré. Dans le premier cas, le résultat se traduit comme un homozygote pour l'allèle nul.

Dans notre cas, le fait d'avoir deux loci sur le chromosome X facilite les calculs, car pour les mâles, la fréquence allélique est égale à la fréquence génotypique.

Nous prenons par exemple la population NBO97, qui présente un F_{is} de 0.29 au locus 19.62, et un F_{is} de 0.37 au locus 69.22, où 24 mâles ont été analysés. Les calculs pour les deux formules sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Calculs de la fréquence de l'allèle nul (r) attendue pour expliquer le F_{is} .

	Locus 19.62	Locus 69.22
r (Chakraborty <i>et al.</i>)	0.17	0.23
nb mâles « nuls » attendus	4	3
r (Brookfield)	0.126	0.15
nb mâles « nuls » attendus	5.5	3.6

Or, les 24 mâles analysés ont tous donné un produit PCR au locus considéré. L'existence d'un ou plusieurs allèles nuls ne semble pas, dans notre cas, expliquer les déficits d'hétérozygotes rencontrés.

- D'un point de vue biologique, nous éliminons de prime abord les phénomènes d'homogamie et d'autofécondation, qui 1) diminueraient le polymorphisme à un niveau plus bas que celui observé ; 2) n'ont jamais été décrits chez les glossines, du moins en ce qui concerne les phénomènes d'autofécondation.

Nous allons donc chercher ce qui pourrait causer un éventuel effet Wahlund. Comment mettre en évidence son existence? La seule manière de prouver qu'il existe est d'obtenir deux (ou plus) populations qui auraient chacune un F_{is} très faible (unité panmictique) et un F_{st} très élevé entre elles (génétiquement distinctes). En d'autres termes, nous allons essayer (et l'on va voir comment) d'identifier des populations panmictiques génétiquement distinctes qui auraient été regroupées artificiellement. Les hypothèses biologiques sous-jacentes incluent une différenciation de populations qui pourraient par exemple être dues :

1. à des glossines infectées dans l'intestin moyen versus non-infectées (lien avec la présence de R.L.O.). Maudlin *et al.* (1990) ont en effet observé au Liberia une forte association entre ces RLO (connus pour l'importance de leur rôle dans l'acquisition de l'infection) et le taux d'infection trypanosomienne chez *G.p. palpalis*. Or ces RLO sont transmis par la mère à sa descendance, et sont présents en quantité variable dans les populations naturelles. Il se pourrait que des glossines ayant ces RLO aient tendance à se reproduire préférentiellement entre elles.

2. à des glossines se nourrissant sur reptiles versus sur mammifères ;

3. à la stratégie d'échantillonnage : une aire spatiale trop importante, couverte par des populations définies sur un ensemble de plusieurs pièges, engloberait plusieurs dèmes échangeant peu de gènes entre eux.
4. à des glossines occupant une niche écologique différente (espèces différentes ?)
5. à des glossines ayant un mode de reproduction particulier (croisement systématiques entre apparentés).
6. à des glossines ayant migré récemment en provenance d'aires géographiques distinctes.

Les deux premières hypothèses sont difficiles à tester pour des raisons de taille d'échantillon, le nombre de glossines infectées ou ayant un repas de sang identifié étant relativement faible (en terme de nombre d'individus); nous avons toutefois vérifié que le F_{is} ne diminuait pas dans chacune des deux parties testées, de même que le F_{st} n'était pas élevé entre ces deux parties. Dans le cadre de notre étude, rien ne permet de les retenir comme facteur explicatif du déficit d'hétérozygotes observé.

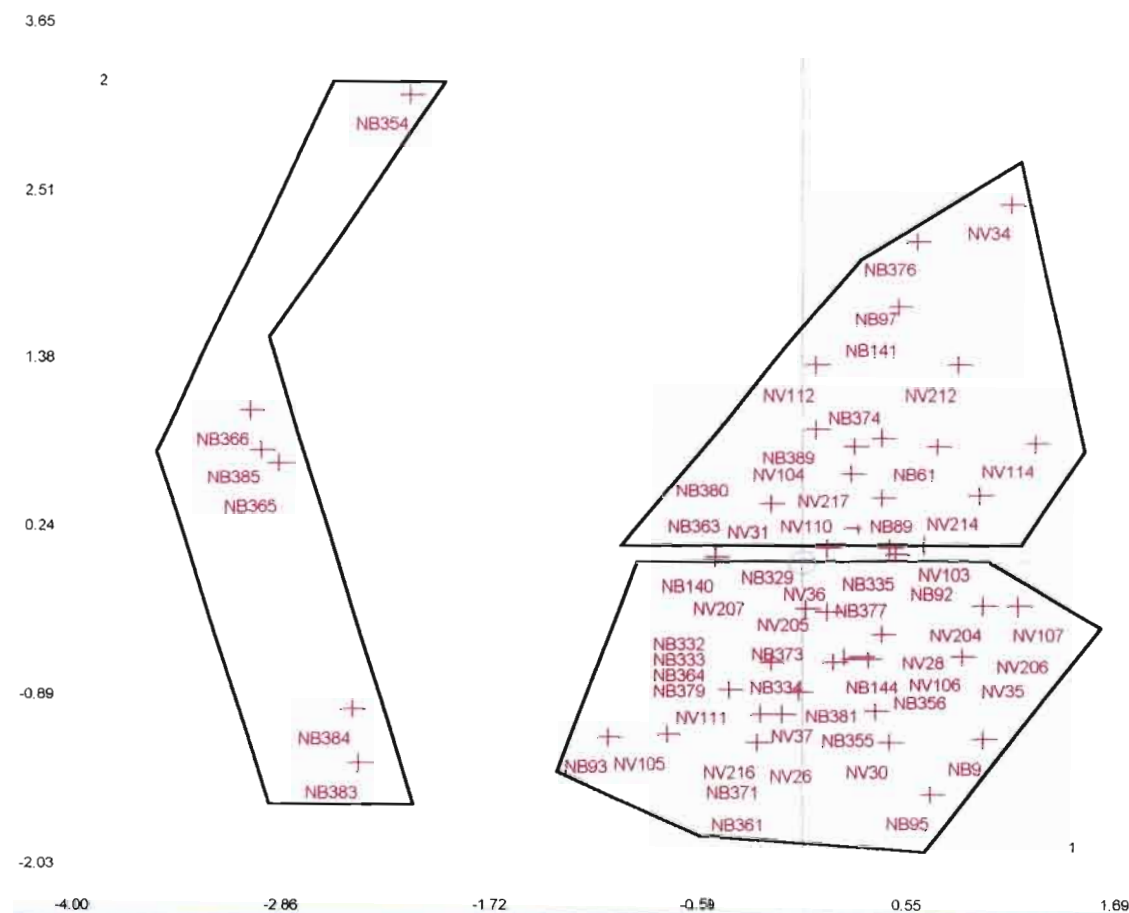
Afin de tester l'hypothèse n°3, nous avons analysé les populations en les séparant piège par piège lorsque l'effectif d'un piège le permettait : le F_{is} par piège était aussi élevé que par localité et le F_{st} restait le même. L'on peut difficilement concevoir d'avoir une unité d'échantillonnage plus petite que le piège, d'autant que dans le bois les pièges n'étaient pas séparés de plus de 150 mètres les uns des autres. Nous avons aussi vérifié que les glossines capturées selon le type de piège (monoconique ou biconique) n'étaient pas différentes. Des facteurs autres qu'une structuration due simplement à la distance géographique doivent donc être recherchés.

Les trois dernières hypothèses peuvent être testées par une méthode commune : l'analyse factorielle des correspondances (AFC), réalisée sur les génotypes multilocus bruts aux trois loci (Figure 19).

Cette analyse a été faite sur 60 individus : nous ne pouvions en effet analyser que les femelles (car les mâles pour les deux loci situés sur le chromosome X, sont considérés comme « information manquante »). De plus, après une première AFC, il nous a fallu éliminer un certain nombre d'individus « mal classés » (qui avaient en fait des allèles peu communs), car ils déformaient le nuage de points.

Sur les 60 individus restants qui sont inclus dans les trois populations NBO97, NKO97 et NBO98, la projection des deux premiers axes donne la représentation de la Figure 19 (ces deux premiers axes contribuent à 34% de l'information totale portée par 13 axes).

Figure 19 : AFC réalisée sur les glossines de Nyarafo analysées avec les trois loci microsatellites.



Chaque individu est repéré par une croix et est identifié par son numéro et 2 lettres : NB pour le bois, NV pour le réseau du Koba.

Ces deux premiers axes permettent de voir trois groupes s'individualiser, dont un qui ne comprend que six individus sur lesquels nous reviendrons par la suite.

Il apparaît une séparation entre deux groupes, l'un dans la partie haute du graphique (N=18 individus), et l'autre dans la partie basse (N=36 individus). Remarquons que dans ces deux groupes figurent des individus des deux années, et des individus à la fois de NBO et de NKO.

Ce n'est donc pas l'année de capture qui différencie ces groupes, ni la localisation géographique (bois ou réseau hydrographique principal du Koba).

Mais nous nous devons de savoir si ces 2 groupes représentent un artéfact de l'analyse, ou effectivement une réalité biologique. On va donc tester l'effet Wahlund, par la méthodologie suivante (de Meeus & Renaud, com.pers.) :

On mesure le F_{is} dans la population totale, constituée de ces deux groupes rassemblés en un seul ($N=54$).

On mesure ensuite le F_{is} dans chacune de ces deux populations, nommées par commodité, population A (bas du graphe, $N=36$ individus) et population B (haut du graphe, $N=18$), et le F_{is} moyen sur ces deux populations séparées. Cette dernière valeur sera comparée au F_{is} « population totale ». Les valeurs obtenues sont rapportées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Valeurs du F_{is} mesurées sur les 3 loci d'après l'AFC.

Paramètre	Population totale (AB) ($N=54$)	PopA+popB ($N=36$ et $N=18$)
Fis moyen	0.116	0.034
Fis mini ; Fis maxi	0.088 ; 0.1217	-0.072 ; 0.069

La valeur du F_{is} moyen diminue donc de manière significative (pas de chevauchement des valeurs) et devient très proche de 0 (panmixie) si elle est mesurée dans chacune des deux populations, ce qui va bien dans le sens de l'effet Wahlund.

Un argument supplémentaire pour l'existence de ce phénomène biologique serait que cette diminution du F_{is} affecte l'ensemble des loci, sauf si certains présentent des contraintes particulières. Les valeurs du F_{is} à chaque locus dans les deux cas de figure sont présentées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Valeurs du F_{is} mesurées à chacun des 3 loci d'après l'AFC.

Paramètre	Population totale (AB) ($N=56$)	PopA+popB ($N=36$ et $N=18$)
F_{is} locus 55.3	0.0878	-0.072
F_{is} locus 19.62	0.12	0.034
F_{is} locus 69.22	0.1217	0.069

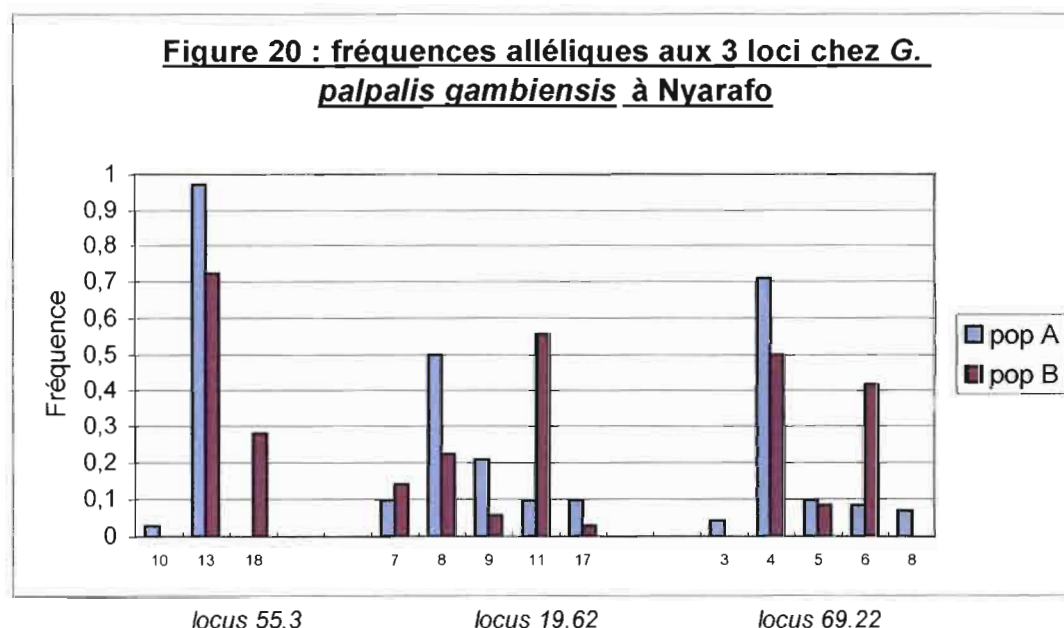
Ces résultats confirment la diminution du F_{is} sur chacun des trois loci lorsque les populations sont prises séparément.

L'ensemble des résultats pour les trois populations NBO97, NKO97 et NBO98 sur les trois loci microsatellites polymorphes nous suggère que l'on est bien en présence d'un effet Wahlund, et que coexistent, dans ce biotope, deux ou plusieurs populations de *G. palpalis gambiensis* qui ne se croisent pas aléatoirement et qui sont génétiquement distinctes.

Notons la valeur du F_{is} sur les trois loci pour chacune des deux populations (popA= 0.09, ns ; pop B=-0.055, ns). Le coefficient F_{st} entre ces deux populations est de 0.17 et la distance de Nei non biaisée est de 0.186.

Ces différences dans les fréquences alléliques sont illustrées sur le graphe de la Figure 20.

Les différences entre les deux populations distinguées par l'AFC sont de l'ordre de celles existant entre les glossines du Burkina Faso et celles du Sénégal. Quelques points méritent d'être soulignés.



Cette différence génétique entre deux populations sympatriques explique certainement que l'on n'ait pas trouvé de différence morphométrique entre Nyarafo et Yéguéré puisqu'à Nyarafo , les mesures ont porté sur deux populations plus différentes entre elles qu'elles ne le sont de Yéguéré.

N'oublions pas le troisième groupe sur l'AFC qui ne comprenait que six individus, provenant tous de NBO98. Il est difficile d'interpréter ces individus au vu de leur faible effectif, sans oublier que nous n'avons pas pu profiter de l'information génétique totale, puisque seulement 60 individus constituent cette AFC alors qu'un total de 97 femelles (et quelques mâles) a été analysé. Sans aller jusqu'à soutenir l'existence d'autres populations, l'on peut penser que nos échantillons sont composés de migrants récents provenant de différentes localités.

Comme nous l'avons déjà montré à l'aide des deux premiers loci, la structuration génétique de ces populations ne semble pas différer d'une année à l'autre, comme en atteste un F_{st} voisin de 0. Or, si dans la population A et dans la population B, on distingue les individus capturés en 1997 de ceux collectés en 1998, les résultats restent fidèles à ceux que nous venons de montrer (en gardant à l'esprit qu'avec de telles subdivisions, les

effectifs deviennent très faibles). Le F_{is} moyen est faible (0.03), mais aussi dans chaque population, et le F_{st} entre d'un côté pop A(97)-pop A(98), et pop B(97)-pop B(98) est voisin de 0, alors qu'il est fort dès que l'on compare A et B.

Ces résultats vont dans le sens de l'existence de deux populations distinctes de *G. palpalis gambiensis* à Nyarafo, dans les captures des deux années consécutives. Nous nous devons également de préciser que l'AFC donne une subdivision grossière des ensembles de génotypes obtenus par nos données, mais on ne peut pas considérer que les « populations » A et B représentent des véritables taxons.

Dès lors que nous avons mis en évidence à Nyarafo ces deux entités génétiques (pop A et B), il paraît intéressant de voir si la structuration observée auparavant entre Nyarafo et Yéguéré subsiste, ou si l'une de ces deux populations est plus proche génétiquement que l'autre des glossines de Yéguéré, voire de celles de Samorogouan ou du Mali. Rappelons que cette comparaison ne porte que sur les deux premiers loci.

Nous figurons ici le F_{st} mesuré entre la population A et les autres, puis la population B et les autres, les trois dernières (YEN, PC96 et MALI) ayant déjà été traitées (voir figure 17).

Tableau 20 : Valeurs du F_{st} entre paires de populations (rappel : $F_{st} A-B = 0.17$).

Nyarafo	YEN (Yéguéré nord)	PC96 (Samorogouan)	MALI
pop A	0.067	0.106	0.079
pop B	0.13	0.095	0.136



Les deux populations sympatriques de Nyarafo sont donc génétiquement plus différentes entre elles qu'elles ne le sont des autres localités. La structuration observée par rapport à Yéguéré reste vraie pour toutes les deux, comme en atteste le test de différenciation génique ($p < 0.0001$). On constate toutefois que la population A présente plus de similarités avec l'ensemble des autres localités que la population B.

L'ensemble de ces résultats génétiques sera discuté en relation avec les aspects épidémiologiques de la trypanosomose africaine. Il est notamment souhaitable de connaître la cause cet effet Wahlund identifié sur les glossines de Nyarafo, et l'importance de cette subdivision génétique au sein de *G. palpalis gambiensis* entre l'ouest et l'est de la zone de Sédéradougou, et leur signification possible quant aux stratégies d'intervention à adopter pour les campagnes de contrôle de cette endémie.

Chapitre 4 :

Discussion

« *Extrapolation of the results for a small number of genes to the entire genome is questionable because of uncertainty as to whether the genes studied are truly representative of the genome.* » (Hartl & Clark, 1989 : *Principles of population genetics*, 2nd edition, 682 pages, Sinauer associates Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA).

L'utilisation du polymorphisme de l'ADN microsatellite a permis de déceler une structuration des populations chez *G. palpalis gambiensis*, à des échelles macro et micro-géographiques. Si cette subdivision ne paraît pas très étonnante sur des populations aussi éloignées que celles du Sénégal et du Burkina Faso, elle était en revanche moins attendue à l'échelle d'un réseau hydrographique d'une zone agro-pastorale (Sidéradougou).

Nous commençons par discuter de la validité des informations apportées par ce travail, en revenant sur les différents aspects présentés, et en les comparant à des approches similaires chez d'autres organismes. Les résultats sont ensuite abordés en suivant une progression du macro- vers le micro-géographique. Des hypothèses biologiques sont présentées, visant à élucider les variations génétiques décelées, avec leurs implications sur l'épidémiologie et les méthodes de contrôle de ce frein au développement que sont les trypanosomoses africaines.

1. VALIDITE DES RESULTATS PRESENTES

Il apparaît d'emblée que deux loci sont *a priori* insuffisants pour inférer des résultats robustes lors d'une étude de génétique des populations. Il est d'usage d'utiliser en général 5 loci polymorphes au minimum, voire 10. Nei (1987) indique même que 30 loci isoenzymatiques sont nécessaires pour avoir une estimation correcte de la diversité génique dans les populations. Reconnaissons que ces conditions idéales sont exceptionnellement rencontrées. Il est d'autant plus difficile de les réunir lorsque le génome de l'organisme étudié ne fait pas l'objet de recherches intenses.

L'avantage des microsatellites par rapport aux marqueurs classiquement utilisés que sont les allozymes est leur très fort polymorphisme qui permet d'avoir accès à une information bien supérieure (Weber, 1990). A titre d'exemple dans notre étude l'hétérozygotie moyenne est comprise entre 0.33 et 0.61, alors que Gooding (1981) sur

quatre populations naturelles de *G. palpalis gambiensis*, obtient une hétérozygotie moyenne de 0.029 sur cinq loci isoenzymatiques. Au cours de cette étude, il n'avait d'ailleurs trouvé aucune structuration des populations au sein des espèces étudiées. Cet écart entre les résultats fournis par deux techniques est sensiblement le même que celui rapporté chez d'autres insectes (Hughes & Queller, 1993 ; Lanzaro *et al.*, 1995). L'accès à une quantité énorme d'information pour les microsatellites est lié à leur taux de mutation cent, voire mille fois, supérieur à celui des isoenzymes : 10^{-3} à 10^{-4} pour les microsatellites, (Dallas *et al.*, 1994 ; Weber & Wong, 1993) contre 10^{-6} pour les isoenzymes (Nei 1987).

La détection et l'obtention des microsatellites représentent une étape clé de ce type d'études (Jarne & Lagoda, 1996), surtout lorsqu'il faut, comme dans le présent travail, recourir à la création d'une banque génomique. Cette étape, longue et fastidieuse, constitue une des principales limites de cette technique. Dans d'autres organismes mieux connus, il est possible d'accéder aux banques de séquences informatisées, et d'identifier des microsatellites dans les séquences décrites. Il ne reste alors plus qu'à définir les amorces dans les séquences flanquantes, comme cela est souvent le cas pour les études sur les mammifères (Moore *et al.*, 1991 ; Abernethy, 1994 ; Gerloff *et al.*, 1995 ; Menotti-Raymond & O'Brien, 1995 ; Simonsen *et al.*, 1998). Cependant, de récentes adaptations de la recherche des microsatellites par la technique dite de « banque enrichie » (Kijas *et al.*, 1994 ; Ravel & Cuny, com. pers.) pourraient permettre un gain de temps considérable et un meilleur rendement dans le nombre de microsatellites identifiés.

Dans notre cas, trois loci ont été détectés à partir de la banque génomique de *G. palpalis gambiensis*, dont deux utilisés sur l'échantillon complet représentant plus de 600 individus. Bien qu'un des deux loci porte plus d'information que l'autre, ils ne présentent pas de déséquilibre de liaison et sont donc considérés comme indépendants, apportant chacun une information génétique supposée être représentative du génome. Le fait que ces deux loci soient soupçonnés d'être localisés sur le chromosome X ne constitue pas vraiment une surprise. Les glossines du groupe *palpalis* ne possèdent en effet que six chromosomes (Itard, 1974). Un argument en faveur de la validité des résultats obtenus dans ce travail est le fait que le troisième locus, lorsqu'il a été utilisé, a donné des informations corroborant celles obtenues sur les deux autres, tant du point de vue des valeurs du F_{is} que sur celles concernant la différenciation génique. Les trois loci polymorphes indépendants pris individuellement donnent donc des résultats qui vont dans le même sens. Cette observation renforce la validité de la structuration génique observée qui est censée affecter tous les loci de la même manière, contrairement à la sélection (Slingh & Rhomberg, 1987).

La première distinction génétique intraspécifique au niveau de l'échelle spatiale est apparue entre les *G. palpalis gambiensis* du Sénégal et celles du Burkina Faso. Nous reviendrons sur les raisons pouvant expliquer cette différenciation. Nous avons eu la chance de pouvoir superposer les résultats morphométriques (sur des gènes soumis à sélection) aux données génétiques sur les mêmes individus (sur des loci neutres) en ce qui concerne cette première différenciation. Or les deux analyses, morphométrique et génétique, indiquent des différences significatives, la structuration génétique trouvée aux deux loci étant accompagnée d'une taille plus petite des glossines échantillonnées au Sénégal. Soulignons que chez la drosophile, la seule nervation de l'aile est sous un contrôle polygénique impliquant trois gènes différents (modulés par l'environnement) (Thompson, 1975 ; Hutcheson *et al.*, 1995). En cumulant les deux techniques, les différences observées impliquent donc plus de loci que le seul nombre de microsatellites étudiés.

Nous avons aussi vu que certaines populations de *G. p. gambiensis* (au Mali, par exemple) se différencient peu des autres, récoltées dans des endroits distincts. Un mécanisme pouvant intervenir dans ce manque de variabilité entre populations distantes pourrait tenir dans le fait que les séquences microsatellites ont, en général, une taille maximale comprise aux alentours de 50 à 100 pb (Garza *et al.*, 1995) et sont sujettes à des variations de taille limitée (Stallings *et al.*, 1991 ; Nauta & Weissing, 1996). Il pourrait ainsi exister une sélection contre les allèles de taille trop grande. Cet inconvénient a déjà fait l'objet d'observations chez divers organismes, mais en général il apparaît plutôt lorsque des microsatellites isolés d'une espèce donnée sont appliqués sur une autre espèce ou du moins lorsque des espèces différentes sont comparées (Bowcock *et al.*, 1994). La combinaison du fort taux de mutation et de ces variations limitées génère de l'homoplasie de taille (identité par état et non par descendance) qui fait aussi que les microsatellites ne sont pas considérés comme des marqueurs de choix pour les études phylogénétiques impliquant plusieurs espèces (Jarne & Lagoda, 1996). Le travail présenté sur *G. palpalis gambiensis* se situe *a priori* au niveau infraspécifique. On ne peut toutefois pas exclure totalement l'existence de ces contraintes physiques, d'autant plus que le degré de divergence génétique au sein de l'espèce *G. palpalis* s.l. est inconnu. Cependant la grande majorité des séquences microsatellites n'a apparemment aucun rôle fonctionnel, comme en attestent leur nombre et leur présence chez la plupart des organismes chez lesquels on les a recherchés à ce jour (Tautz & Renz, 1984); ceci autorise à les considérer comme étant neutres vis-à-vis de la sélection (Weber, 1990). L'ajout de plusieurs loci permettrait sans doute de mieux cerner ces subdivisions génétiques entre populations éloignées géographiquement.

2. HERITABILITE DES ALLELES AUX LOCI MICROSATELLITES

L'expérience portant sur les deux générations de *G. palpalis gambiensis* issues de l'insectarium a confirmé la transmission mendélienne des allèles aux deux loci considérés, comme c'est en général le cas pour les loci microsatellites, ce qui en fait leur utilité pour les études de génétique des populations. Il était toutefois utile et important de vérifier que cette transmission se réalise effectivement. C'est ainsi que certains travaux ont mis en évidence une absence de bandes parentales chez les individus de la F1 (Callen *et al.*, 1993 ; Pemberton *et al.*, 1995 ; Primmer *et al.*, 1995), respectivement chez l'homme, le cerf, et l'hirondelle. Cette absence de produit d'amplification constitue ce que l'on appelle les allèles nuls, qui peuvent être présents à l'état homozygote ou hétérozygote. Leur présence affecte l'interprétation des données génétiques dans le sens où ils génèrent un déficit artificiel d'hétérozygotes. Ces allèles nuls ne sont pas anecdotiques car leur fréquence peut être importante (30% des loci dans certaines familles humaines, Callen *et al.*, 1993). La cause de ces non-amplifications est souvent une ou plusieurs mutations dans les séquences flanquantes du motif microsatellite (insertion, délétion, ou simple substitution), surtout si les amorces sont situées près du motif microsatellite (Koorey *et al.*, 1993). Une solution à ce type de problèmes est tout d'abord d'estimer la fréquence de l'allèle nul susceptible d'expliquer la totalité du déficit rencontré en hétérozygotes (Chakraborty *et al.*, 1992 ; Brookfield, 1996), et le cas échéant de redéfinir des amorces plus éloignées du motif microsatellite (Koorey *et al.*, 1993 ; Callen *et al.*, 1993 ; Dumas *et al.*, 1998).

Dans notre travail, toutes les bandes observées chez les parents ont été vues sur la F1, et les génotypes observés étaient ceux attendus. Ce résultat nous a confortés dans l'interprétation des génotypes, montrant l'absence d'allèles nuls dans l'échantillon d'insectarium. De même dans les populations naturelles étudiées, nous n'avons pas mis en évidence la présence d'allèles nuls.

Cette expérience a aussi montré qu'il était possible de déterminer (par exemple) le père d'un individu donné parmi deux possibles, ayant potentiellement pu féconder une femelle. Avec plus de loci microsatellites, cette assignation de paternité devrait être possible pour tous les individus. Ce type d'applications, utilisé en sciences légales chez l'homme, est aussi applicable à l'étude du mode de reproduction des populations d'insectes sociaux : fourmis (Gertsch *et al.*, 1995), abeilles (Estoup *et al.*, 1995b), guêpes (Hughes & Queller, 1993), ou de mammifères sociaux (par exemple les marmottes, Goosens, 1998 ; ou des canidés sauvages, Roy *et al.*, 1994).

Il nous semble indispensable, à chaque fois que cela est possible, de vérifier que la transmission des allèles microsatellites à chaque locus suit des lois mendéliennes lorsqu'une étude débute sur une espèce donnée. Mis à part l'existence des allèles nuls que nous venons de mentionner, des substitutions de nucléotides peuvent aussi exister, soit à l'intérieur du motif si celui-ci n'est pas « parfait », soit dans les séquences voisines (Gertsch *et al.*, 1995 ; Estoup *et al.*, 1995d ; Grimaldi & Crouau-Roy, 1997). Ces variations, si elles sont présentes, ne se traduiront pas par des changements de taille des motifs amplifiés. Au niveau intra-taxon comme c'est le cas dans notre étude, il semble néanmoins que le changement du nombre de répétitions reste le principal mécanisme de variation. La vérification expérimentale de la transmission héréditaire des allèles est donc nécessaire à mettre en œuvre lorsque c'est possible, avant d'inférer des structures génétiques, surtout lorsque de forts déficits d'hétérozygotes sont observés.

3. POPULATIONS NATURELLES SUBDIVISEES CHEZ *G. PALPALIS*

GAMBIENSIS

Les résultats globaux des analyses génétiques ont montré que la panmixie est de règle au sein des groupes d'individus échantillonnés chez *G. palpalis gambiensis*, mais que ces populations naturelles sont structurées en populations génétiquement distinctes entre elles. La première subdivision importante qui apparaît dans notre échantillonnage est la séparation entre *G. palpalis gambiensis* du Sénégal et les glossines de la même sous-espèce capturées au Mali et surtout au Burkina Faso.

3.1 Génétique spatiale à l'échelle de l'aire de distribution

Les mouches de la région de Dakar au Sénégal présentent en effet des distances génétiques importantes avec les autres échantillons (la distance de Nei varie entre 0.1 et 0.4). On estime à environ 2000 km « à vol d'oiseau » la distance séparant Bobo-Dioulasso de Dakar. Sur de telles distances géographiques, Krafur *et al.* (1997) ont aussi mis en évidence un flux de gènes limité entre populations de *G. pallidipes* d'Afrique de l'Est sur 8 loci isoenzymatiques. Il se pourrait cependant que la distance géographique ne soit pas le seul mécanisme expliquant le peu de ressemblance génétique entre les *G. palpalis gambiensis* du Sénégal et celles du Burkina Faso, et ce pour plusieurs raisons.

▣ Nous n'avons jamais constaté de corrélation positive entre les deux matrices de distances, géographique et génétique, bien que ce modèle d'isolement par la distance prévale pourtant chez beaucoup d'organismes (Rousset, 1997), dont des vecteurs (Dujardin *et al.*, 1997b chez les phlébotomes). Plusieurs distances génétiques ont été calculées (Reynolds *et al.*, 1983 ; Rousset, 1997 ; Nei, 1978) sur plusieurs regroupements de populations : les 15 échantillons séparément, les échantillons pris sur une seule année, ou à l'intérieur d'une zone donnée, ou entre pays. Notons que cette comparaison entre les deux matrices de distance est cependant rendue délicate par l'estimation des distances géographiques pour ce type d'insecte (notamment les glossines ripicoles du sous-genre *Nemorhina*) étroitement dépendant des cours d'eau : si l'estimation de la distance est correcte à l'échelle d'un même réseau hydrographique, elle devient biaisée dès que l'on passe à des rivières ou des pays différents, puisque l'on est obligé de la mesurer « à vol d'oiseau ». Idéalement, on devrait pouvoir disposer de distances suivant le cheminement des cours d'eau, ce qui, on le conçoit, paraît difficile. L'augmentation du nombre de loci pourrait bien sûr apporter plus d'informations. Il est aussi possible que des contraintes de taille jouent un rôle non négligeable dans cette absence d'isolement par la distance. Ces contraintes (homoplasie de taille) peuvent notamment avoir pour conséquence une sous-estimation de la réelle divergence génétique accumulée aux loci microsatellites, surtout pour des populations ayant divergé anciennement (Estoup *et al.*, 1995d).

▣ Les glossines du Sénégal, dans notre échantillonnage, diffèrent de celles du Burkina Faso génétiquement et morphométriquement. Les premières ont une taille plus réduite, suivant peut-être en cela la loi de Bergman : les races géographiques les plus petites d'une espèce sont trouvées dans les parties les plus chaudes de sa répartition (Ray, 1960). Il est aussi courant de trouver les individus de petite taille aux extrêmes de leur aire de répartition géographique (Mayr, 1974 ; Dujardin *et al.*, 1998), et le Sénégal constitue la limite de répartition à l'Ouest et au Nord pour *G. palpalis gambiensis*. La différenciation observée pourrait refléter un effet fondateur de glossines ayant colonisé ces localités extrêmes à partir du pool commun d'individus. Un argument va dans ce sens (bien que mesuré seulement sur 25 individus), c'est le faible nombre moyen d'allèles observés sur l'ensemble des deux loci : 3.5 pour les glossines du Sénégal (c'est le chiffre le plus petit de tout l'échantillonnage) contre 6.4 en moyenne sur l'ensemble des 14 autres populations (dont certaines n'avaient pas un nombre plus grand d'individus). En revanche, aucune différence n'est trouvée en ce qui concerne l'hétérozygotie. Ce faible nombre d'allèles, accompagné par des variations limitées de taille chez ces glossines du Sénégal, pourrait également refléter l'effet fondateur : un effectif, à un moment limité en nombre, aurait donné naissance à cette population, qui par simple effet de dérive (forte dans les populations ayant un petit nombre de reproducteurs) présenterait des fréquences

alléliques différentes et un nombre plus petit d'allèles. Ce mécanisme a notamment été évoqué pour expliquer la faible variabilité génétique rencontrée chez les rédues d'Amérique du sud transmettant la maladie de Chagas, *Triatoma infestans* (Dujardin & Tibayrenc, 1985) et *Rhodnius prolixus* (Harry, 1992 ; Solano, 1993). Il a aussi été décrit chez le bourdon, *Bombus terrestris*, où les populations insulaires issues du continent (à partir d'un petit nombre d'individus) montrent une perte de variabilité et une augmentation de la différenciation génique (Estoup *et al.*, 1995c). Les mêmes effets sur la variabilité génétique sont rencontrés lorsque les populations subissent un goulot d'étranglement (« bottleneck effect ») où seuls quelques individus survivent : à ce moment la dérive fixe ou élimine certains allèles, avec une vitesse dépendant de la taille du goulot (Chakraborty & Nei, 1977 ; Viard, 1996). Ce phénomène peut potentiellement se produire, pour les glossines ripicoles comme *G. palpalis gambiensis*, lors d'épisodes de sécheresse sévères entraînant une diminution drastique du nombre d'individus, surtout si les populations sont réparties de manière discontinue comme elles peuvent parfois l'être au Sénégal (Touré, 1971). Il peut s'y ajouter des effets d'isolement local, ces glossines, déjà présentes dans l'habitat particulier que sont les niayes, s'étant adaptées de plus à un milieu péri-urbain fortement anthropisé, volontiers qualifié d'atypique.

α Le dernier facteur, visant à expliquer ce faible polymorphisme lié à une taille réduite, reflète la théorie de la niche écologique, qui remonte à Darwin (in Pasteur, 1985) : par exemple, chez les insectes dits « spécialistes », la variabilité génétique pourrait diminuer en fonction de la taille de la niche occupée (Nevo, 1990). Des conditions restrictives du milieu (dans notre cas, les niayes au Sénégal, et/ou le milieu péri-urbain ?) sur des populations isolées auraient pour conséquence une perte de variabilité. Parallèlement, les facteurs abiotiques peuvent jouer un rôle direct dans la détermination de la taille des individus : il a ainsi été montré que les températures élevées subies par la puppe enfouie dans le sol sont à l'origine d'individus de petit format (Glasgow, 1961). La taille de l'individu est également le reflet de l'état physiologique de la femelle génitrice (Buxton, 1955), donc de l'état de la population un ou deux mois auparavant. Concernant particulièrement l'organe du vol, et contrairement aux loci microsatellites supposés neutres, n'oublions pas que l'aile des insectes est soumise à une forte sélection stabilisatrice (Daly, 1985). De la Rocque *et al.* (1998) à Sidéradougou, observent que les ailes de *G. tachinoides* sont plus petites dans un biotope sec que lorsqu'il est humide, et ce sur une échelle de 20 kilomètres.

Il est en général difficile de distinguer les facteurs génétiques des facteurs environnementaux lorsque l'on compare des tailles chez les insectes. Dans d'autres espèces de glossines, Bursell (1966) trouve des différences de taille significative chez *G. m. morsitans* entre des sites peu éloignés. Au Zimbabwe, Phelps & Clarke (1974),

évoquent une sélection contre les individus de petite taille : 35% des individus du plus petit quartile (sur les mesures de taille) seraient éliminés pendant les mois froids, et jusqu'à 75% dans les mois les plus chauds. De la même manière, Glasgow (1961) a démontré que les mâles de petite taille étaient éliminés dans les populations naturelles et qu'une sélection existe contre les plus grandes et les plus petites femelles de *G. swynnertoni*. D'après Gooding & Hollebone (1976), chez *G. m. morsitans*, 9 à 16% seulement de la variation du poids des glossines adultes est due à des facteurs génétiques additifs, indiquant que ce caractère est fortement modulé par des facteurs environnementaux, notamment l'état nutritif de la mère.



Dans le cadre du travail présenté ici, les résultats morphométriques et génétiques indiquent une différence significative au niveau intraspécifique chez *G. palpalis gambiensis*, entre les populations du Sénégal et celles du Burkina Faso. L'ensemble des différences observées pourrait refléter des épisodes d'extinction-recolonisation d'habitats au Sénégal, ou une restriction à des conditions écologiques particulières. Des prélèvements dans divers milieux écologiques au Sénégal (niayes, bolôns (marigots salés), forêts claires, forêts denses) (Touré, 1971) associés à une capture de glossines d'ouest en est entre le Sénégal et le Mali pourraient éclaircir cette situation.

Les différences génétiques obtenues entre les *G. palpalis gambiensis* du Sénégal et celles du Burkina Faso sont importantes ($0.11 < F_{st} < 0.29$) ($0.13 < \text{Dist Nei} < 0.40$). On peut les comparer aux quelques études réalisées sur des insectes avec les microsatellites : Estoup *et al.* (1995c), sur des bourdons (*Bombus terrestris*), trouvent les mêmes intervalles de F_{st} (0.11-0.25) entre différentes sous-espèces de *B. terrestris* vivant sur différentes îles, et même entre deux espèces différentes (0.19-0.36) vivant en France et en Suisse. Dans une autre étude chez l'abeille *Apis mellifera*, Estoup *et al.* (1995a) obtiennent des valeurs de F_{st} comprises entre 0.069 et 0.031, mais chez différentes sous-espèces européennes et africaines. Chez les moustiques, Lehman *et al.* (1996) obtiennent un F_{st} moyen de 0.016 sur l'espèce *An. gambiae* entre le Sénégal et le Kenya. Cette valeur est considérablement inférieure à celles trouvées chez *G. palpalis gambiensis*. On peut donc en déduire que si les distances génétiques obtenues dans la présente étude sont fiables, elles atteignent un degré de divergence comparable, au minimum, à celui qui existe entre des populations géographiques d'une même espèce. En situation allopatrique, comme le sont les échantillons du Sénégal et ceux du Burkina Faso, il est difficile de savoir si l'on a affaire à une seule ou plusieurs espèces : le concept

mixiologique, ou d'isolement reproductif (Mayr, 1974) ne peut plus s'appliquer, puisque l'on est en présence de populations n'échangeant plus de gènes, car elles ne se rencontrent pas. La seule preuve qui montrerait l'existence de deux espèces serait de capturer ces glossines, de les élever et d'observer au laboratoire la présence d'hybrides stériles. En allopatrie, on est obligé de recourir au concept évolutif de l'espèce, ou critère de différenciation génétique : il se base sur l'idée que deux espèces sont séparées depuis plus de temps que ne le sont des populations locales d'une même espèce. Chaque espèce développe des adaptations différentes à divers environnements et accumule de nombreuses mutations qui la différencient des autres. On s'attend donc à rencontrer des différences génétiques plus importantes entre espèces qu'entre populations conspécifiques. L'inconvénient reste de pouvoir déterminer à partir de quelle distance génétique on est en présence de deux espèces différentes : inévitablement un degré d'arbitraire important entre alors en jeu. Une bonne indication de la coexistence de plusieurs espèces est l'observation d'une corrélation entre des différences génétiques (distance génétique élevée) et des différences de niche écologique (De Meeüs, com. pers.).

L'objectif de ce travail n'est pas de remettre en question la taxonomie des glossines et plus particulièrement celle de *G. palpalis* ; on peut toutefois difficilement ignorer ces nouvelles informations. Nous ne prétendons nullement décrire de nouvelles espèces ou sous-espèces avec les données fragmentaires que nous possédons. Remarquons simplement que si une importante divergence génétique existe au sein de ce que l'on nomme *G. palpalis gambiensis*, cette divergence s'accompagne certainement de modifications dans les interactions parasite-vecteur, et donc de compétences vectorielles distinctes. De plus, étant données les exigences écologiques développées localement, on s'attend à ce que ces populations de *G. palpalis gambiensis* aient des capacités vectorielles différentes. Rappelons que la capacité vectorielle rassemble la compétence vectorielle (intrinsèque à la glossine) et une somme de facteurs extrinsèques (écologie). Pour illustrer ces variations de capacité vectorielle au sein d'un taxon, rappelons qu'en Gambie (qui est, avec le Sénégal, la répartition la plus occidentale de *G. palpalis gambiensis*) dans des forêts reliques, *T. congolense* type forêt infecte exclusivement *G. palpalis gambiensis*, alors que *T. congolense* savane est trouvé chez *G. morsitans submorsitans* (McNamara & Snow, 1991). En revanche à Sidéradougou, bien que ces deux groupes taxonomiques soient aussi mis en évidence par la PCR, aucune infection mature à *T. congolense* forêt n'est trouvée chez *G. palpalis gambiensis* (qui ne montre pas non plus d'infection à *T. congolense* savane, dans le cadre de nos enquêtes). Des infections expérimentales montrent aussi des variations de compétence vectorielle de *G. palpalis gambiensis* vis-à-vis de *T. brucei* entre deux lignées de laboratoire présentant des différences génétiques (Elsen *et al.*, 1994).

D'autres travaux se sont attachés à associer, à partir du terrain, des différences génétiques à des différences de comportement. L'objectif était en général d'analyser les possibilités de contrôler les tsé-tsé par les mécanismes de stérilité inter(sub)spécifique. Ainsi, à titre d'exemple, Langley *et al.* (1984) étudient les chromosomes de *G. pallidipes* au Zimbabwe et en Ouganda. Ils trouvent des différences importantes sur le « banding » du chromosome Y et décèlent l'existence de chromosomes B (encore appelés chromosomes surnuméraires) sur les glossines du Zimbabwe mais pas sur celles de l'Ouganda. Toutefois, les croisements réalisés au laboratoire n'indiquent aucun phénomène de stérilité entre ces mouches d'origine géographique éloignée.

3.2 Génétique à l'échelle de deux zones de développement

Les deux zones enquêtées, Samorogouan et Sidéradougou, montrent des situations génétiques différentes au sein de *G. palpalis gambiensis*.

3.2.1 A Samorogouan

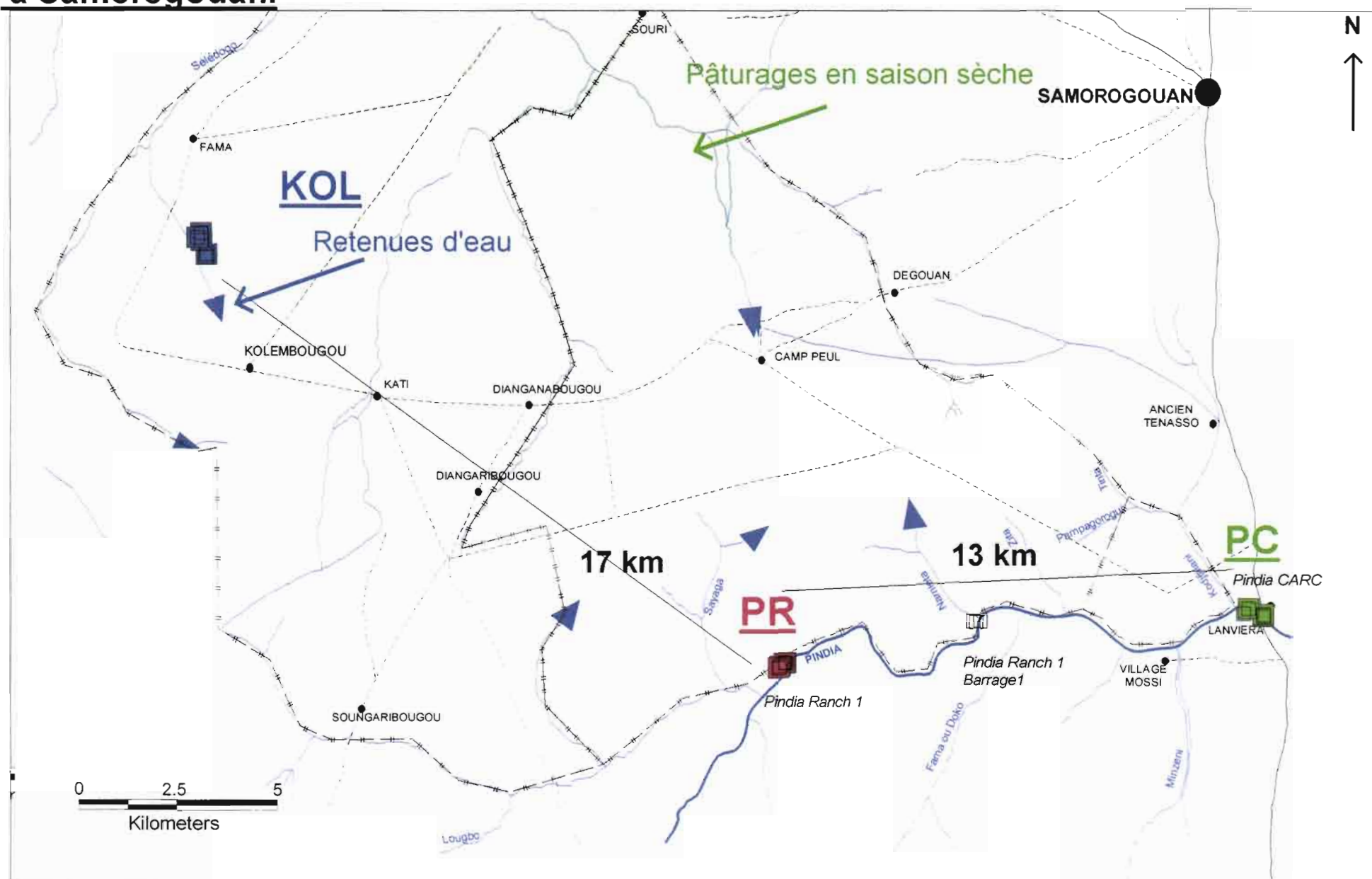
Il semble que la panmixie y soit de règle, car très peu de différenciation est mise en évidence entre les glossines capturées aux différents endroits de cette zone pastorale quelle que soit la saison. Cette faible différenciation génétique peut être due au fait que deux loci sont insuffisants pour détecter des différences à cette échelle. Mais sur la même échelle spatiale, des divergences génétiques importantes sont montrées à Sidéradougou. Si elles existent à Samorogouan, ces différences doivent donc être plus subtiles. Pourquoi ?

Il semble bien que pendant la saison des pluies, des mouvements importants de glossines puissent avoir lieu, homogénéisant les flux géniques entre les localités échantillonnées. En effet, aucune de ces localités en juin 1997 ne révèle de déficits en hétérozygotes, et même si on regroupe les trois localités échantillonnées {PC, PR et KOL} en un ensemble, aucun écart à la panmixie n'est détecté. L'écart entre PC et PR est de 13 km le long de la rivière Pindia, et 17 km (à vol d'oiseau) séparent KOL de PR, mais avec plusieurs réseaux secondaires intercalés (voir carte). Cuisance *et al.* (1985b), lors d'expériences de marquages-recaptures non loin de cette même zone indiquent qu'un adulte *G. palpalis gambiensis* parcourt en moyenne dans sa vie environ 1 km le long de la galerie. Mais certains individus (femelles en général) sont capables de « sauts »

importants puisque 10% sont retrouvés à 3.1 km (mâles) et 5.1 km (femelles). Quelques individus exceptionnels sont même recapturés respectivement à 17 et 18.5 km de leur point de lâcher. Ces femelles, bien que représentant une exception, n'en sont pas moins des individus prépondérants dans la dissémination des glossines et l'épidémiologie des trypanosomoses. Ce sont en effet elles qui vont contribuer à la dispersion de leur progéniture, et aussi à la recolonisation saisonnière de gîtes potentiels pour l'espèce, par exemple après des campagnes de lutte. Selon Cuisance *et al.* (1985b) ces évaluations de dispersion représenteraient même une sous-estimation car le réseau de pièges mis en place à l'époque n'était pas assez dense. L'autre type de déplacement existant chez ces glossines ripicoles est de type radiaire (Nash & Page, 1953 ; Cuisance & Février, 1983), en sortant de la galerie vers les zones de savane. Ces mouvements se réalisent à l'occasion de la recherche d'hôtes nourriciers (si par exemple des bovins pâturent près de la galerie, ou si un village est situé aux alentours immédiats) ou lors de la conquête de nouveaux écotopes. Ils ont lieu plutôt pendant la saison des pluies, l'humidité étant assez importante pour ne pas affecter la survie des individus. A cette occasion, des glossines peuvent ainsi passer d'un réseau hydrographique à un autre.

Les glossines de Samorogouan ne sont pratiquement pas infectées par les trypanosomes et montrent une préférence trophique pour les reptiles, ce qui confirme les résultats trouvés par Bauer *et al.* (1995) dans la même zone. Ce type de comportement expliquerait la capacité de *G. palpalis gambiensis* dans cette région à se maintenir lorsque des campagnes de lutte utilisant le bétail imprégné d'insecticide sont mises en place, comme cela a été le cas à Samorogouan jusqu'en 1993 : ces glossines se nourrissent préférentiellement sur des reptiles et de ce fait sont donc peu ou pas atteintes par la lutte, contrairement à *G. morsitans submorsitans* ou *G. tachinoides*. Parallèlement, leur rôle vecteur des trypanosomoses semble négligeable. Il faut toutefois tempérer cette dernière observation : rien n'indique en effet que cette préférence trophique ne soit pas réversible, surtout que *G. palpalis gambiensis* est actuellement la seule glossine capturée dans la zone. Aucune compétition avec d'autres espèces de tsé-tsé n'existe donc plus pour la ressource alimentaire. Il est tout à fait envisageable que certains individus se mettent à piquer le bétail, abondant dans la zone, et qui vient boire le long du cours principal de la Pindia. *G. palpalis gambiensis* est en effet connue pour son éclectisme quant à ses préférences trophiques (Weitz, 1963 ; Challier, 1973 ; Clausen *et al.*, 1998). Il est de fait étrange que, bien qu'elle représente la seule espèce présente dans la zone, et que les bovins y soient élevés de manière importante, on observe toujours cette préférence pour les reptiles. Paradoxalement, au Mali dans la région de Tienfala, *G. palpalis gambiensis* est responsable d'un foyer actif de trypanosomose à *T. vivax* (Diall, com. pers.) lié au bétail. Cette préférence trophique a-t-elle une base génétique ?

Figure 22 :Rappel de la localisation des points de capture de *G. palpalis gambiensis* à Samorogouan.



Une autre observation d'après les résultats des captures en saison sèche, est représentée par l'efficacité nettement supérieure des captures de *G. palpalis gambiensis* (67% contre 33%) dans les pièges monoconiques Vavoua par rapport aux pièges les plus classiquement utilisés en zone de savane pour les glossins ripicoles (piège biconique Challier-Laveissière). Or ce piège Vavoua est en général plutôt disposé dans les zones de forêt, pour capturer *G. p. palpalis* (Laveissière & Grébaut, 1990). Nous ne sommes pas en mesure d'avancer d'explication claire pour cette observation. Rappelons aussi que ces glossines peuvent piquer l'homme, les activités humaines liées à l'eau étant évidemment importantes, et pourraient constituer un danger potentiel de trypanosomose humaine. Mais aucune infection à *T. brucei* n'a été mise en évidence.



Notre hypothèse, à défaut d'une preuve indiquant le contraire, est donc que les populations de *G. palpalis gambiensis* capturées à Samorogouan ont une structure panmictique. Il semble qu'aucune barrière de quelque nature que ce soit (génétique, écologique), n'empêche des mouvements substantiels de ces glossines durant la saison des pluies. Certaines observations font état de particularités des glossines dans cette zone : propension à piquer uniquement les reptiles même en l'absence de compétition pour la ressource alimentaire, capture préférentielle en saison sèche par le piège Vavoua. Afin d'éclaircir ces observations et leur déterminisme, il semblerait nécessaire de réaliser un échantillonnage plus complet de *G. palpalis gambiensis* le long de la rivière Pindia notamment, éventuellement en associant plusieurs modes de piégeage, et en étendant l'analyse au minimum aux trois loci actuellement disponibles.

Actuellement, dans cette zone, s'est mis en place un projet sur la résistance des trypanosomes aux trypanocides, certaines souches de *T. congolense* isolées chez les bovins s'étant montrées résistantes au diminazène acéturate et à l'isométymidium (Authié *et al.*, 1984 ; Clausen *et al.*, 1992).

3.2.2 A Sidéradougou

« A species is an assemblage of variable populations dynamically evolving in response to geographical, temporal, clinal, and other ecologically related patterns, that is genetically distinct from other species. The genetic structure of each population is a unique response to a local environment. » (Narang *et al.*, 1993).

3.2.2.1 Entre Nyarafo à l'Ouest et Yéguéré à l'Est

Dans la zone agro-pastorale de Sidéradougou, une première subdivision spatiale ouest-est avait été esquissée d'après les résultats épidémiologiques obtenus chez *G. tachinoides* (de La Rocque, 1996 ; de La Rocque & Cuisance, 1997) puis en combinant les chiffres sur les deux espèces *G. tachinoides* et *G. palpalis gambiensis* (Lefrançois et al., 1998a).

Si l'on s'intéresse uniquement à *G. palpalis gambiensis*, en tenant compte des deux enquêtes réalisées en 1997 et 1998, la situation ouest-est de la zone est la suivante :

- ✦ A l'ouest, les densités de glossines capturées sont supérieures, ainsi que les taux d'infection à l'examen microscopique, surtout les taux d'infection de l'intestin moyen. A ce dernier chiffre, on associe : une forte proportion de repas de sang sur reptiles, et un taux d'identification des infections par PCR qui est très faible. On suppose que ces infections pourraient être le fait de trypanosomes de reptiles (*T. grayi*-like).
- ✦ A l'est, tous ces chiffres sont inférieurs, et les infections, peu nombreuses, sont trouvées dans les pièces buccales des glossines, avec un fort taux d'identification par PCR de ces infections, qui sont souvent le fait de *T. vivax*.

Nos résultats suggèrent qu'un flux de gènes restreint existe entre les individus de *G. palpalis gambiensis* de l'ouest et ceux de l'est de la zone de Sidéradougou.

Ce flux de gènes limité s'accompagne clairement de différences de transmission des trypanosomes à l'échelle de cette zone. C'est à notre connaissance la première fois qu'est mise en évidence une subdivision des populations de glossines au niveau intraspécifique, à l'échelle d'un réseau hydrographique. Cette subdivision subsiste lors des deux prospections, en 1997 puis en 1998. Nous n'établissons pas que la différence génétique observée est la cause d'une différence de transmission de la maladie à l'échelle de la zone agro-pastorale, car les informations tirées de l'analyse spatiale indiquent le rôle important d'autres facteurs (contact avec les hôtes, pratiques d'élevage...) (Cuisance & de La Rocque, 1998). On ne peut toutefois s'empêcher d'observer l'association entre cette structuration génétique des populations de *G. palpalis gambiensis* et les données épidémiologiques recueillies. Ces résultats renforcent la nécessité d'inclure cette couche d'informations « génétique des populations de vecteurs » dans l'analyse spatiale de la prévision des points épidémiologiquement dangereux.

Quels sont les facteurs responsables de cette rupture partielle du flux de gènes ?

Pour répondre à cette question, il faudrait disposer de plus d'éléments que ceux que nous possédons. L'idéal serait d'avoir un échantillonnage spatial régulier le long des rivières Koba et Tolé, ainsi qu'un nombre important de glossines par piège. Nous avons été obligés dans certains cas de regrouper les glossines capturées sur un ensemble de pièges (exemple : KOB= 8 pièges), alors que d'autres populations sont constituées des captures d'un ou deux pièges (NKO97). En outre, deux ou trois loci polymorphes supplémentaires et une analyse morphométrique plus exhaustive apporteraient davantage de robustesse aux résultats. Nous pouvons tout de même évoquer les facteurs suivants pouvant être incriminés dans les causes de cette structuration des populations.

a) Isolement par la distance

A Yéguéré, les glossines capturées au Nord (YEN) ne diffèrent pas de celles capturées au sud (YES). Or sur la même distance le long du réseau (environ 15 km), NKO diffère significativement de YEN. D'autres exemples de ce type peuvent être pris, qui, associés aux tests de Mantel non-significatifs sur l'association des deux matrices de distances, suggèrent que la différenciation génétique de *G. palpalis gambiensis* à Sidéradougou n'est pas liée uniquement à la distance géographique séparant les populations. D'autres barrières aux flux géniques doivent donc exister.

b) Rappel sur l'histoire de la zone

La zone agro-pastorale de Sidéradougou (3500 km²) a fait l'objet, une quinzaine d'années auparavant, d'une lutte intégrée contre les glossines (Cuisance & Politzar, 1983 ; Merot *et al.*, 1984 ; Cuisance *et al.*, 1985a). Pour cela, une combinaison de techniques utilisant d'abord des écrans imprégnés à la deltaméthrine pour faire chuter la densité des glossines en saison sèche, puis en saison des pluies, des lâchers de mâles rendus stériles par irradiation au Césium 137 a permis l'éradication des trois espèces (*G. morsitans submorsitans*, *G. tachinoides*, *G. palpalis gambiensis*) de la zone en 1984 (Poltzar & Cuisance, 1984 ; Cuisance *et al.*, 1985a). Cette action a constitué le premier exemple d'une lutte intégrée associant des techniques non-polluantes qui a abouti à l'éradication des glossines (rapport OMS, 1985). Un dispositif de trois barrières utilisant des pièges biconiques Challier-Laveissière fut ensuite mis en place le long des trois principaux cours d'eau afin d'éviter la réinvasion de la zone. Après la fin du projet, les barrières furent peu à peu délaissées, et les deux espèces riveraines ont recolonisé la zone (Bauer *et al.*, 1987). La partie nord de la zone (environ 1300 km²) est actuellement complètement réenvahie par *G. palpalis gambiensis* et *G. tachinoides* avec des densités comparables à celles de 1982 (de La Rocque, 1997).



Pige Vavua, Yéguicé - Janvier 1998

P. SOLANO.

c) Facteurs écologiques

La carte de la figure 22 montre le réseau hydrographique du Koba et du Tolé. En remontant du Sud (aval) vers le Nord (amont), le lit principal (côté est) du Koba se sépare en deux : une branche nord, appelée Tolé, et la continuité du Koba vers l'ouest, qui, laissant quelques affluents secondaires, se dirige vers le sud-ouest en passant à côté du village de Nyarafo pour atteindre les sources au pied de la falaise. Or, les résultats obtenus par de La Rocque (1997), indiquent des densités importantes de *G. palpalis gambiensis* dans les zones suivantes :

1. sur le lit principal du Koba en aval du croisement avec le Tolé,
2. sur la branche ouest du Koba, où se situe le bois de Nyarafo (situé à 2-3 kms du cours principal du Koba) et
3. sur le Koba lui-même aux alentours de Nyarafo. En revanche, ces densités sont faibles (<2.5 G.p.g./piège) à la fois sur le Tolé et sur le Koba immédiatement en amont de l'embranchement (de La Rocque, 1997). Ces deux derniers lieux sont constitués de galeries étroites ouvertes et irrégulières, où la présence d'eau n'est pas constante tout au long de l'année. Ces éléments sont défavorables à *G. palpalis gambiensis*, qui est une glossine de galeries plutôt larges, hautes, denses, bordant des eaux permanentes. En revanche, ils ne gênent pas *G. tachinoides*, qui est abondante dans ces biotopes. *G. palpalis gambiensis* s'y aventure occasionnellement, notamment en saison des pluies lorsque l'humidité est forte, et c'est à ce moment que se peut se produire un brassage d'individus.

Une représentation schématique des mouvements supposés de *G. palpalis gambiensis* est proposée Figure 22. Les résultats génétiques obtenus laissent en effet penser que *G. palpalis gambiensis* pourrait être plus mobile sur la branche orientale du Koba (panmixie à YEN, YES, et sur l'ensemble) et que les mouvements s'y effectueraient préférentiellement selon un axe sud-nord/nord-sud, les glossines se déplaçant pendant les pluies jusqu'au Tolé, puis revenant sur le lit du Koba dans des biotopes localement favorables pendant la saison sèche. Cette plus grande dispersion pourrait s'accompagner de rencontres d'hôtes nourriciers plus divers, notamment de troupeaux de bovins appartenant à des nomades et qui viennent se désaltérer dans la rivière en saison sèche, favorisant un contact plus important avec des réservoirs de trypanosomes pathogènes qu'avec des reptiles. Toutefois ce contact avec les bovins est globalement moins important, en terme de fréquence de rencontre, qu'à l'ouest : le croisement des couches d'informations dans le Système d'Information Géographique indique en effet que cette branche orientale consitue un ensemble de points moins « à risque » que du côté de Nyarafo, ce qui explique les taux d'infection faibles rencontrés chez les glossines ainsi que chez les bovins (de La Rocque, Michel, com. pers.). En effet, c'est notamment vers Nyarafo que

En vert sont figurés les villages de Nyarafo et Yéguéré, et les flèches représentent l'interprétation des mouvements des glossines dans la zone. Les traits pleins figurent des mouvements réguliers, les pointillés des déplacements plus occasionnels, sans doute saisonniers. Ces mouvements préférentiels expliqueraient les échanges limités d'individus entre l'Ouest et l'Est de la zone de Sidéradougou.



les conditions biotiques et abiotiques offrent la meilleure combinaison pour que se produisent les rencontres entre le parasite, l'hôte et le vecteur.

Précisément à Nyarafo, du côté ouest, des échanges substantiels d'individus semblent pouvoir se réaliser entre le bois et le lit principal du Koba. Les glossines y trouvent des conditions favorables tout au long de l'année (surtout dans le bois) : présence d'eau permanente, galeries avec un pourcentage de recouvrement important, présence d'une faune résiduelle composée de varans, de crocodiles (observés), voire sporadiquement de mammifères ; les troupeaux de bovins des peuls sédentarisés ou des agro-éleveurs de la zone, nombreux dans ces points (J.F. Michel, com. pers.), viennent aussi boire.

Un argument renforçant cette hypothèse sur les mouvements des glossines est constitué par le nombre de glossines ténéales capturées (dont on peut déduire les gîtes de dépôt larvaire des femelles) : dans le bois de Nyarafo (NBO) et à Yéguéré, au niveau des populations YEN et YES, sont précisément recensées jusqu'à plus de 50% de mouches ténéales (de La Rocque, 1997). Au contraire, sur le Tolé et le long du Koba en amont du croisement, ces chiffres varient de 0 à 10%. La nature du sol (localement argilo-sableux) jouerait un rôle important dans la présence des gîtes larvaires, les glossines colonisant ensuite secondairement les sites périphériques (Brightwell *et al.*, 1992). Les zones où sont comptabilisés peu d'individus ténéraux constitueraient donc des lieux moins favorables à la survie des glossines.



Nous pensons donc qu'entre l'ouest et l'est de la zone de Sidéradougou, les échanges entre individus de *G. palpalis gambiensis* existent, mais de manière limitée. Ces flux de gènes restreints seraient la conséquence des mouvements des glossines, liés essentiellement à la qualité des biotopes le long du réseau hydrographique du Koba, selon la saison. L'existence, aux alentours de l'embranchement Koba-Tolé, d'une zone peu favorable à *G. palpalis gambiensis* (densités faibles, absence de ténéales) constituerait une barrière à ces échanges d'individus.

Il serait souhaitable de comparer cette différence génétique au sein de *G. palpalis gambiensis* à cette échelle spatiale ($F_{st}=0.039$, $p<0.0001$) à d'autres études réalisées ailleurs sur des échelles voisines. Notons qu'il existe encore relativement peu de travaux utilisant cette approche sur des insectes, même si par ailleurs les études utilisant les microsatellites foisonnent. De plus, les travaux publiés sur les insectes sont souvent axés sur la structure des populations d'insectes sociaux (abeilles, guêpes, fourmis, termites; Estoup *et al.*, 1995 a, b ; Gertsch *et al.*, 1995 ; Husseneder *et al.*, 1998). Les

comparaisons possibles viennent des études sur les moustiques où par exemple chez *Culex pipiens*, Chevillon *et al.* (1998) trouvent un F_{st} de 0.06 entre deux écotypes distincts de l'espèce (sur des loci non-soumis à sélection).

Des infections expérimentales réalisées au laboratoire avec des individus de *G. palpalis gambiensis* capturées à l'ouest et à l'est du réseau donneraient une indication supplémentaire de l'influence de la structuration génétique des populations de glossines sur leur compétence et leur capacité à transmettre la trypanosomose.

3.2.2.2 Dans le bois de Nyarafo, un mélange de populations ?

Grâce aux données cumulées sur les trois loci, l'Analyse Factorielle des Correspondances réalisée sur 60 individus du bois de Nyarafo (captures de 1997 et 1998) et de la rivière Koba près du bois, permet de distinguer deux ensembles (populations A et B). Nous avons indiqué l'existence probable d'un effet Wahlund : à l'intérieur de chacun de ces deux ensembles, la panmixie n'est pas rejetée (F_{is} voisin de 0), et entre ces ensembles, la différenciation génétique est importante ($F_{st}=0.17$). Lorsque ces deux ensembles sont réunis artificiellement en un seul, un déficit d'hétérozygotes (F_{is}) très significatif ($p<0.0001$) apparaît. C'est ce qui se passe lorsqu'on analyse séparément les trois populations NBO97, NBO98, et NKO97 (bien que pour cette dernière, le déficit ne soit pas significatif).



Dans le bois de Nyarafo, les résultats suggèrent l'existence d'un mélange de populations en sympatrie, dans les captures des deux années successives. Des deux populations ainsi mises en évidence, la population A se rapproche plus des glossines de Yéguéré que la population B, et la différence entre A et B atteint le niveau de différence trouvé entre les glossines de Sidéradougou et celles du Sénégal.

Ces deux groupes d'individus, si on admet leur existence biologique, pourraient refléter :

1. l'existence de deux populations stables dans le bois qui auraient une niche écologique distincte et ne se mélangeraient pas, ou/et
2. la présence de glossines d'origine géographique différente revenues au contact.

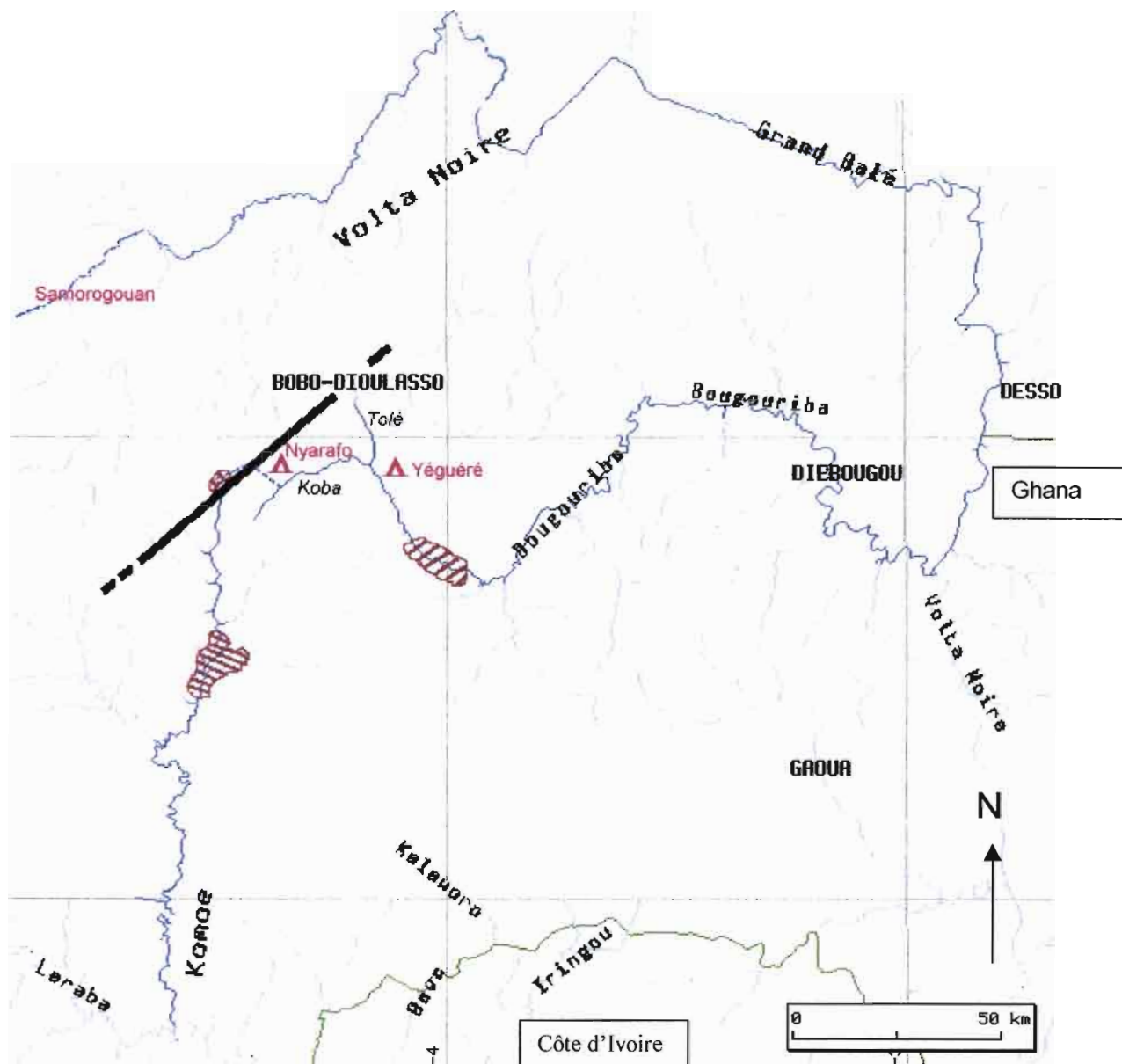
Chez *Culex pipiens*, Chevillon *et al.* (1998) obtiennent, par l'électrophorèse des isoenzymes, un F_{st} de 0.29 sur un locus soumis à sélection qui est directement impliqué dans la différenciation écologique. Par contre sur les loci supposés neutres, le F_{st} est égal à 0.06. Lorsque des différences entre populations obtenues en utilisant les F-statistiques avec les microsatellites sont comparées avec ceux obtenus par les isoenzymes, ces différences sont au minimum équivalentes (Estoup *et al.*, 1998) voire très supérieures (Lanzaro *et al.*, 1995). Sur deux espèces jumelles de moustiques vivant en sympatrie au Kenya, *Anopheles arabiensis* et *A. gambiae*, Kamau *et al.* (1998) trouvent un F_{st} de 0.25 en utilisant 25 loci microsatellites. Entre ces deux mêmes espèces jumelles mais avec les isoenzymes, au Burkina Faso, Coosemans *et al.* (1998) trouvent une distance de Nei de 0.31.

Avisé (1975), en se basant sur les isoenzymes, estime que jusqu'à une distance de Nei de 0.20, on peut avoir affaire à des populations conspécifiques. Dans ce travail, les valeurs obtenues sur trois loci sont du même ordre ($F_{st}=0.17$, $D_{Nei}=0.186$), mais sont supérieures à celle observées sur les loci neutres entre les écotypes de *C. pipiens*. et les séquences microsatellites sont, sauf exception, considérées neutres vis-à-vis de la sélection. L'analyse morphométrique conforte indirectement les différences génétiques à Nyarafo : la non-significativité des résultats obtenus sur les ailes entre Nyarafo et Yéguéré résulte probablement du fait qu'il y a plus de différences entre les populations A et B de Nyarafo qu'entre chacune de celles-ci et les glossines de Yéguéré.

Encore faut-il que ces différences génétiques soient accompagnées de différences morphométriques comme c'était le cas avec les mouches du Sénégal. Des analyses sur la morphométrie de ces glossines avec des effectifs supérieurs, et sur des individus déjà caractérisés génétiquement apporteraient des éléments explicatifs. Il paraît aussi intéressant de savoir si ces glossines présentent des préférences trophiques différentes, ce qui indiquerait une base génétique pour ces comportements, qui conditionnent la capacité vectorielle. Des expériences d'infection expérimentale au laboratoire pourraient aussi être réalisées sur chacun de ces deux ensembles, A et B.

Sur la carte de la zone (figure 23) sont figurés les points de réinvasions des glossines après l'abandon progressif des barrières qui avaient été mises en place. Deux de ces points sont localisés au sud de la zone, dont un sur la branche est du Koba avant l'embranchement avec le Tolé. C'est certainement à partir de ces points que les glossines ont progressivement réenvahi tout le réseau du Koba. Cette réinvasion a permis de repeupler le lit principal du Koba et le bois de Nyarafo, où les glossines présentes, ayant un biotope très favorable tout le long de l'année, se dispersent relativement peu.

Figure 23 : Carte de la zone de Sidéradougou et des bassins versants (source : site internet ORSTOM hydrologie, observatoire hydrologique de Ouagadougou ; **modifié**).



En bleu foncé sont représentés les deux bassins versants principaux concernant les glossines de notre étude. On y voit notamment la jonction, au niveau de la falaise de Banfora (trait noir), du bassin versant de la Komoé et, à partir du Koba, via la Bougouriba, celui du Mouhoun (Volta Noire). En rouge sont situés nos points de capture, et en marron les barrières d'isolement de la zone (pour éviter les réinvasions des glossines) mises en place en 1983. Les frontières figurent en vert.

Mais, comme on peut le voir sur la carte, un dernier point de réinvasion est situé en haut de la falaise, et lors des pluies, les réseaux secondaires de ce cours d'eau sont presque jointifs avec les sources naissant du bas de la falaise (Politzar, com. pers.). L'hypothèse est donc qu'il se produit aussi des réinvasions de la zone à partir de ce réseau venant du haut de la falaise, probablement en plusieurs points. La falaise de Banfora constitue en effet un milieu unique dans cette région : « Ces grès très anciens (précambriens) constituent une réserve d'eau, qu'ils restituent sous forme de multiples sources, seuls points d'eau permanents en saison sèche. L'afflux du bétail et des populations d'agriculteurs autour de ceux-ci représente autant d'éléments favorables à la prospérité des populations locales de *G. palpalis gambiensis*. Il est vraisemblable qu'en saison sèche, chaque bois abrite une population qui demeure isolée des autres, mais dès la saison des pluies, des échanges se produisent aisément comme l'ont montré certaines recaptures de mâles marqués. » (Extrait du rapport d'activité 1983 du CRTA Bobo-Dioulasso).

Or, ce cours d'eau venant du haut de la falaise appartient au réseau hydrographique de la Comoé qui descend vers la Côte d'Ivoire (Figure 23). En revanche le Koba et le Tolé rejoignent, via la Bougouriba, le réseau principal de la Volta Noire (actuellement appelée Mouhoun), comme d'ailleurs la rivière Pindia qui passe dans la zone de Samorogouan.

Les glossines issues de la Comoé (population B de l'AFC?) pourraient donc arriver jusqu'au bois de Nyarafo, trouvant là le même biotope favorable que celles issues du Koba (population A ?). Ce bois constituerait donc en quelque sorte une zone de contact entre des populations de glossines qui auraient accumulé des divergences génétiques aboutissant à une barrière (partielle) d'isolement reproductif. Ces populations A et B échangent en effet seulement 1.21 individus à chaque génération (à titre d'exemple, ce même calcul entre espèces jumelles de moustiques au Kenya donne 0.75 individu entre *A. gambiae* et *A. arabiensis*, Kamau *et al.*, 1998) indiquant aussi que cet isolement n'est pas total (ce calcul fait l'hypothèse d'une migration récente et de populations qui ne sont pas à l'équilibre). Des études supplémentaires permettraient de savoir si ces deux ensembles sympatriques ont développé des adaptations écologiques différentes (préférences trophiques distinctes ?) qui auraient une incidence directe sur la transmission de la trypanosomose. Gardons à l'esprit que la Comoé rejoint la Côte d'Ivoire en plongeant selon un axe nord-sud. Or c'est justement en Côte d'Ivoire que se trouve la zone de contact entre *G. palpalis gambiensis* et la sous-espèce voisine *G. p. palpalis*, vers Katiola, à environ 400 km au sud de Bobo-Dioulasso (Challier & Dejardin, 1987). On peut penser à une introgression possible de gènes de *G. p. palpalis* jusqu'au Burkina Faso, d'autant que des hybrides naturels entre les deux sous-espèces sont décrits en Côte d'Ivoire (Challier *et al.*, 1983 ; Nekpeni *et al.*, 1989).



Le bois de Nyasafo - Janvier 1998

P. SOLANO.

Cette différence génétique des glossines suivant leur appartenance à un réseau hydrographique constituerait aussi un argument biologique en faveur du peu de différenciation observée entre les glossines de Yéguéré et celles de Samorogouan, qui ont en commun l'appartenance au réseau du Mouhoun.

Toutefois, cette hypothèse ne peut plus être invoquée concernant les glossines du Mali, qui elles aussi apparaissent « groupées » avec celles de Yéguéré et celles de Samorogouan dans notre dendrogramme. On atteint probablement ici la limite des informations apportées par le nombre de loci utilisés.



L'hypothèse avancée peut donc être formulée de la manière suivante : chez *G. palpalis gambiensis*, la structuration génétique des populations paraît conditionnée par l'appartenance des glossines à un réseau hydrographique donné. Les populations issues de réseaux hydrographiques distincts présenteraient plus de différences génétiques entre elles que des populations (même géographiquement distantes ?) d'un même réseau. La différenciation génétique ne serait donc pas directement liée à la distance géographique, mais plutôt à une distance entre bassins versants. Cette hypothèse ressort non seulement du travail présenté ici, mais aussi des nombreux travaux antérieurs de marquage-recapture (Clair *et al.*, 1976 ; Cuisance & Fevrier, 1983 ; Cuisance *et al.*, 1985b).

Un moyen de tester cette hypothèse serait de capturer des glossines appartenant à des réseaux distincts et d'observer si la différenciation génétique est liée à la distance séparant ces réseaux.

4. LA PCR COMME OUTIL DIAGNOSTIC DE LA TRYPANOSOMOSE ?

Nous avons aussi pu voir dans ce travail que la PCR a permis une détection des trypanosomes supérieure à l'examen parasitologique, et une caractérisation des trypanosomes à un niveau taxonomique très fin. Ces résultats confirment ceux déjà obtenus auparavant en utilisant cette technique (Solano *et al.*, 1995, 1996 ; Reifenberg, 1997a,b ; de La Rocque, 1997 ; Morlais, 1998 ; Lefrançois *et al.*, 1998a,b). Une particularité de nos résultats, d'un point de vue épidémiologique, réside dans le nombre important d'infections de l'intestin moyen non-identifiées par la PCR, que nous attribuons pour majorité à des infections de trypanosomes de reptiles (voir Lefrançois *et al.*, 1998a pour discussion). La PCR, dans ces travaux, mais aussi dans d'autres études (McNamara *et al.*, 1995 ; Woolhouse *et al.*, 1996) était en général utilisée comme un outil réservé à

une description fine de l'épidémiologie de la trypanosomose (Duvallat & Touré, 1994). Il est par exemple maintenant possible, chez les glossines, de différencier une infection due à *T. simiae* d'une infection à *T. congolense* comme nous l'avons déjà souligné (Chapitre 1), de même que l'on distingue de manière fréquente en Afrique de l'Ouest, les groupes taxonomiques « savane » et « forêt » de *T. congolense*. Un autre aspect des résultats, qu'il nous semble important de souligner par les perspectives qu'il ouvre, est l'application potentielle, en Afrique, de cet outil PCR dans l'objectif d'en faire un véritable test diagnostic sur l'hôte mammifère, étant donné le besoin dans ce domaine, souligné plus haut (voir aussi Katakura *et al.*, 1997). Nous avons en effet pu mesurer l'apport de cette technique, qui permet l'identification d'un nombre important d'infections passées inaperçues par l'examen microscopique. Les récentes améliorations de la technique au CIRDES, ont notamment pour conséquence une simplification drastique des protocoles utilisés (manuscrit en préparation) : il suffit maintenant, à partir du tube capillaire de sang, d'ajouter une solution aqueuse de Chelex^R (résine commerciale très économique) au prélèvement, et de réaliser la PCR directement à partir de cette solution. Il en est de même pour les études génétiques où cette solution de Chelex est ajoutée directement sur les pattes conservées à sec dans un tube eppendorf. La simplification de ces protocoles a notamment permis de réaliser une enquête de prévalence sur les bovins de la zone de Sidéradougou en comparant la parasitologie sur un échantillonnage de 1000 bovins (J.F. Michel, com. pers.), et la PCR sur 260 de ces prélèvements tirés au sort (Solano *et al.*, en prep.). Sur les bovins, les amorces utilisées étaient : *T. brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* savane et forêt. Les résultats ont montré une sensibilité de la PCR deux à trois fois plus importante que l'examen parasitologique, et ils ont surtout montré que de telles enquêtes en « grandeur réelle » pouvaient être réalisées en utilisant la PCR : sur 260 bovins (* 4 couples d'amorces), le temps mis pour l'analyse était de 3 semaines pour un budget de moins de 3000 FF (en consommables). Un des enseignements de cette étude est donc la possibilité d'avoir, grâce au diagnostic PCR, une estimation de la prévalence de l'infection trypanosomienne dans une zone donnée, qui soit rapide, fiable, et économique.

Certains aménagements réalisés pour réduire encore le prix de la technique afin de l'appliquer au diagnostic devraient rendre la PCR compétitive en assez peu de temps. Actuellement, aucun test ne présente en effet les qualités requises pour avoir une image d'une zone en terme d'infection par la trypanosomose, et la PCR nous semble une alternative réellement prometteuse. Des essais d'adaptation de ce test (PCR-ELISA) sont actuellement menés à l'ILRI Nairobi, en vue de l'évaluer en tant que test diagnostic de la trypanosomose (Morzaria, com. pers.).

5. IMPLICATIONS DE CES RESULTATS POUR LE CONTROLE DES TRYPANOSOMOSES ANIMALES AFRICAINES (TAA)

5.1 Stratégies de lutte : contrôle et éradication des vecteurs

Un des éléments actuels de la stratégie de lutte contre ce fléau réside dans le contrôle des populations de vecteurs, afin d'abaisser la pression de transmission à un niveau n'empêchant pas la productivité (Cuisance, 1991 ; Touré & Mortelmans, 1996). Actuellement, les programmes de lutte contre la T.A.A. se conçoivent à une échelle régionale en Afrique : des zones prioritaires par leur potentiel de développement agro-pastoral sont définies, les principales contraintes sont identifiées, et des programmes de lutte sont conçus (RTTCP, FITCA, Projet régional de lutte en Afrique de l'Ouest).

Une autre stratégie de lutte vise l'éradication totale des vecteurs, et est encore d'actualité sur des zones précisément ciblées (îles, régions isolées par des barrières naturelles). C'est ainsi que l'I.A.E.A a éliminé *G. tachinoides* de l'île de Zanzibar (I.A.E.A., 1997b) par la technique des mâles rendus stériles par irradiation au Césium 137.

Dans le premier type de stratégie (abaissement des densités), l'identification des populations réellement vectrices, permettrait de réaliser des économies substantielles sur les financements nécessaires à la lutte (cibles mieux définies), et donc de faire prendre en charge cette dernière plus facilement par les populations concernées. Ce ciblage des populations de vecteurs s'inscrit donc dans une approche d'identification spatiale des points épidémiologiquement dangereux. Et c'est dans ce but d'identifier les populations « dangereuses » que peut intervenir cet ensemble méthodologique permettant la description fine de la situation épidémiologique : {caractérisation génétique des vecteurs + détection des infections par PCR (chez le vecteur et les hôtes mammifères) + analyse des repas de sang des glossines}. Cet ensemble de « sous-couches » étant lui-même inclus dans d'autres couches d'informations sur l'entomologie, l'écologie, la répartition du bétail, etc. Ce type de méthodologie multidisciplinaire rendue possible par le développement des outils comme les SIG, conçue ici pour la zone de Sidéradougu en ce qui concerne les trypanosomoses animales, sera étendu à d'autres zones agro-pastorales dans d'autres régions, et englobera aussi les trypanosomoses humaines à cette échelle géographique.

Dans le cas où l'optique choisie est l'éradication, il faut être capable de prédire la possibilité de réinvasion des zones traitées pendant ou après le programme de lutte, et identifier rapidement et de manière fiable l'origine de ces réinvasions.

Or, nous l'avons vu, le polymorphisme de l'ADN microsatellite offre des perspectives nouvelles pour le marquage génétique des populations. On peut ainsi espérer, grâce à un « kit » de loci microsatellites, savoir rapidement à quelle population appartient un individu. Des indices existent (« genetic assignment ») qui permettent, selon la combinaison de génotypes à chaque locus, d'assigner un individu à la population dans laquelle cette combinaison a le plus de chances d'apparaître (Paetkau *et al.*, 1995). Ainsi par exemple, chez l'ours polaire connu pour sa philopatrie, en utilisant 8 loci microsatellites, ces auteurs arrivent à reconnaître la population d'origine de 60% des ours analysés. Ce type d'indices s'avère aussi très utile pour la gestion d'espèces dont l'habitat est fragmenté (Roy *et al.*, 1994 ; Goostrey *et al.*, 1998), dont l'intégrité génétique est menacée (Moazami-Goudarzi *et al.*, 1997), ou dont les populations ont subi un goulot d'étranglement. A titre de comparaison de techniques, Estoup *et al.* (1998) utilisent les isoenzymes et les microsatellites pour classer des truites (*Salmo trutta*) dans leur réseau hydrographique d'origine : un seul locus microsatellite (le plus polymorphe) classe aussi bien les individus que 8 loci isoenzymatiques. On comprend dès lors qu'appliquer aux glossines ces études permettrait de savoir précisément, une fois les populations caractérisées, l'origine géographique des réinvasions. Etant données leurs capacités de déplacement limitées, il faudrait alors renforcer les barrières empêchant la réinvasion du côté où on la soupçonne. Clairement, un plus grand nombre de loci augmenterait la robustesse des résultats. Ce type d'approche est actuellement utilisé dans l'aire du programme OCP (Onchocerciasis Control Program) pour déterminer d'où viennent les simules de réinvasion (Dumas *et al.*, en prep.).

Toujours dans une optique d'éradication, par exemple par lachers de mâles stériles, il semble nécessaire de caractériser génétiquement la population cible et de la comparer avec la population d'insectarium devant servir aux lachers. Si la différenciation génique est trop grande, les mâles stériles auront peu de chances de s'accoupler avec les femelles « sauvages », d'autant que les femelles ne s'accourent en général qu'une fois dans leur vie. Dans le cas de Sidéradougou en 1983, la population d'insectarium avait été constituée à partir de glossines issues de la même région géographique et élevées en masse, expliquant sans doute le succès de la technique incluse, de plus, dans une approche intégrée (Politzar & Cuisance, 1984).

De même, le fait d'avoir mis en évidence deux groupes génétiques vivant en sympatrie dans le bois de Nyarafo laisse à penser que des lachers de mâles stériles auraient des difficultés à venir à bout des populations naturelles, étant donné le peu d'échanges géniques soupçonnés entre ces deux groupes.

5.2 Comportement vis-à-vis des leurres

Il est aussi possible que les deux groupes génétiques d'individus mis en évidence à Nyarafo, vivant en sympatrie, aient développé des comportements distincts vis-à-vis des leurres employés. Cuisance (com. pers.) rapporte ainsi que parmi les glossines attirées par les pièges, moins de 40% y entrent réellement. Existe-t'il des différences entre les populations sur cet aspect ? Ces comportements peuvent avoir des bases physiologiques : ainsi au Zimbabwe, les glossines capturées en plus grand nombre (*G. pallidipes* et *G. m. morsitans*) par les pièges sont les femelles qui ont une larve en cours de développement (Groenendijk, 1996). Chez les mâles, ce même auteur relie la probabilité de capture (par piège avec attractifs olfactifs) avec le temps depuis lequel l'individu ne s'est pas nourri. En installant des pièges au même endroit pendant une longue durée, Williams *et al.* (1990) observent des variations de densité significatives dans les captures selon les jours. Mais, selon Packer & Brady, in Groenendijk (1996), une proportion de 20 à 40% de glossines évite les écrans électriques sans qu'il y ait de raison de penser que l'état physiologique influe sur ce comportement d'évitement. Notons que le fait de ne pas entrer dans les pièges peut aussi résulter d'une somme de facteurs pas toujours faciles à identifier : par exemple, la densité de la végétation et la faible dispersion des glossines dans un biotope favorable, qui empêcheraient simplement les glossines de « voir » le piège (rapport annuel CRTA, 1983).

Alors que les glossines avaient disparu de la presque totalité du réseau hydrographique après une année de lutte par piégeage et lachers de mâles stériles (1982-1983), c'est précisément dans de rares poches, dont le bois de Nyarafo, que les équipes chargées de l'éradication des glossines ont eu le plus de difficultés à mener à bien cette tâche (Cuisance *et al.*, 1985a). La végétation y est dense, composée en partie de racines aériennes de *Ficus spp.*, et *G. palpalis gambiensis* se disperse très peu, comme l'ont montré des études de marquage-recapture (Cuisance & Fevrier, 1983). Cette faible dispersion, associée à la forte densité de végétation, et peut-être à des particularités comportementales (le mélange de populations détecté dans notre étude existait-il déjà ?), fait que les glossines ne viennent pas se poser sur les écrans imprégnés d'insecticide. De ce fait, le protocole initial d'un écran tous les 100 mètres avait dû être modifié localement en installant un piège tous les 10-20 mètres en saison sèche, suivi par des lachers intensifiés de mâles stériles pour réussir à venir à bout de ces glossines « récalcitrantes ». Si, comme on peut le suspecter, certaines glossines développent un comportement d'évitement des pièges, quelques-unes de ces glossines

entrant par « hasard » dans nos pièges (situés à moins de 100 mètres les uns des autres) expliqueraient la présence d'un mélange de populations, à condition qu'il y ait une base génétique à ce comportement d'évitement des pièges. On pourrait par exemple s'intéresser à des différences génétiques éventuelles, entre des glossines capturées dans les pièges seuls et dans des pièges avec attractifs olfactifs, ou encore de disposer d'écrans électriques (invisibles pour les glossines) pour capturer celles qui verraient le leurre, mais n'y entreraient pas. On pourrait aussi proposer de capturer des glossines autour des troupeaux de bovins.

5.3 Manipulation génétique des vecteurs

Depuis quelques années déjà, est apparue l'idée de manipuler génétiquement les vecteurs comme moyen de lutte. Ainsi chez les moustiques vecteurs du paludisme, dans le complexe *An. gambiae* s.l., il existe des espèces anthropophiles (*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*) responsables du paludisme et des espèces zoophiles (*An. quadriannulatus*), potentiellement peu dangereuses pour l'homme. Ces espèces sont des espèces jumelles et s'hybrident donc très peu, voire pas du tout dans la nature (Tabachnick & Black, 1995). L'idée serait de rendre ces gènes « zoophiles » fixés, afin de modifier le comportement des espèces anthropophiles (Curtis, 1994).

Comment ne pas penser à l'appliquer à *G. palpalis gambiensis*, notamment au Burkina Faso où certaines populations paraissent caractérisées par une forte propension à piquer les reptiles ? Par opposition, *G. tachinoides* par exemple semble préférer les ruminants ou les suidés (Laveissière, 1978 ; Kupper *et al.*, 1990 ; Clausen *et al.*, 1998). De manière plus générale, les glossines du groupe *palpalis* sont beaucoup plus inféodées aux reptiles que les glossines du groupe *morsitans* (Boreham & Gill, 1976) chez lesquelles un repas de sang pris sur varan pourrait même être toxique (I.C.I.P.E. 1997). S'agit-il uniquement d'une probabilité de rencontres liée au mode de vie (glossines riveraines/glossines savanicoles), ou existe-t'il une base génétique à ces préférences trophiques ? Ces questions soulèvent aussi le problème d'avoir une bonne technique d'identification des repas de sang : la technique actuellement employée au CIRDES (Kaboré *et al.*, 1994) donne des résultats apparemment satisfaisants ; elle présente toutefois l'inconvénient de nécessiter une grande quantité de résidus sanguins, rendant les pourcentages d'identification quelquefois faibles. Une technique utilisant la PCR serait désirable et est en cours de développement (Truc *et al.*, 1998). On pourrait à ce moment savoir si des populations génétiquement distinctes vivant en sympatrie dans un biotope favorable occupent des niches écologiques distinctes, en se nourrissant par exemple sur des hôtes

différents. Le rôle vecteur de ces populations ne serait alors pas le même. Le cas de Nyarafo illustrerait tout à fait ce type d'approche.

D'autres types de manipulations génétiques décrites dans la littérature partent de la propriété qu'ont certains symbiontes (*Wolbachia spp.*) des glossines (mais aussi d'autres insectes), d'induire des mécanismes de stérilité au sein de populations conspécifiques (Curtis, 1994), propriété qu'ils partagent avec des éléments transposables (type *mariner* de la drosophile) qui ont aussi été mis en évidence chez les glossines (Blanchetot & Gooding, 1995). L'objectif de ces travaux est en général d'utiliser ces éléments transposables comme « vecteur » de gène d'intérêt, par exemple pour rendre des populations réfractaires à l'infection. Dans cette approche, les études de génétique des populations trouvent toute leur importance. Il est en effet indispensable de connaître les flux de gènes entre populations conspécifiques afin de savoir comment vont se disséminer ces éléments ou organismes employés (Dale *et al.*, 1995b). Ainsi à Nyarafo, et même dans la zone de Sidéradoukou, on peut douter de l'efficacité de telles méthodes (si elles étaient appliquées), car le flux de gènes restreint entre les populations ne permettrait pas une dissémination correcte des éléments introduits. La solution, à ce moment, consisterait à diriger les *Wolbachia* spécifiquement contre l'une des deux populations, reconnue comme ayant le rôle vecteur le plus important, par exemple.

6. EXTENSION A D'AUTRES ESPECES

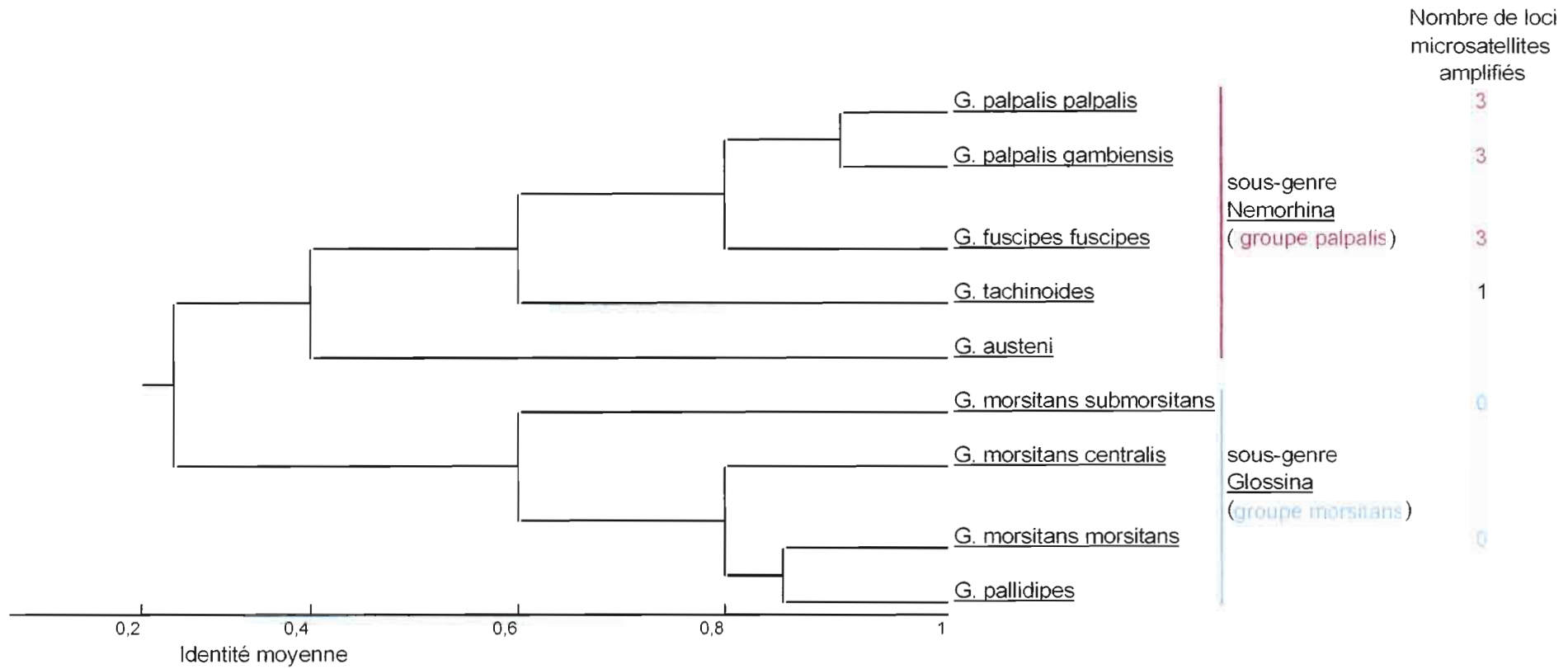
Les trois loci microsatellites définis dans le cadre de cette étude chez *G. palpalis gambiensis* ont également permis d'amplifier l'ADN de taxons les plus proches phylogénétiquement (voir Figure 24) : la sous-espèce voisine *G. p. palpalis*, et *G. f. fuscipes*. De plus, les produits d'amplification étaient clairs, reproductibles, et un polymorphisme sur les deux premiers loci a été observé. Ces résultats suggèrent l'extension possible de ce type d'études à d'autres taxons. Cette approche permettrait réellement de savoir si, comme on peut le soupçonner, des populations d'une même espèce transmettent la maladie avec une efficacité différente. Grâce à la mise au point de ces microsatellites, des travaux similaires ont actuellement lieu au Cameroun sur *G. p. palpalis* (Bodo, com. pers.) dans les foyers de trypanosomose humaine. Les résultats préliminaires obtenus montrent que les bandes observées chez *G. p. palpalis* sont situées dans les mêmes tailles que chez *G. p. gambiensis*, apportant un argument supplémentaire à l'existence de contraintes liées à la taille des séquences microsatellites (Garza *et al.*, 1995 ; Nauta & Weissing, 1996). Ces travaux ont de plus déjà permis d'observer que les autres glossines du sous-genre *Nemorhina* sur lesquelles ont été

testés les trois paires d'amorces (*G. p. pallicera*, *G. caliginea*) montrent des signaux clairs, reproductibles et polymorphes (Bodo et Morlais, com. pers.). *G. tachinoides* semble faire exception, car un seul locus (19.62) a donné un signal d'amplification sur cette espèce, mais deux individus seulement ont été testés. Bien que les PCR aient été réalisées plusieurs fois, on ne tirera pas de conclusions hâtives. On remarque simplement que si *G. tachinoides* appartient bien au sous-genre *Nemorhina*, c'est l'espèce qui, par ses exigences écologiques, est la plus proche des glossines savaniques (sous-genre *Glossina*), et c'est l'espèce phylogénétiquement la plus éloignée de *G. palpalis* s.l. (voir figure 24). Nombreuses sont les études qui décrivent des microsatellites isolés sur un taxon, puis dérivés à d'autres. Ainsi Moore *et al.* (1991) se servent de microsatellites de bovins et montrent que ces séquences sont conservées, ainsi que leurs séquences flanquantes, chez les ovins (56% des 48 microsatellites utilisés), les équins (6.2%), mais pas chez l'homme. Les microsatellites dérivés de bovins sont aussi utilisés chez le cerf (Pemberton *et al.*, 1995; Maudet, 1998) ou le buffle (Simonsen *et al.*, 1998) par exemple. Chez les Félinidae, Menotti-Raymond & O'Brien (1995) isolent 10 microsatellites du chat domestique et les trouvent polymorphes chez plusieurs espèces sauvages (guépard, puma, lion...). Chez les insectes, les exemples sont moins nombreux, citons l'abeille *Apis*, pour laquelle les microsatellites isolés sont aussi polymorphes chez les espèces voisines (Estoup *et al.*, 1995d) ; également les fourmis (Gertsch *et al.*, 1995), ou les tiques à partir d'*Ixodes ricinus* (Delaye *et al.*, 1998).

Ces exemples offrent des perspectives pour étendre ce type d'études à d'autres espèces. Dans le cadre des approches développées dans ce travail, il semblerait par exemple indiqué d'appliquer la technique sur *G. tachinoides* dans la zone de Sidéradougou. On saurait alors si les types de structuration génique observés sont les mêmes que chez *G. palpalis gambiensis* avec comme objectif une meilleure compréhension de la nature des « barrières » aux flux géniques existant chez les glossines (écologique, géographique ?), et l'influence sur la capacité de celles-ci à disséminer la maladie. Il serait aussi intéressant de développer ces marqueurs chez des glossines du sous-genre *Glossina* (groupe *morsitans*), d'intérêt vétérinaire important pour la transmission des trypanosomoses animales.

Figure 24 : Phenogramme de 9 taxons de glossines,
basé sur 12 loci isoenzymatiques

(Gooding, 1982, modifié).



Conclusion

et

Perspectives

Ce travail est le premier du genre à utiliser le polymorphisme de l'ADN microsatellite pour caractériser génétiquement des populations naturelles de glossines. Les résultats obtenus ont montré que cet outil permet de différencier les populations de *Glossina palpalis gambiensis* au niveau intra (sub)spécifique, d'une part à une première échelle de répartition du taxon au niveau continental, et d'autre part à l'échelle plus fine d'une zone agro-pastorale. Il reste évident que l'ajout de quelques loci supplémentaires apporterait plus de robustesse aux résultats et permettrait d'aller plus loin dans les analyses.

De même, l'extension à d'autres taxons de glossines permettrait la caractérisation génétique de l'ensemble des espèces et sous-espèces de ce vecteur peuplant une zone donnée.

Les tendances actuelles sont de concevoir les programmes de lutte à une échelle des projets de développement sur des zones reconnues comme potentiellement favorables à un développement intégré de l'agriculture et de l'élevage. Dans cette optique, il est impératif de développer des outils ayant un potentiel de diagnostic rapide et fiable de situations impliquant une intervention : la PCR comme technique de diagnostic de l'infection chez les glossines et chez l'hôte est très prometteuse (baisse des coûts, simplification des protocoles, efficacité), de même que le marquage génétique des populations de vecteurs. Ces études, associées à l'analyse des repas de sang des glossines, constituent une analyse fine du système hôte-parasite-vecteur à l'échelle d'une zone agro-pastorale. De plus, cet ensemble représente de manière nouvelle par sa précision et son importance, une couche d'informations qui, associée aux données agro-écologiques et socio-économiques, permet le diagnostic de situations débouchant sur l'optimisation des stratégies d'intervention à mettre en œuvre pour le développement.

Les études de génétique des populations utilisant les microsatellites offrent, en particulier, de multiples applications et pourraient permettre de répondre aux nombreuses questions soulevées par ce travail. Ceci est un apport récent dans le sens où il n'existait pas, jusque là, d'outil offrant l'accès à une information génétique aussi riche au niveau intraspécifique. D'un point de vue « fondamental », l'approche génétique associée à la morphométrie est susceptible de fournir de nouvelles informations, sur la connaissance des populations et la taxonomie de l'organisme étudié. Ces éléments peuvent apporter des éclairages importants, notamment en terme de compétence et capacité vectorielle distincte entre différents taxons. D'un point de vue plus appliqué, ces études apportent une meilleure compréhension du fonctionnement d'une partie du système pathogène (connaissance de la dispersion, des mouvements de population, des échanges entre individus, et leur conséquences sur la survie des parasites) et soulèvent aussi beaucoup de questions, auxquelles il est maintenant possible de trouver des éléments de réponse, comme l'illustrent ces quelques exemples.

▫ Des différences génétiques entre populations de glossines peuvent-elles être associées à des différences de préférences trophiques, ou le choix des hôtes est-il uniquement conditionné par la rencontre ? S'il semble exister des groupes d'espèces ayant en commun certaines préférences (Weitz, 1963), on ne peut que le soupçonner au niveau intraspécifique. Dans certains foyers ou régions où les trypanosomoses (animales et humaines) sévissent et où la disponibilité en hôtes (domestiques et sauvages) n'est pas limitée, il paraît intéressant de voir s'il existe, au niveau intraspécifique, des glossines adaptées à différentes niches écologiques.

▫ les glossines montrant un évitement des pièges ou autres leurres sont-elles génétiquement isolées ? Ce type d'approche pourrait être mis en œuvre en comparant génétiquement les glossines attirées (ou pas) par divers moyens de capture.

▫ La conquête de milieux atypiques pour les glossines, comme le milieu péri-domestique par exemple, résulte-t-elle de changements génétiques dans les populations, va-t-elle en produire, ou est-elle le fait d'une catégorie particulière d'individus ? L'intérêt serait de pouvoir prédire ce type de comportements afin d'enrayer l'émergence ou la ré-émergence de foyers de maladie.

▫ Quel rôle jouent les R.L.O. dans la compétence vectorielle ? Ces organismes, héréditaires par voie maternelle cytoplasmique, semblent conditionner, au moins en partie, la susceptibilité des glossines à l'infection. Il existe des sondes « R.L.O. » (Gibson & Welburn, 1989) qui ont permis d'observer que toutes les populations naturelles d'une espèce de glossine ne possèdent pas forcément ces R.L.O. (Welburn *et al.*, 1990), et que le taux d'infection trouvé chez ces glossines semble lié à la présence de ces R.L.O.. Il semblerait intéressant d'associer ces deux techniques (génétique des populations et détection des R.L.O.) afin d'observer éventuellement si les différences génétiques observées (ici chez *G. palpalis gambiensis*) ne reflètent pas, par exemple, des accouplements préférentiels entre glossines R.L.O.+ d'un côté, et R.L.O.- de l'autre.

▫ On sera bientôt capable, si ces études se poursuivent, d'effectuer un « traçage » des glossines. Traçage « artificiel », dans le cas de lutte génétique par lâchers de mâles stériles, qui suppose une caractérisation génétique préalable des populations lâchées, ainsi que de la population cible. Traçage « naturel », afin d'identifier l'origine des réinvasions, donc les lieux stratégiques à renforcer (par des barrières d'isolement, par exemple), en caractérisant les glossines grâce à un ensemble de loci microsatellites. Si le contrôle des populations vectrices par manipulation génétique se concrétise à moyen terme, il sera indispensable de connaître la distribution des flux géniques et la dynamique des populations naturelles cibles.

▫ De manière plus générale, depuis quelques années on assiste à un essor des études sur l'épidémiologie moléculaire de diverses pathologies. Ces travaux se sont toutefois adressés prioritairement à la parasitologie, et une somme intéressante de connaissances

est maintenant disponible sur le mode de reproduction des parasites, et sur l'évolution récente de la taxonomie. Sur certains vecteurs, qui sont bien les agents transmetteurs de parasitoses, les connaissances sont beaucoup plus fragmentaires, et peu de projets s'intéressent aux études au niveau intraspécifique. Les quelques résultats obtenus jusqu'ici, comme en atteste (entre autres) le travail présenté, soulignent l'intérêt et l'importance de mesurer les échanges génétiques entre populations vectrices dites de la même espèce. Rappelons que chez les glossines en particulier, toute la classification repose essentiellement sur des critères morphologiques, or chez d'autres vecteurs, notamment diptères, cette classification s'est vue bouleversée lorsque d'autres techniques ont été appliquées.

α Ce même type de méthodologie se développe actuellement pour d'autres pathologies d'importance économique (maladies transmises par les tiques) : en particulier, la nécessité de savoir si le choix d'hôtes pour les tiques conduit à une séparation des niches écologiques, donc des flux de gènes, et à des phénomènes possibles de spéciation ; ces études de génétique sont incluses dans une approche spatiale de prévision du risque (de Garine-Wichatitsky, com. pers.). L'intégration spatiale de différentes pathologies, dans une démarche plus globale, pour en dégager des indicateurs d'interventions, semble souhaitable afin d'optimiser ces dernières dans un but de développement durable. Les études de génétique des populations de vecteurs au niveau intraspécifique trouvent leur place dans ces approches et prennent un essor considérable, par exemple en santé humaine avec le paludisme.

D'après les premiers résultats présentés dans le cadre de ce travail sur les caractéristiques génétiques des vecteurs, il apparaît nécessaire de multiplier ces études de manière à les rendre plus rapides et plus robustes. Intégrées aux travaux sur les autres composants du système hôte-parasite-vecteur, ces recherches permettront d'apporter des éléments de réponse important à une question primordiale en épidémiologie : Qui transmet quoi ?

Bibliographie

- Abernethy K. (1994). The establishment of a hybrid zone between red and syka deer (genus *Cervus*). *Molec. Ecol.*, 3, 551-562.
- Adamson R.E., Ward R.D., Feliciangeli D. & Maingon R. (1993). The application of RAPD for sandfly species identification. *Med. Vet. Entomol.*, 7, 203-207.
- Agu W.L. (1984). Comparative study of the susceptibility to infection with *Trypanosoma simiae* of *Glossina morsitans* and *G. tachinoides*. *Acta Trop.*, 41, 131-134.
- Amos B., Schlötterer C. & Tautz D. (1993). Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 260, 670-672.
- Artama W.T., Agey M.W. & Donelson J.E. (1992). DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* and *T. brucei* spp. *Parasitology*, 104, 67-74.
- Atouguia J. & Costa J. (1998). Therapy of human African Trypanosomiasis : current situation. 2nd WCST, e-mail conference, 03/98.
- Authié E. (1984). Mise en évidence d'une résistance aux trypanocides parmi des stocks de *Trypanosoma congolense* récemment isolés au Burkina Faso. *Rev. Elev. Méd. vét. pays Trop.*, 37, 219-235.
- Avisé J.C. (1975). Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, 23, 465-481.
- Bauer B., Petrich-Bauer J., Kaboré I., Kourouma B., Mattausch M., Somé J., Tamboura I. (1987). Epidemiological survey in the pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. Proceedings of an international symposium on modern insect control : nuclear techniques and biotechnology, Vienna, 16-20/11/87.
- Bauer B., Amsler-Delafosse S., Clausen P.H., Kabore I. & Petrich-Bauer J. (1995). Successful application of deltamethrin pour on to cattle in a campaign against tsetse flies (*Glossina* spp.) in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina-Faso. *Trop. Med. Parasitol.*, 46, 183-189.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F, 1996 - 1998. GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Blanchetot A. & Gooding R.H. (1995). Identification of a mariner element from the tsetse fly, *Glossina palpalis palpalis*. *Insect Molec. Biol.*, 4 (2) 89-96.
- Boreham P.F.L. & Gill G.S. (1973). Serological identification of reptile feeds of *Glossina*. *Acta Trop.*, 30 (4), 365.
- Bouffard (1912). Rapport sur le fonctionnement du laboratoire vaccinogène et de biologie de Bamako. In Recueil des "Supplément au journal officiel" de l'Afrique Occidentale

- Française. Rapports de mission - Etudes techniques. Imprimerie du gouvernement général de Gorée. P 41-67.
- Bowcock A.M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J.R. & Cavalli-Sforza L.L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368, 455-457.
- Brookfield J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molec. Ecol.*, 5, 453-455.
- Bruckner D. (1976). The influence of genetic variability on wing symmetry in honeybees (*Apis mellifera*). *Evolution*, 30, 100-108.
- Bruford M.W. & Wayne R.K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Cur. Op. Genet. Dev.*, 3, 939-943.
- Burchard R.P. & Baldry D.A.T. (1970). Polytene chromosomes of *Glossina palpalis* Robineau-Desvoidy (Diptera: Muscidae). I. The preliminary demonstration. *Proc. R. Ent. Soc. London*, 45 (10-12), 182-183.
- Bursell E. (1960). The measurement of size in tsetse flies. *Bull. ent. Res.*, 51, 33-37.
- Bursell E. (1966). The nutritional states of tsetse flies from different vegetation types in Rhodesia. *Bull. Ent. Res.*, 57, 171-180.
- Buxton P.A. (1955). The natural history of tsetse flies. London School of Hygiene and Tropical Medicine, memoir 10, 816 pp.
- Callen D.F., Thompson A.D., Shen Y., Phillips H.A., Richards R.I., Mulley J.C. & Sutherland G.R. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.*, 52, 922-927.
- Chakraborty R. & Nei M. (1977). Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the stepwise mutation model. *Evolution* : 31, 347-356.
- Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P. & Budowle B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann. Hum. Gen.*, 56, 45-47.
- Challier A. & Laveissière C. (1973). Un nouveau piège pour la capture des glossines, description et essais sur le terrain. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, XI (4), 251-262.
- Challier A. (1973). Ecologie de *G. palpalis gambiensis* en savane d'Afrique Occidentale. *Mem. O.R.S.T.O.M.*, 64, 274 pp.
- Challier A. (1982). The ecology of tsetse (*Glossina spp.*) : a review. *Insect Sci. Appl.*, 3, 97-143.
- Challier A., Gouteux J.P. & Coosemans M. (1983). La limite géographique entre les sous-espèces *Glossina palpalis palpalis* (Rob.-Desv.) et *Glossina palpalis gambiensis*

- Vanderplanck en Afrique occidentale. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. Parasitol., XXI (4), 207-220.
- Challier A. & De Jardin J. (1987). Variations morphologiques chez les mâles de *Glossina palpalis palpalis* (Rob.-Desv.) et *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplanck. Leurs implications taxonomiques. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. Parasitol., numéro spécial, 83-99.
- Chevillon C., Rivet Y., Raymond M., Rousset F., Smouse P.E. & Pasteur N. (1998). Migration/selection balance and ecotypic differentiation in the mosquito *Culex pipiens*. Molec.Ecol., 7, 197-208.
- Clair M., Politzar H., Cuisance D., Lafaye A. (1976). Observations sur un essai préliminaire de lâchers de mâles stériles de *Glossina palpalis gambiensis*. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop., 29, 4, 341-351.
- Clausen P.H., Sidibé I., Kaboré I. & Bauer B. (1992). Development of multidrug resistance to *Trypanosoma congolense* under high natural tsetse challenge in the pastoral zone of Samorogouan. Acta trop., 51, 229-236.
- Clausen P.H., Adeyemi I., Bauer B., Breloer M., Salchow F. & Staak C. (1998). Host preferences of tsetse based on bloodmeal identifications. Med. Vet. Entomol., 12, 169-180.
- Collins F.H. (1994). Prospects for malaria control through the genetic manipulation of its vectors. Parasitol. today, 10 (10), 370-371.
- Combes C. (1995). Interactions durables, Ecologie et évolution du parasitisme. Masson, Paris, 524 pp.
- Coosemans M., Smits A. & Roelants P. (1998). Intrapsecific isozyme polymorphism of *Anopheles gambiae* in relation to environment, behaviour, and malaria transmission in southwestern Burkina Faso. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58 (1), 70-74.
- Couch, F.J., Kioussis S., Castilla L.H., Xu J., Chandrasekharappa S.C., Chamberlain J.S., Collins F.S. & Weber B.L. (1994). Characterization of 10 new polymorphic dinucleotide repeats and generation of a high-density microsatellite-based physical map of the BRCA1 region of chromosome 17q21. Genomics 24, 419-424.
- Couillin Ph., Le Guern E., Vignal A., Fizames C., Ravisé N., Delport D., Reguigne I., Rosier M.F., Junien C., van Heyningen V. & Weissenbach J. (1994). Assignment of 112 microsatellite markers to 23 chromosome 11 subregions delineated by somatic hybrids: comparison with the genetic map. Genomics, 21, 379-387.
- Cuisance D., Politzar H., Clair M., Sellin E., Taze Y. (1978). Impact des lâchers de mâles stériles sur les niveaux de deux populations sauvages de *G. palpalis gambiensis* en Haute-Volta. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop, 31, 315-328.

- Cuisance D. & Politzar H. (1981). Elevage de *G. palpalis gambiensis* en Afrique : Bilan de 6 années d'élevage sur animaux nourriciers. Coll. Int., Neuherberg, Allemagne, 29/06-31/07/1981.
- Cuisance D. & Fevrier J. (1983). Etude sur le pouvoir de dispersion des glossines. Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales, IEMVT, OMS, CRTA.
- Cuisance D. & Politzar H. (1983). Etude sur l'efficacité contre *Glossina palpalis gambiensis* et *G. tachinoides* de barrières constituées d'écrans ou de pièges biconiques imprégnés de DDT, de deltaméthrine, ou de dieldrine. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop, 36, 159-168.
- Cuisance D., Politzar H., Merot P., Tamboura I., Bauer B., Kabore I., Filledier J. (1985a). La campagne de lutte intégrée contre les glossines dans la zone pastorale d'accueil de Sidéradougou. 18^e réunion CSIRLT, Harare, Zimb, 04-09/03/85.
- Cuisance D., Fevrier J., Dejardin J., Filledier J. (1985b). Dispersion linéaire de *Glossina palpalis gambiensis* et *G. tachinoides* dans une galerie forestière en zone soudano-guinéenne. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop, 38, 2, 153-172.
- Cuisance D. (1991). Trypanosomoses : justification pour le contrôle ou l'éradication. In Programme for the control of african animal trypanosomiasis and related development ; Ecological and technical aspects. FAO animal production and health paper, 177-197.
- Cuisance D. (1994). Etude de la trypanosomose animale sans glossines dans le Nord-Cameroun. Evaluation technique du projet. Rapport CIRAD-EMVT, Montpellier, France, 20 pp.
- Cuisance D. (1998). Glossines et trypanosomes. Document de cours Institut Pasteur, Entomologie Médicale, 84 pp.
- Cuisance D. & de La Rocque S. (1998). Tsé-tsé et trypanosomes : du système pathogène à l'évaluation du risque. Coll. Progr. Environnement, vies et sociétés, CNRS, 25-26/05/98, Paris, France.
- Curtis C.F. (1994). The case for malaria control by genetic manipulation of its vectors. Parasitol. today, 10 (10), 371-374.
- Dale C., Welburn S.C. & Crampton J.M. (1995b). Transgenic tsetse flies: a future vector control strategy? CSIRLT, Kampala, Ouganda, 22^e réunion. Stockwatch Ltd, Nairobi, Kenya.
- Dale C., Welburn S.C., Maudlin I. & Milligan P.J.M. (1995a). The kinetics of maturation of trypanosome infections in tsetse. Parasitol., 111, 187-191.
- Dallas J.F., Dod B., Boursot P., Prager E.M. & Bonhomme F. (1994). Population subdivision and gene flow in Danish house mice. Molec. Ecol., 4, 311-320.

- Daly H.V. (1985). Insect morphometrics. *Ann. Rev. Entomol.*, 30, 415-438.
- De Haan C. & Bekure S. (1991). *Animal Health services in Sub-Saharan Africa: Initial experiences with new approaches*. Washington D.C.: World Bank.
- De La Rocque S. & Cuisance D. (1997). Facteurs discriminants de la présence de glossines au Burkina Faso. Intérêt dans la prévision du risque de trypanosomoses. *Comptes rendus VIII° ISVEE, Epidémiol. santé anim.*, 31-32.
- De La Rocque S. (1997). Identification des facteurs discriminants majeurs de la présence des glossines dans une zone agro-pastorale du Burkina Faso. Intérêt pour la prévision du risque trypanosomien. Thèse Université Montpellier II, 146 pp.
- De La Rocque S., Geoffroy B., Borne F., Petiteau L., Meunier J.Y., Solano P. & Cuisance D. (1998). Les ailes de glossines, carte d'identité de l'insecte ? *Rev. Elev. Méd. Vét. pays Trop.*, accepté.
- Delafosse A., Bengaly Z. & Duvallet G. (1996). Utilisation du test ELISA de détection des antigènes circulants de trypanosomes dans le cadre d'un suivi épidémiologique dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 49 (1) : 32-37.
- Delaye C., Aeschlimann A., Renaud F., Rosenthal B. & De Meeüs T. (1998). Isolation and characterization of microsatellite markers in the *Ixodes ricinus* complex. *Molec. Ecol.*, 7, 360-361.
- Desquesnes M. & de La Rocque S. (1995). Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite. *Rev. Elev. Méd. vét. pays Trop.*, 48 (3), 247-253.
- Desquesnes M. & Tresse L. (1996). Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. *Rev. Elev. Méd. vét. pays Trop.*, 49 (4), 322-327.
- Desquesnes M. (1996). Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for african trypanosomes with an isolate of *Trypanosoma vivax* from French Guyana. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 791, 172-184.
- Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., Valdes A.M., Slatkin M. & Freimer N.B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3166-3170.
- Diall O., Bajjana Songa E., Magnus E., Kouyate B., Diallo B., Van Meirvenne N. & Hamers R. (1994). Evaluation d'un test sérologique d'agglutination directe sur carte dans le diagnostic de la trypanosomose caméline à *T. evansi*. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 13, 793-800.

- Dickin, S.K. & Gibson, W.C. (1989). Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. Mol. Biochem. Parasitol., 33, 135-142.
- Dirie M.F., Murphy N.B. & GARDINER P.R. (1993). DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* rapidly identifies intraspecific relationships. J. Euk. Microbiol., 40, 132-134.
- Distelmans W., D'Haeseleer F., Kaufman L. & Rousseeuw P. (1982). The susceptibility of *Glossina palpalis* at different ages to infection with *T. congolense*. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 62, 41-47.
- Djiteye A., Moloo S.K., Foua Bi K., Coulibaly E., Diarra M., Ouattara I., Traoré D., Coulibaly Z. & Diarra A. (1997). Variations saisonnières de la densité apparente et du taux d'infection par *Trypanosoma spp.* de *Glossina palpalis gambiensis* en zone soudanienne au Mali. Rev. Elev. Méd. vét. pays Trop., 50, 2, 133-137.
- Dransfield R.D. & Brightwell R. (1989). Problems of field testing theoretical models ; a case study. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 69, 147-154.
- Dujardin J.P. & Tibayrenc M. (1985). Etude de 11 enzymes et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans*. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 65, 271-280.
- Dujardin J.P., Bermudez H. & Schofield C.J (1997a). The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. Acta trop., 66, 145-153.
- Dujardin J.P., Torrez E.M., Le Pont F., Hervas D. & Sossa D. (1997b). Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. Med. Vet. Entomol. 1, 394-400.
- Dujardin J.P., Munoz M., Chavez T., Ponce C., Moreno J. & Schofield C.J. (1998). The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. Med. Vet. Entomol., 12, 113-115.
- Dumas V., Herder S., Bebbia A., Cadoux-Barnabe C., Bellec C. & Cuny G. (1998). Polymorphic microsatellites in *Simulium damnosum s.l.* and their use for differentiating two savannah populations. Implications for epidemiological studies. Genome, 41, 154-161.
- Duvallet G. & Touré S.M. (1994). Transfert de nouveaux outils biotechnologiques au CIRDES pour une meilleure connaissance des trypanosomoses animales et de leur épidémiologie. Tropicultura, 12 (4), 155-156.
- Elsen P., de Lil E. & Roelants P. (1989). Première mise en évidence de chromosomes polytènes chez les glossines adultes. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 69, 245-250.
- Elsen P. (1991). Nouvelle approche pour l'étude de la cytotaxinomie des vecteurs. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 71 (suppl.1), 219-224.
- Elsen P., Dujardin J.P., Roelants P., de Lil E., Van Bortel W. & Van Heed (1991). Historique et caractérisation génétique de deux lignées de *Glossina palpalis*

- gambiensis* de même origine géographique. Trypanosomiasis seminar, Anvers, 11-12/12/91.
- Elsen P., Roelants P., De Lil E., Dujardin J.P., Le Ray D. & Claes Y. (1994). Cytogenetic and isozymic comparisons of two laboratory lines of *Glossina palpalis gambiensis*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 88 (5), 511-522.
- Epplen J.T. (1992). Diagnostic applications of repetitive DNA sequences. Clinica Chemica Acta, 209, S5-S13.
- Estoup A., Garnery L., Solignac M. & Cornuet J.M. (1995a). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation model. Genetics, 140, 679-695.
- Estoup A., Scholl A., Pouvreau A. & Solignac M (1995b). Monoandry and polyandry in bumble bees as evidenced by highly variable microsatellites. Molec. Ecol., 4, 89-93.
- Estoup A., Solignac M. & Cornuet J.M., Goudet J. & Scholl A. (1995c). Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* in Europe. Molec. Ecol., 4, 252.1-252.13.
- Estoup A., Tailliez C., Cornuet J.M. & Solignac M. (1995d). Size homoplasmy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). Mol. Biol. Evol., 12 (6), 1074-1084.
- Estoup A., Rousset F., Michalakakis Y., Cornuet J.M., Adriamanga M. & Guyomard R. (1998). Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers : a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). Molec. Ecol., 7, 339-353.
- Falconer D.S. (1981). Introduction to quantitative genetics. New York, Longman, 340 pp, 2nd ed.
- FAO (1994). The coordination of research and development within a global program to clarify and solve the problem of African Animal Trypanosomiasis. Meeting of FAO/IAEA, Vienne, 22-25/11.
- Fasogbon A.I., Knowles G. & Gardiner P.R. (1990). A comparison of the isoenzymes of *Trypanosoma vivax* isolates from East and West Africa. Int. J. Parasitol., 20, 389-394.
- Frézil J.L. & Cuisance D. (1994). Trypanosomiasis, maladies d'avenir : leurs perspectives et leurs inconnues. Bull. Soc. Pathol. Ex., 87, 391-393.
- Gardiner P. (1989). Recent studies on the biology of *Trypanosoma vivax*. Adv. Parasitol., 28, 229-317.
- Garms R. (1978). Use of morphological characters in the study of *Simulium damnosum* populations in West Africa. Trop. Med. Parasitol., 29, 483-491.

- Garza J.C., Slatkin M. & Freimer N.B. (1995). Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Mol. Biol. Evol.*, 12 (4), 594-603.
- Gerloff U., Schlötterer C., Rassmann K., Rambold I., Hohmann G., Fruth B. & Tautz D. (1995). Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Molec. Ecol.*, 4, 515-518.
- Gertsch P., Pamilo P. & Varvio S.L. (1995). Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants. *Molec. Ecol.*, 4, 257-260.
- Gibson W.C. (1986). Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up ? *Parasitol. today*, 2, 255-257.
- Gibson W.C., Dukes P. & Gashumba J.K. (1988). Species-specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitology*, 97, 63-73.
- Gibson W.C. (1989). Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T.b. brucei*. *Parasitology*, 99, 391-402.
- Gibson W.C. & Ferris V. (1992). Sequential infection of tsetse flies with *Trypanosoma congolense* and *T. brucei*. *Acta Trop.*, 50, 345-352.
- Glasgow J.P. (1961). Selection for size in tsetse flies. *J. Anim. Ecol.*, 30, 87-94.
- Godfrey D.G., Baker R.D., Rickman L.R. & Mehlitz D. (1990). The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasitol.*, 29, 1-74.
- Goldstein D.B. & Clark A.G. (1995). Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Ac. Res.*, 23 (19) 3882-3886.
- Goldstein D.B., Ruiz-Linares A., Cavalli-Sforza L.L. & Feldman M. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139, 463-471.
- Gooding R.H. & Hollebone J.E. (1976). Heritability of adult weight in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* Westwood. *Exper.*, 32, 1507.
- Gooding R.H. (1981). Genetic polymorphism in three species of tsetse flies in Upper Volta. *Act. Trop.*, 38, 149-161.
- Gooding R.H. (1982). Classification of nine species and subspecies of tsetse flies based on molecular genetics and breeding data. *Can. J. Ent.*, 60 (11) 2737-2744.
- Gooding R.H. (1990). Genetic aspects of quality control in tsetse colonies. *Insect Sci. Applic.*, 11 (3) 385-398.
- Gooding R.H., Moloo S.K. & Rolseth B.M. (1991). Genetic variation in *Glossina brevipalpis*, *G. longipennis*, and *G. pallidipes*, and the phenetic relationships of *Glossina* species. *Med. Vet. Entomol.*, 5, 165-173.

- Gooding R.H. & Rolseth B.M. (1995). Genetics of *Glossina palpalis palpalis*: designation of linkage groups and the mapping of eight biochemical and visible marker genes. *Genome*, 38, 833-837.
- Goosens B. (1998). Système de reproduction et variabilité génétique intra et inter-populationnelle chez la marmotte alpine (*Marmota marmota* L., Sciuridé). Thèse Université Grenoble 1, 134 pp.
- Goostrey A., Carss D.N., Noble L.R. & Piertney S.B. (1998). Population introgression and differentiation in the great cormorant *Phalacrocorax carbo* in Europe. *Molec. Ecol.*, 7, 329-338.
- Goudet J. (1995). FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*, 86 (6), 485-486.
- Gouteux J.P. & Gibson W.C. (1996). Detection of infections of *Trypanosoma grayi* in *Glossina fuscipes* in Central African Republic. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 90, 555-557.
- Grimaldi M.C., Crouau-Roy B. (1997). Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. *J. Mol. Evol.*, 44, 336-340.
- Groenendijk C.A. (1996). The response of tsetse flies to artificial baits in relation to age, nutritional and reproductive state. *Ent. exp. appl.*, 78, 335-340.
- Guedegbe B., Verhulst A., Van Meirvenne N., Pandey V.S. & Doko A. (1992). Indications sérologiques de l'existence d'un réservoir sauvage de *Trypanosoma brucei* gambiense dans la Réserve de la Biosphère de la Pendjari en République du Bénin. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 72, 113-120.
- Guo S.W. & Thompson E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- Harry M. (1992). Variabilité génétique des populations vénézuéliennes de *Rhodnius spp.*, vectrices de *T. cruzi*, parasite responsable de la maladie de Chagas. Thèse Université Paris VI.
- Hartl D.L. & Clark A.G. (1989). Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hauser L., Carvalho G.R., Pitcher T.J. & Oguthu-Ohwayo R. (1998). Genetic affinities of an introduced predator : Nile perch in lake Victoria, East Africa. *Molec. Ecol.*, 7, 849-857.
- Hegh E. (1929). Les tsé-tsé. Bruxelles : Imprimerie industrielle et financière, vol.1, pp. XIV+742.
- Hill S.M. & Crampton J.M. (1994). DNA-based methods for the identification of insect vectors. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88 (3) 227-250.

- Hillesheim E. & Stearns S.C. (1990). The responses of *Drosophila melanogaster* to artificial selection on body weight and its phenotypic plasticity in two larval food environments. *Evolution*, 45, 1909-1923 .
- Hoare C.B. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Oxford, U.K., Blackwell Scientific Publications.
- Hughes C.R. & Queller D.C. (1993). Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molec. Ecol.*, 2, 131-137.
- Husseneder C., Brandl R., Epplen C., Epplen J.T. & Kaib M. (1998). Variation between and within colonies in the termite : morphology, genomic DNA, and behaviour. *Molec. Ecol.*, 7, 983-990.
- Hutcheson H.J., Oliver J.H., Houck M.A. & Strauss R.E. (1995). Multivariate morphometric discrimination of nymphal and adult forms of the blacklegged tick, a principal vector of the agent of Lyme disease in eastern north America. *J. Med. Entomol.*, 32, 827-842.
- I.A.E.A. (1997a). Application of an immunoassay method to improve the diagnosis and control of African trypanosomosis. Proc. joint FAO/IAEA workshop on epidemiological tools for monitoring trypanosomosis and tsetse control programmes, Addis-Ababa, 17-28/04/95.
- I.A.E.A. (1997b). Genetic application to improve the SIT for tsetse control/eradication including genetic sexing. First research coordination meeting, Addis Ababa, Ethiopia, 10-14/02/97.
- I.C.I.P.E. (1997). The role of monitor lizard in trypanosomosis epidemiology. Proceedings of a congress on « Integrated rural development through sustainable management of tsetse and trypanosomes. » Axum, Ethiopia, 03-08/02/97.
- Itard J. (1966). Chromosomes de glossines. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 263 série D19, 1395-1397.
- Itard J. (1973). Revue des connaissances actuelles sur la cytogénétique des glossines. *Rev. Elev. Med. vét. Pays Trop.*, 26 (2), 151-167.
- Itard J. (1974). Caryotype de *Glossina palpalis gambiensis*. Comparaison avec d'autres espèces du groupe *palpalis* et du groupe *morsitans*. *Rev. Elev. Med. vét. Pays Trop.*, 27 (4), 431-436.
- Itard J. (1986). Les glossines ou mouches tsé-tsé. Etudes et synthèses de l'I.E.M.V.T., 155 pp.
- Jackson C.H.N. (1941). The economy of a tsetse population. *Bull. Ent. Res.*, 32, 53-55.
- Jaenson T. (1978). Mating behaviour of *Glossina pallidipes* Austen: genetic differences in copulation time between allopatric populations. *Ent. exp. appl.*, 24, 100-108.

- Jamonneau V. (1996). Evaluation préliminaire d'une nouvelle technique de dépistage de la trypanosomiase humaine africaine en Côte d'Ivoire : le test trypanCATT sur latex. DEA de Parasitologie, Université Montpellier II.
- Janssen J.A.H.A. & Wijers D.J.B. (1974). *Trypanosoma simiae* at the Kenya coast. A correlation between virulence and the transmitting species of *Glossina*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 68 (1), 5-19.
- Jarne P. & Lagoda P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. Tree, 11 (10), 424-429.
- Jenni L., Marti S., Schweizer J., Betschart B., Le Page R.W.F. (1986). Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. Nature, 322, 173-175.
- Jordan A.M. (1976). Tsetse flies as vectors of trypanosomes. Vet. Parasitol., 2, 143-152.
- Jordan A.M., Trewern M.A., Southern D.I., Pell P.E. & Davies E.D.G. (1977). Differences in laboratory performance between strains of *Glossina morsitans morsitans* Westwood from Rhodesia and Tanzania and associated chromosome diversity. Bull. Ent. Res., 67 (1) 35-48.
- Kaboré I., Amsler-Delafosse S., Bauer B. et al. (1994). Analyse des repas de sang de mouches tsé-tsé pour une contribution aux études épidémiologiques des trypanosomoses africaines. 4^e congrès S.O.A.P. (Société Ouest Africaine de Parasitologie), Ouagadougou, Burkina Faso.
- Kamau L., Hawley W.A., Lehmann T., Orago A.S.S., Cornel A., Ke Z.X. & Collins F.H. (1998). Use of short tandem repeats for the analysis of genetic variability in sympatric populations of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. Heredity, 80, 675-682.
- Kamau L., Lehmann T., Hawley W.A., Orago A.S. & Collins F.H. (1998). Microgeographic genetic differentiation of *Anopheles gambiae* mosquitoes from Asembo bay, western Kenya : a comparison with Kilifi in coastal Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58 (1), 64-69.
- Kassai T., Cordero del Campillo M., Euzeby J., Gaafar S., Hiepe Th., Himonas C.A. (1988). Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Disease (SNOAPAD). Vet. parasitol., 29, 299-326.
- Katakura K., Lubinga C., Chitambo H., Tada Y. (1997). Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by Polymerase Chain Reaction from blood collected on a filter paper. Parasitol. Res., 83 (3), 241-245.
- Kazadi J.M., Kageruka P., Martin O., Losson B. & Van Hees J. (1996). Infection expérimentale de *G.m. morsitans* par *Trypanosoma congolense*. Cycle du parasite et compétence vectorielle de la glossine. Vet. Res., 27, 579-587.

- Kijas J.M.H., Fowler J.C.S. & Thomas M.R. (1994). Enrichment of microsatellites from the *Citrus* genome using biotinylated oligonucleotides sequences bound to streptavidin - coated magnetic particles. *Biotechniques*, 16 (4), 657-662.
- Kitthawee S., Edman J.D. & Upatham E.S. (1992). Relationship between female *Anopheles dirus* body size and parity in a biting population. *J. Med. Entomol.*, 29, 921-926.
- Koorey D.J., Bishop G.A. & McCaughan G.W. (1993). Allele non-amplification: a source of confusion in linkage studies employing microsatellite polymorphisms. *Hum. Molec. Genet.*, 2 (3), 289-291.
- Krafsur E.S., Griffiths N., Brockhouse C.L. & Brady J. (1997). Breeding structure of *Glossina pallidipes* populations in East and southern Africa. *Bull. Ent. Res.*, 87, 67-73.
- Kukla B.A., Majiwa P.A.O., Young J.R., Moloo S.K. & Ole-Moi Yoi O. (1987). Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infections in tsetse flies. *Parasitology*, 95, 1-16.
- Kupper W., Staak C., Kröber T. & Spath J. (1990). Natural hosts of *Glossina tachinoides* in northern Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Parasitol.*, 41, 217-218.
- Kuzoé F.A.S. (1993). Current situation of African Trypanosomiasis. *Acta Trop.*, 54, 153-162.
- Langley P.A., Maudlin I. & Leedham M.P. (1984). Genetic and behavioural differences between *Glossina pallidipes* from Uganda and Zimbabwe. *Entomol. exp. appl.*, 35, 55-60.
- Lanzaro G.C. & Warburg A. (1995). Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implications for leishmaniasis epidemiology. *Parasitol. Tod.*, 11 (4), 151-154.
- Lanzaro G.C., Zheng L., Toure Y.T., Traore S.F., Kafatos F.C. & Vernick K.D. (1995). Microsatellite DNA and isozyme variability in a West-African population of *Anopheles gambiae*. *Ins. Molec. Biol.*, 4 (2), 105-112.
- Laveissière C. (1978). Ecologie de *G. tachinoides* en savane humide d'Afrique de l'Ouest. IV. Répartition des gîtes à pupes. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. parasitol.*, XV, 339-346.
- Laveissière C. (1986). Epidémiologie et contrôle de la trypanosomiase humaine en Afrique de l'Ouest. *Thèse université Paris-sud, Orsay*.
- Laveissière C., Hervouet J.P. & Couret D. (1986). Localisation et fréquence du contact homme/glossine en secteur forestier de Côte d'Ivoire. 2. Le facteur humain et la transmission de la trypanosomiase. *Cah. O.R.S.T.O.M., Sér. Ent. Méd. Parasitol.*, 24, 45-57.
- Laveissière C. & Grébaut P. (1990). Recherches sur les pièges à glossines. Mise au point d'un modèle économique : le piège « Vavoua ». *Trop. Med. Parasitol.*, 41, 185-192.

- Leak S.G.A. & Rowlands G.J. (1996). The dynamics of trypanosome infections in natural populations of tsetse flies. *Bull. Ent. Res.*, 87, 3, 273-282.
- Lefrançois T., Solano P., de La Rocque S., Bengaly Z., Reifenberg J.M., Kaboré I. & Cuisance D. (1998a). New epidemiological features on animal trypanosomosis by molecular analysis in the pastoral zone of Sidéradougou, Burkina Faso. *Molec. Ecol.*, 7, 897-904.
- Lefrançois T., Solano P., Bauer B., Kaboré I., Touré S.M., Cuny G. & Duvallet G. (1998b). PCR characterization of trypanosomes in *Glossina morsitans submorsitans* and *G. tachinoides* collected on the game ranch of Nazinga, Burkina Faso. *Acta trop.*, sous presse.
- Lehmann T., Hawley W.A., Kamau L. et al. (1996). Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* from East and West Africa : comparison of microsatellite and allozyme data. *Heredity*, 77, 192-200.
- Lehmann T., Besansky N.J., Hawley W.A., Fahey T.G., Kamau L. & Collins F.H. (1997). Microgeographic structure of *Anopheles gambiae* in western Kenya based on mtDNA and microsatellite loci. *Molec. Ecol.*, 6, 243-253.
- Levinson G. & Gutman G.A. (1987). Slipped-strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 203-221.
- Machado A. de Barros (1954). Révision systématique des glossines du groupe palpalis (Diptera). Companhia de diamantes de Angola (Diamang), publicacoes culturais n°22, 189 pp.
- Magnus E., Vervoort T. & Van Meirvenne N. (1978). A Card-Agglutination Test with stained, Trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 58, 169-176.
- Majiwa P.A.O., Masake R.A., Nantulya V.M., Hamers R. & Matthyssens G. (1985). *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: identification of two karyotypic groups. *E.M.B.O. J.*, 4, 3307-3313 .
- Majiwa, P.A.O. & Otieno, L.H. (1990) Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 40, 245-254.
- Majiwa, P.A.O., Maina, M., Waitumbi, J.N., Mihok, S. & Zweggarth, E. (1993) *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*, 106, 151-162.
- Majiwa, P.A.O., Thatthi, R., Moloo, S.K., Nyeko, J.H.P., Otieno, L.H. & Maloo, S. (1994) Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenemic but aparasitaemic cattle. *Parasitology*, 108, 313-322.
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sarnbrook J. (1982). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.

- Manly B.J.F. (1985). The statistics of natural selection. London, Chapman & Hall.
- Mao L., Lee D.J., Tockman M.S., Erozan Y.S., Askin F. & Sidranski D. (1994). Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9871-9875.
- Masake R., Majiwa P.A.O., Moloo S.K., Makau J.M., Njuguna J.T., Maina M., Kabata J., ole-MoiYoi O.K. & Nantulya V.M. (1997). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the Polymerase Chain Reaction. Exp. Parasitol., 85, 193-205.
- Masiga D.K., McNamara J.J., Laveissière C., Truc P. & Gibson W.C. (1996). A high prevalence of mixed trypanosome infections in tsetse flies in Sinfra, Côte d'Ivoire, detected by DNA amplification. Parasitol., 112, 75-80.
- Mathieu-Daudé F. *et al.*, (1994). Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 by a specific kinetoplast DNA probe. Am. J. Trop. Med. Hyg., 50, 13-19.
- Mattioli R.C., Jean O. & Belem A.M.G. (1990). Incidence de la trypanosomose sur la faune sauvage d'un ranch de gibier au Burkina Faso. Rev. ELEV. Méd. Vét. pays Trop., 43, 459-465.
- Maudet F. (1998). Caractérisation génétique des populations de cerf rusa en élevage à l'île Maurice. DEA Biologie et Productions Animales, Université de Rennes, 35p.
- Maudlin I. (1968). Chromosomes of the tsetse fly *Glossina fuscipes fuscipes*. E.A.T.R.O. annual report, 64-66.
- Maudlin I. (1970). Preliminary studies on the karyotypes of five species of *Glossina*. Parasitol., 61, 71-74.
- Maudlin I. (1979). Chromosome polymorphism and sex determination in a wild population of tsetse. Nature, 277, 300-1.
- Maudlin I. & Ellis D.S. (1985). Association between intracellular rickettsia-like infections of midgut cells and susceptibility to trypanosome infection in *Glossina spp.* Z. Parasitenkd, 71, 683-687.
- Maudlin I. & Welburn S.C. (1987). Lectin mediated establishment of midgut infections of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* in *Glossina morsitans*. Trop. Med. Parasitol., 38, 167-170.
- Maudlin I. & Welburn S.C. (1988). The role of lectins and trypanosome genotype in the maturation of midgut infections in *Glossina morsitans*. Trop. Med. Parasitol., 39 (1), 56-58.
- Maudlin I. & Welburn S.C. (1989). A single trypanosome is sufficient to infect a tsetse fly. Ann. Trop. Med. Parasitol., 83, 431-433.

- Maudlin I., Welburn S.C. & Mehlitz D. (1990). The relationship between rickettsia-like organisms and trypanosome infections in natural populations of tsetse in Liberia. *Trop. Med. Parasitol.*, 41, 265-267.
- Maudlin I., Welburn S.C. & Milligan P.J.M. (1991). Salivary gland infection: a sex-linked recessive character in tsetse? *Acta Trop.*, 48 (1), 9-15.
- Maudlin I. & Welburn S.C. (1994). Maturation of trypanosome infections in tsetse. *Exp. Parasitol.*, 79, 202-205.
- Mayr E. (1974). Populations, espèces, et évolution. Ed. Hermann, rue Lecourbe, Paris.
- McNamara J.J. & Snow W.F. (1991). Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from the Gambia. *Acta Trop.*, 48, 127-136.
- McNamara JJ, Mohammed G and Gibson WC (1994) *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: biological and biochemical characterization. *Parasitology*, 109, 497-509.
- McNamara J.J., Laveissière C. & Masiga D.K. (1995). Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Côte d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta Trop.*, 59 (2) 85-92.
- Mehlitz D. (1986). Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. Etudes et synthèses de l'IEMVT, N°18.
- Menotti-Raymond M.A. & O'Brien S.J. (1995). Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *J. Hered.*, 86 (4), 319-322.
- Mérot P., Politzar H., Tamboura I. & Cuisance D. (1984). Résultats d'une campagne de lutte contre les glossines riveraines en Haute-Volta par l'emploi d'écrans imprégnés de deltaméthrine. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 37, 175-184.
- Minter-Goedbloed E, Leake CJ, Minter DM et al (1993) *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: development in vitro and in insect hosts. *Parasitol. Res.*, 79, 329-333.
- Moazami-Goudarzi K., Laloë D., Furet J.P. & Grosclaude F. (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Gen.*, 28, 338-345.
- Moloo S.K. & Shaw M.K. (1989). Rickettsial infections of midgut cells are not associated with susceptibility of *G. morsitans centralis* to *T. congolense* infection. *Acta Trop.*, 46, 223-227.
- Moore S.S., Sargeant L.L., King T.J., Mattick J.S., Georges M. & Hetzel D.J.S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among Mammalian Genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10, 654-660.

- Morlais I. (1998). Identification des trypanosomes chez les glossines en zone endémique de trypanosomoses humaines au Cameroun. Thèse Univ. Montpellier II, 208 p.
- Morlais I., Grebaut P., Bodo J.M., Djoha S. & Cuny G. (1998). Characterization of trypanosome infections by Polymerase Chain Reaction amplification in wild tsetse flies in Cameroon. *Parasitol.*, 116, 547-554.
- Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs, D.E., Bailey, C.P., McKane, M.R. & Donelson, J.E. (1989) Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. *Parasitology*, 99, 57-66.
- Mulligan (1970). The African Trypanosomiasis. Eds Allen & Unwin Ltd., London.
- Murray M., Murray P.K. & McIntyre W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Trans. R. soc. trop. Med. Hyg.*, 71, 325-326.
- Narang S.K., Seawright J.A., Mitchell S.E., Kaiser P.E. & Carlson D.A. (1993). Multiple-technique identification of sibling species of the *Anopheles quadrimaculatus* complex. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 9, 463-464.
- Nash T.A.M. (1948). Tsetse flies of British West Africa. O.B.E., D. Sc. (London), 78pp.
- Nash T.A.M. & Page W.A (1953). The ecology of *Glossina palpalis* in Northern Nigeria. *Trans. R. Ent. Soc. London*, 104, 71-169.
- Nauta M.J. & Weissing F.J. (1996). Constraints on allele size at microsatellite loci : implications for genetic differentiation. *Genetics*, 143, 1021-1032.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distances from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Nei M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York, USA.
- Nekpeni E.B., Dagnogo M. & Eouzan J.P. (1989). Détermination de la limite géographique entre deux sous-espèces de glossines en Côte d'Ivoire : *Glossina palpalis palpalis* (Rob.-Desv., 1830) et *Glossina palpalis gambiensis* (Vanderplanck, 1949). *Trop. Med. Parasitol.*, 40, 12-15.
- Nevo E. (1990). Molecular evolutionary genetics of isozymes : pattern, theory, and application. *Isozymes : structure, fonction, and use in biology and medicine*, 701-742.
- Ogusuku E., Perez E. & Campos M. (1993). Nota científica : Variacion estacional de las dimensiones alares de *Lutzomyia verrucarum*. *Rev. Peruv. de Entomol.*, 34, 55.
- Paetkau D. & Strobeck C. (1995). The molecular basis and evolutionnary history of a microsatellite null allele in bears. *Molec. Ecol.*, 4, 519-520.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I. & Strobeck C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in canadian polar bears. *Molec. Ecol.*, 4, 347-354.

- Parker S., Angelico M.C., Laffel L. & Krolewski A.S. (1993). Application of denaturing gradient gel electrophoresis to detect DNA sequence differences encoding apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 16, 245-247.
- Pasteur G. (1985). Les paramètres statistiques communément utilisés dans l'exploitation de l'électrophorèse des protéines et leur avenir en systématique. In *Electrophorèse et taxinomie*, Soc. Zool. de France, Paris.
- Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R. & Barrett J.A. (1995). Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molec. Ecol.*, 4, 249-252.
- Penchenier L., Dumas V., Grebaut P., Reifenberg J.M. & Cuny G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite*, 4, 387-389.
- Politzar H. & Cuisance D. (1984). An integrated campaign against riverine tsetse *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* by trapping and the release of sterile males. *Insect Sci. Appl.*, 5, 439-442.
- Post R.J. (1985). DNA probes for vector identification. *Parasitol. Tod.*, 1 (3) 89-90.
- Primmer C.R., Moller A.P. & Ellegren H. (1995). Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molec. Ecol.*, 4, 493-498.
- Ray C. (1960). The application of Bergman's and Allen's rules to the poikilotherms. *J. Morphol.*, 106, 85-108.
- Raymond M. & Rousset F. (1995). GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86 (3), 248-249.
- Reifenberg J.M. (1996). Etude des relations parasite-hôtes dans l'épidémiologie moléculaire des trypanosomoses bovines au Burkina Faso. Thèse Université Montpellier II, 151pp.
- Reifenberg J.M., Cuisance D., Gidudu A., Cuny G., Duvallet G. & Frezil J.L. (1996). Evaluation de la capacité vectorielle de *Glossina tachinoides* vis-à-vis de *Trypanosoma congolense* : implications épidémiologiques. *Parasite*, 3, 267-276.
- Reifenberg J.M., Solano P., Bauer B., Kabore I., Cuny G., Duvallet G. & Cuisance D. (1997a). Apport de la technique PCR pour une meilleure compréhension de l'épizootiologie des trypanosomoses bovines : exemple de la zone d'aménagement pastoral de Yalé au Burkina Faso. *Rev. Elev. Méd. Vet. trop.*, 50 (1), 14-22.
- Reifenberg J.M., Solano P., Duvallet G., Cuisance D., Simpore J. & Cuny G. (1997b). Molecular characterization of trypanosomes isolates from naturally infected domestic animals in Burkina Faso. *Veterinary Parasitology*, 71, 251-262.

- Reifenberg J.M., Cuisance D., Frézil J.L., Cuny G. & Duvallet G. (1997c). Comparison of the susceptibility of different *Glossina* species to simple and mixed infections with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Savannah and riverine-forest types. *Med. Vet. Entomol*, 11, 246-252.
- Reisen W.K. (1988). Estimation of vectorial capacity : introduction. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, 14, 39-40.
- Reynolds J., Weir B.S. & Cockerham C.C. (1983). Estimation of the coancestry coefficients : basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105, 767-779.
- Rice W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223-225.
- Riordan K. (1968). Chromosomes of the tsetse fly *Glossina palpalis*. *Parasitology*, 58, 835-838.
- Riordan K. (1970). Polytene chromosomes of *Glossina palpalis*. II. Their improved demonstration. *Proc. R. Ent. soc. London*, 45, 184-186.
- Roberts C.J. & Gray R.A. (1972). Comparison of *Glossina morsitans submorsitans* and *G. tachinoides*, collected and maintained under similar conditions, as vectors of *Trypanosoma congolense*, *T. simiae*, and *T. vivax*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 66,1.
- Rodhain F. & Perez C. (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. Ed. Maloine, Paris.
- Rousset F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145, 1219-1228.
- Roy M.S., Geffen E., Smith D., Ostrander E.A. & Wayne R.K. (1994). Patterns of differentiation and hybridization in north american wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.*, 11 (4), 553-570.
- R.T.T.C.P. (1996). Overview of the presentations to the RTTCP workshop on priorities in research and development. Harare, Zimbabwe, 12-14/03/96, 22 pp.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. USA*, 74, 5463-5467.
- Schofield C.J., Apt W., Sagua H., Panzera F. & Dujardin J.P. (1998). Alary polymorphism in *Triatoma spinolai* and its possible relationship with demographic strategy. *Med. Vet. Entomol.*, 12, 30-38.
- Schwaiger F.W., Gomolka M., Geldermann H., Zischler H., Buitkamp J., Epplen J.T. & Ammer H. (1992). Oligonucleotide fingerprinting to individualize ungulates. *Appl. Theor. Electr.*, 2, 193-200.
- Sellin E., Politzar H., Cuisance D. & Clair M. (1977). L'élevage de *Glossina palpalis gambiensis* VanderPlanck, 1949, à Bobo-Dioulasso (Haute-Volta). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 30 (1), 41-49.

- Sellin E., Bourdoiseau G., Clair M., Cuisance D., Fevrier J., Taze Y. & Politzar H. (1979). Bilan de 4 années d'élevage de *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplanck, 1949, à Bobo-Dioulasso (Haute-Volta) sur animaux nourriciers (lapins, cobayes). Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop., 32, 335-345.
- Sidibe I. (1996). Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense*, agent de la trypanosomose animale : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse Université Montpellier II, 92 pp.
- Siegel J.P., Novak R.J. & Maddox J.V. (1992). Effect of *Ascogregarina barreti* infection on *Aedes triseriatus* in Illinois. J. Med. Entomol., 29, 968-973.
- Simonsen B.T., Siegismund H.R. & Arctander P. (1998). Population structure of african buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci : high variation but low differentiation. Molec. Ecol., 7, 225-237.
- Slingh R.S. & Rhomberg L.R. (1987). A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. 2. Estimates of heterozygosity and patterns of geographic differentiation. Genetics 117, 255-271.
- Solano P. (1993). Identification des espèces vectrices de la maladie de Chagas dans le genre *Rhodnius*. DEA Parasitologie, Université Montpellier II, 35 p.
- Solano P., Argiro L., Reifenberg J.M., Yao Y. & Duvallet G. (1995). Field application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* in Côte d'Ivoire. Molec. Ecol., 4, 781-785.
- Solano P., Reifenberg J.M., Amsler-Delafosse S., Kabore I., Cuisance D. & Duvallet G. (1996). Trypanosome characterization by PCR in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso. Med. Vet. Entomol., 10, 354-358.
- Solano P., Duvallet G., Dumas V., Cuisance D. & Cuny G. (1997a). Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis*. Acta Trop., 65, 175-180.
- Solano P., Cuny G., Duvallet G., Cuisance D., Ravel S., Sidibé I. & Touré S.M. (1997b). Les techniques de génétique moléculaire au service de l'épidémiologie des trpanosomoses. Intérêt de l'étude du polymorphisme des microsatellites des glossines. Rev. Elev. Med. vét. Pays Trop., 50 (4), 297-301.
- Solano P., Desquesnes M. & Sidibe I. (1997c). Le diagnostic de *T. vivax* : un problème non-résolu dans l'épidémiologie des trypanosomoses. Rev. Elev. Méd. vét. pays Trop., 50 (3), 209-213.
- Southern D.I. (1980). Chromosome diversity in tsetse flies. In Insect cytogenetics, symposia of the Royal entomological society of London, n°10, 225-243. Eds Blackman, Hewitt & Ashburner, Blackwell scientific publications.

- Spencer P.B.S., Odorico D.M., Jones S.J., Marsh H.D. & Miller D.J. (1995). Highly variable microsatellites in isolated colonies of the rock-wallaby (*Petrogale assimilis*). *Molec. Ecol.*, 4, 523-525.
- Spielman A. (1994). Why entomological antimalaria research should not focus on transgenic mosquitoes. *Parasitol. today*, 10 (10), 374-376.
- Squire F.A. (1954). Observations on the incidence of trypanosomes in *Glossina palpalis* in Sierra Leone. *Bull. Ent. Res.*, 45, 797-801.
- Stallings R.L., Ford A.F., Nelson D., Torney D.C., Hildebrand C.E. & Moyzis R.K. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in Mammalian Genomes. *Genomics* 10, 807-815.
- Stevens J.R., Mathieu-Daudé F., McNamara J.J., Mizen V.H. & Nzila A. (1994). Mixed populations of *Trypanosoma brucei* in wild *Glossina palpalis palpalis*. *Trop. Med. Parasitol.*, 45, 313-318.
- Tabachnick W.J. & Black IV W.C. (1995). Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasitol. tod.*, 11 (1) 27-30.
- Tacher G., Jahnke H.E., Rojat D. & Keil P. (1988). Livestock development and economic productivity in tsetse infested Africa. In : Livestock Production in tsetse affected areas of Africa. Proc. meeting Nairobi, Kenya, 23-27/11/87, ILCA-ILRAD.
- Tarimo-Nesbitt S.A., Gooding R.H. & Rolseth B.M. (1990). Genetic variation in two field populations and a laboratory colony of *Glossina pallidipes*. *J. Med. Entomol.*, 27 (4) 586-591.
- Tautz D. & Renz M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Ac. Res.* 12, 4127-4137.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.*, 17, 6463-6471.
- Tautz D. & Schlötterer C. (1994). Simple sequences. *Cur. Op. Genet. Dev.*, 4, 832-837.
- Taze Y., Clair M., Politzar H., Itard J. & Cuisance D. (1978). Les élevages de glossines à Maisons-Alfort et à Bobo-Dioulasso. Joint FAO/IAEA Research Coordination meeting on the use of sterile insect technique for tsetse fly eradication or control. Anvers, Belgium, 18-22/09/78.
- Thompson J.N. (1975). Quantitative variation and gene number. *Nature*, 258, 665-668.
- Tibayrenc M., Kjellberg F. & Ayala F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa : the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2414-2418.
- Tibayrenc M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents : the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.*, 28, 85-104.

- Touré S.M. (1971). Les glossines du Sénégal : Ecologie, répartition géographique et incidence sur les trypanosomoses. Rev. Elev. Méd. vét. Trop., 24 (4) : 551-563.
- Touré S.M. & Mortelmans J. (1996). Stratégie et planification de la lutte contre la trypanosomose animale africaine, avec implication des communautés rurales et du secteur privé. Bull. Séanc. Acad. R. Outre-mer 42, 485-512.
- Truc P. & Tibayrenc M. (1993). Population genetics of *Trypanosoma brucei* in Central Africa : taxonomic and epidemiological significance. Parasitology, 106, 137-149.
- Truc P., Formenty P., Duvallet G., Komoin-Oka C., Diallo P.B. & Lauginie F. (1997). Identification of trypanosomes isolated by KIVI from wild mammals in Côte d'Ivoire : diagnostic, taxonomic and epidemiological considerations. Acta trop., 66, 187-196.
- Truc P., Merriweather A., Diallo P.B. & Unnasch T.R. (1997). Isoenzymes and PCR for identifying bloodmeals in tsetse flies. Proc. 24th ISCTRC meeting, Maputo, Mozambique, 22-24/09/97.
- Valdes A.M., Slatkin M. & Freimer N.B. (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. Genetics, 133, 737-749.
- Valsecchi E. & Amos W. (1996). Microsatellite markers for the study of cetacean populations. Molec. Ecol., 5, 151-156.
- Van Etten J. (1982). Enzyme polymorphism in populations of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in Kenya. Ent. exp. appl., 31, 197-201.
- Van Hoof L., Henrard C. & Peel E. (1937). Rôle du porc comme réservoir de *Trypanosoma gambiense*. C. R. Soc. Biol., 126, 72-75.
- Van der Planck F.L. (1948). Experiments in cross-breeding tsetse flies. Ann. Trop. Med. Parasitol., 42, 131-152.
- Van der Planck F.L. (1949). The classification of *Glossina palpalis*, including the description of new subspecies and hybrids. Proc. R. ent. Soc. London, 18, 69-77.
- Viard F. (1996). Autofécondation et migration en populations subdivisées : apport des marqueurs microsatellites chez le gastéropode *Bulinus truncatus*. Thèse Université Montpellier II, 87 pp.
- Wall W.J., Williamson R., Petrou M., Papaionnou D. & Parkin B.H. (1993). Variation of short tandem repeats within and between populations. Hum. Molec. Genet., 2 (7) 1023-1029.
- Walsh P.S., Metzger D.A. & Higuchi R. (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10 (4), 506-513.
- Weber J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n- (dG-dT)_n polymorphisms. Genomics, 7, 524-530.

- Weber J.L. & Wong C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Molec. Genet.*, 2 (8) 1123-1128.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Weissenbach J. & De Chesnay A. (1992). Le génome humain balisé par des microsatellites. *La Recherche*, 261 (25) 84-85.
- Weitz B. (1963). Feeding habits of tsetse flies. *Bull. Hlth. Org.*, 28 (5), 711-729.
- Welburn S.C. & Gibson W.C. (1989). Cloning a repetitive DNA from the Rickettsia-like organisms of tsetse flies (*Glossina spp.*). *Parasitology*, 98, 81-84.
- Welburn S.C. & Maudlin I. (1989). Lectin signalling of maturation of *T. congolense* infections in tsetse. *Med. Vet. Entomol.*, 3, 141-145.
- Wijers D.J.B. (1958). Factors that may influence the infection rate of *Glossina palpalis* with *Trypanosoma gambiense*. I. The age of the fly at the time of the infective feed. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 52, 385-390.
- Williams B., Dransfield B. & Brightwell R. (1990). Monitoring tsetse fly populations. I. The intrinsic variability of trap catches of *Glossina pallidipes* at Nguruman, Kenya. *Med. Vet. Entomol.*, 4, 167-179.
- Winrock (1992). Assessment of animal agriculture in Sub-Saharan Africa. Winrock Int. Inst. for Agric., Develt, Morrilton, USA, 125 pp.
- Woolhouse M.E.J., Hargrove J.W. & McNamara J.J. (1993). Epidemiology of trypanosome infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in the Zambezi valley. *Parasitol.*, 106, 479-485.
- Woolhouse M.E.J., McNamara J.J., Hargrove J.W. & Bealby K.A. (1996). Distribution and abundance of trypanosome (subgenus *Nannomonas*) infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in Southern Africa. *Molec. Ecol.*, 5, 11-18.
- Wright S., 1951. The general structure of populations. *Ann. Eugenics*, 15, 323-354.
- Zheng L., Collins F.H., Kumar V. & Kafatos F.C. (1993). A detailed genetic map for the X chromosome of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Science*, 261, 605-608.

Annexes

ANNEXE 1

Couples d'amorces PCR disponibles au CIRDES pour la caractérisation des trypanosomes

couples d'amorces	référence	groupe taxonomique	taille du produit amplifié
VOL 1,2	Dickin & Gibson, 1989	<i>T. vivax</i>	180 pb
TBR 1,2	Moser et al, 1989	<i>T. brucei s.l.</i>	177 pb
IL 0344-0345	Majiwa et al, 1993	<i>T. congolense</i> type savane	320 pb
TCF 1,2	Masiga et al, 1992	<i>T. congolense</i> type forêt	350 pb
TCK 1, 2	Majiwa et al., 1985	<i>T. congolense</i> type Kilifi	520 pb
TCT	Majiwa et al., 1993	<i>T. congolense</i> type Tsavo	400 pb
TSM 1,2	Masiga et al, 1992	<i>T. simiae</i>	437 pb
DGG	McNamara et al., 1994	<i>T. godfreyi</i>	380 pb

Note : Des amorces amplifiant l'ADN des minicercles de *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* ont été récemment testées et adaptées (Solano & Kasbari) au CIRDES (taille attendue ~~372~~ 372 pb, Artama et al., 1992).

ANNEXE 2

Protocole PCR pour la caractérisation des trypanosomes

Conditions standard pour tous les couples d'amorces présentés en annexe 1 :

Préparation d'une solution de volume final 25µl contenant 2µl d'échantillon à tester (ADN cible) et 23 µl de mix.

Le mix est composé de : 10mM Tris-Hcl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (Promega), amorces à 100ng/µl, 0.5 U Taq Polymérase (Appligene)

Réaction PCR

Dénaturation initiale : 1 minute à 94°C

Puis 35 cycles comprenant : 1 minute à 94°C, 1 minute à 56°C, 1 minute à 72°C

Elongation finale : 10 minutes à 72°C

Refroidissement à 4°C

Révélation

Gel d'agarose 2% coloré au Bromure d'Ethidium, migration 110 volts 40 minutes (Apelex), visualisation sous lumière ultra-violet (transilluminator, Kodak), et photographie (film Polaroid 667).

ANNEXE 3

Protocole PCR pour les analyses génétiques :

volume réactionnel de 50 µl avec 40 µl de mix + 10 µl d'échantillon.

Taq Appligene, dNTP Promega.

Composition pour un mix de 8 tubes :	Tp 10X	40 µl	1X
	dNTP	8 µl	200 µM
	eau	251 µl ou 261 µl	
	Amorces	10 pmol ou 20 pmol	
	Taq Pol	0,8 µl	0,5 U/éch

Cycles PCR (PTC 100, MJ Research) : 1 mn à 94°C, puis 35 à 45 cycles comprenant :
30s 94°C, 30 s 48°C ou 50°C, 1 mn 72°C; 10 mn 72°C; fin à 4°C.

Temps de préparation : 35 mn pour 30 échantillons

Temps de PCR : 2h45mn pour 35 cycles, 3h30mn pour 45 cycles.

ANNEXE 4

Protocole de révélation du polymorphisme de l'ADN microsatellite :

- **Gel d'agarose à 4%** : 5 g pour 125 ml de TBE 1X (SIGMA). Faire chauffer doucement avec un agitateur magnétique. Ajouter 7,5 µl de BET. Couler dans une cuve 14x14 cm (CBS Scientific).
- Tampon de migration : 1 litre TBE 1X avec 25 µl de BET.
- Charger 4 µl de gel loading solution et 12 µl d'échantillon amplifié (permet de faire éventuellement 4 dépôts du même échantillon puisqu'on en a 50 µl).
- Faire migrer de 8 à 10 h à 110-120 volts (Apelex).
- Après 2h de migration, charger une autre série d'échantillons.
- Visualiser sous UV à 4h, 7h et à la fin. Prendre des photos (Polaroid 667, POLYLABO).

- Gel de Polyacrylamide 10% non-dénaturant

- Mélange des solutions suivantes : 15 ml acrylamide/bisacrylamide 40% 19/1 (APPLIGENE)
 - 39 ml d'eau distillée
 - 6 ml de TBE 10X (Tris Borate EDTA)
 - 300 µl d'APS 10% (Ammonium persulfate)
 - 40 µl de TEMED

Volume final = 60 ml.

- Tampon de migration :TBE 1X
- 330 volts, 12 heures ; ou 230 volts, 18 heures
- Révéler dans 1 litre de TBE comprenant 1 mg/ml de BET ; décolorer dans l'eau ; photo.

ANNEXE 5

Génotypes des individus de l'insectarium aux deux loci microsatellites 55,3 et 19,62 en agarose 4%

N°	Génotype 55,3	Génotype 19,62
FI2	1212	0909
MI2	1500	1700
MI4	1300	0900
IM	1215	0917
FI4	1314	1718
MI5	1300	1700
IA	1400	1700
IB	1400	1700
IN	1400	1700
IO	1400	1700
IP	1314	1718
IQ	ND	1800
FI6	1313	0919
MI3	1300	1700
IH	1300	0900
II	1313	0917
IW	1313	1719
IX	1300	0900
IY	1300	1900
FI7	1313	0709
MI7	1300	1700
IZ	1300	0700
IJ	1313	0917
FI10	1314	0910
MI8	1200	1000
IF	1400	0900
IG	1214	0910
IT	1400	0900
IU	1213	1010
IV	1300	0900
FI12	1313	0909
MI11	1300	0900
IK	1300	0900
IL	1300	0900
FI13	1313	0909
MI13	1300	0900
IC	1313	0909
ID	1313	0909
IR	1313	0909
FI14	1313	0909
MI14	1300	0900
IE	1313	0909
IS	ND	ND

Note : les chiffres représentent les codes des allèles sur l'ensemble des individus échantillonnés
 I= Insectarium, Dans la génération parentale, mâles sont représentés par un M et les femelles par un F ; une ligne sépare chaque « famille », dans laquelle les parents ont un numéro, et la F1 une lettre.
 Seuls sont représentés les individus ayant donné naissance à une F1.

ANNEXE 6

Tableau des résultats de l'analyse morphométrique obtenus sur les ailes des glossines (logiciel « Fly Picture Measurements »)

N°	LIEU	HACHE	RAP 1-2	RAP 1-3	SEG1	SEG2	SEG3
301	1	1,3835	2,6376	2,8093	6,2268	2,3608	2,2165
302	1	1,4029	2,6624	2,7087	6,4227	2,4124	2,3711
304	1	1,3856	2,6395	2,8341	6,3402	2,4021	2,2371
305	1	1,3753	2,6957	2,8054	6,3918	2,3711	2,2784
306	1	1,3221	2,6043	2,8255	6,1753	2,3711	2,1856
307	1	1,3179	2,6228	2,7814	6,1649	2,3505	2,2165
308	1	1,4466	2,5926	2,8251	6,4948	2,5052	2,2990
309	1	1,4452	2,6709	2,8670	6,4433	2,4124	2,2474
311	1	1,4856	2,6525	2,8198	6,4536	2,4330	2,2887
312	1	1,4615	2,5496	2,7545	6,3608	2,4948	2,3093
314	1	1,5309	2,5761	2,7946	6,4536	2,5052	2,3093
317	1	1,5128	2,5861	2,8296	6,5052	2,5155	2,2990
320	1	1,3533	2,6266	2,8203	6,3093	2,4021	2,2371
322	1	1,2937	2,6332	2,7534	6,2165	2,3608	2,2577
323	1	1,2963	2,7130	2,7626	6,2371	2,2990	2,2577
324	1	1,3417	2,6507	2,7972	6,2577	2,3608	2,2371
325	1	1,4338	2,5768	2,7600	6,4021	2,4845	2,3196
326	1	1,2089	2,6455	2,6820	6,0000	2,2680	2,2371
329	2	1,3626	2,6245	2,7953	6,1959	2,3608	2,2165
330	2	1,4286	2,6483	2,7778	6,4433	2,4330	2,3196
331	2	1,4206	2,6429	2,8462	6,4845	2,4536	2,2784
332	2	1,3855	2,6059	2,9426	6,3402	2,4330	2,1546
333	2	1,4845	2,6583	2,8106	6,5773	2,4742	2,3402
334	2	1,3546	2,6667	2,7890	6,2680	2,3505	2,2474
335	2	1,3620	2,6320	2,7511	6,2680	2,3814	2,2784
336	2	1,3313	2,6667	2,8037	6,1856	2,3196	2,2062
385	2	1,3699	2,6957	2,8182	6,3918	2,3711	2,2680
386	2	1,3319	2,6207	2,7511	6,2680	2,3918	2,2784
387	2	1,4884	2,6542	2,8311	6,5670	2,4742	2,3196
388	2	1,4483	2,6068	2,8111	6,2887	2,4124	2,2371
389	2	1,0574	2,6976	2,7241	5,7010	2,1134	2,0928
340	2	1,4085	2,6426	2,8618	6,4021	2,4227	2,2371
341	2	1,3754	2,5690	2,7909	6,3299	2,4639	2,2680
342	2	1,3897	2,6723	2,7424	6,4742	2,4227	2,3608
346	2	1,3267	2,6608	2,8224	6,2268	2,3402	2,2062
347	2	1,5009	2,6653	2,7817	6,5670	2,4639	2,3608
348	2	1,4925				2,4433	
349	2	1,4311	2,6379	2,8868	6,3093	2,3918	2,1856
354	2	1,4396	2,5900	2,8009	6,3814	2,4639	2,2784
355	2	1,5552	2,5328	2,8479	6,3711	2,5155	2,2371
356	2	1,3226	2,7188	2,7557	6,2784	2,3093	2,2784
357	2	1,4654	2,6723	2,8142	6,5567	2,4536	2,3299
393	2	1,4166	2,6695	2,7522	6,4124	2,4021	2,3299
394	2	1,3425	2,7111	2,6872	6,2887	2,3196	2,3402
395	2	1,3294	2,6352	2,8037	6,3299	2,4021	2,2577
396	2	1,2611	2,5759	2,7874	5,9485	2,3093	2,1340

N°	LIEU	HACHE	RAP 1-2	RAP 1-3	SEG1	SEG2	SEG3
Se5	3	1,3459	2,6812	2,7289	6,3299	2,3608	2,3196
Se7	3	1,2664	2,7009	2,8271	6,2371	2,3093	2,2062
Se8	3	1,3164	2,6696	2,7798	6,2474	2,3402	2,2474
Se9	3	1,3255	2,6638	2,7232	6,2887	2,3608	2,3093
Se10	3	1,3147	2,6416	2,9265	6,1546	2,3299	2,1031
Se11	3	1,3530	2,6784	2,8148	6,2680	2,3402	2,2268
Se12	3	1,2875	2,7182	2,7814	6,1649	2,2680	2,2165
Se13	3	1,3571	2,7225	2,7838	6,3711	2,3402	2,2887
Se15	3	1,3638	2,5794	2,7696	6,1959	2,4021	2,2371
Se16	3	1,3500	2,6463	2,8186	6,2474	2,3608	2,2165
Se17	3	1,3544	2,7013	2,7857	6,4330	2,3814	2,3093
Se18	3	1,3959	2,6930	2,8962	6,3299	2,3505	2,1856
Se19	3	1,4316	2,6537	2,7991	6,3196	2,3814	2,2577
Se20	3	1,4379	2,6798	2,8957	6,2990	2,3505	2,1753
Se21	3	1,4610	2,6111	2,8419	6,2990	2,4124	2,2165
Se22	3	1,3259	2,7207	2,7706	6,2268	2,2887	2,2474
Se23	3	1,3204	2,5551	2,8571	5,9794	2,3402	2,0928
Se24	3	1,4164	2,6783	2,8257	6,3505	2,3711	2,2474
Se25	3	1,3396	2,7168	2,7909	6,3299	2,3299	2,2680
Se26	3	1,3288	2,6592	2,8373	6,1134	2,2990	2,1546
Se27	3	1,2244	2,6544	2,7299	5,9381	2,2371	2,1753
Se28	3	1,3531	2,7143	2,7890	6,2680	2,3093	2,2474
Se29	3	1,3541	2,6903	2,7387	6,2680	2,3299	2,2887

Les mesures ont été faites uniquement sur l'aile gauche des femelles.

1= Sidéradougou Yéguéré (est). 2= Sidéradougou Nyarafo (ouest). 3= Sénégal.

Cellule en hache entre Sénégal et Sidéradougou (Nyarafo + Yéguéré) :

Test d'homogénéité des variances de Bartlett : $p=0.01^*$; les variances sont hétéroscédatiques.

Test H de Kruskal Wallis, $p= 0.04^*$.

Il y a une différence significative entre les glossines du Sénégal et celles de Sidéradougou sur la taille de la cellule en hache.

Segment 2 entre Sénégal et Sidéradougou (Nyarafo + Yéguéré) :

Test d'homogénéité des variances de Bartlett : $p=0.0069^{**}$; les variances sont hétéroscédatiques.

Test H de Kruskal Wallis, $p= 0.00045^{***}$.

Il y a une différence significative entre les glossines du Sénégal et celles de Sidéradougou sur la longueur du segment 2.

Rapport seg1/seg2 :

Test d'homogénéité des variances de Bartlett, $p=0.99$; les variances sont homoscdatiques. test F de Snedecor, $p= 0.01^*$.

Il y a une différence significative entre les glossines du Sénégal et celles de Sidéradougou sur le rapport entre les segments 1 et 2.

Les autres mesures ne donnent pas de différence significative.

Aucune différence significative n'est trouvée entre les mouches de Nyarafo et celles de Yéguéré.

ANNEXE 7

Matrice des Fst

	Sidéradougou							Sénégal	Mali	Samorogouan				
Theta	NKO97	KOB97	NKO98	NBO98	YEN97	YES97	YEN98	SENE	MALI	KOL96	PC96	PR96	PC97	KOL97
NBO97	0.02111	0.00431	-0.00865	-0.00851	0.05898	0.05970	0.08311	0.14849	0.00918	0.03773	0.00940	0.01927	0.06299	0.02094
NKO97		0.06866	0.01578	0.06098	0.08102	0.07128	0.13990	0.11611	0.01324	0.05983	0.05949	0.11436	0.13950	0.03459
KOB97			-0.00342	0.02677	0.01454	0.02006	0.01708	0.18898	0.02096	0.00780	-0.00444	-0.01529	0.00267	0.00415
NKO98				0.01191	0.02126	0.02358	0.06270	0.10700	-0.01144	0.00383	-0.00466	0.02516	0.05788	-0.00353
NBO98					0.09955	0.10766	0.11635	0.18484	0.04429	0.07437	0.03899	0.05842	0.08509	0.05567
YEN97						-0.00934	0.03543	0.15410	0.03053	-0.00488	0.01463	0.02891	0.03872	0.02056
YES97							0.03555	0.15037	0.02348	-0.00578	0.01997	0.03123	0.04543	0.01538
YEN98								0.27906	0.09109	0.02903	0.05124	0.01848	-0.01302	0.03053
SENE									0.07775	0.14557	0.12551	0.20043	0.28783	0.15044
MALI										0.01137	0.00242	0.03574	0.08496	0.00418
KOL96											0.00416	0.01592	0.02984	-0.00174
PC96												-0.01185	0.04476	0.00830
PR96													0.00330	0.02197
PC97														0.02977

ANNEXE 8

Liste des Publications dans des revues à comité de lecture

- * Lefrançois T., Solano P., Bauer B., Kabore I., Touré SM, Cuny G., Duvallet G. (1998a). Polymerase Chain Reaction characterization of trypanosomes in *Glossina morsitans submorsitans* and *G. tachinoides* collected on the game ranch of Nazinga, Burkina Faso. *Acta tropica*, in press.
- * Lefrançois T., Solano P., De la Rocque S., Bengaly Z., Reifenberg J.M., Kabore I. & Cuisance D. (1998b). New epidemiological features on animal trypanosomosis by molecular analysis in the pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. *Molecular Ecology*, 7, 897-904. **(Voir en Annexe 11).**
- * Solano P., Duvallet G., Dumas V., Cuisance D. & Cuny G. (1997a). Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, 65, 175-180. **(Voir en Annexe 9).**
- * Solano P., Cuny G., Duvallet G., Cuisance D., Ravel S., Sidibé I. & Touré S.M. (1997b). Les techniques de génétique moléculaire au service de l'épidémiologie des trypanosomoses - Intérêt de l'étude du polymorphisme des microsatellites des glossines. *Rev. Elev. Méd. Vet. trop.*, 50 (4), 297-301. **(Voir en Annexe 10).**
- * Solano P., Desquesnes M., Sidibe I. (1997c). Le diagnostic de *T. vivax* : un problème non résolu dans l'épidémiologie des trypanosomoses. *Rev. Elev. Méd. Vet. trop.*, 50 (3), 209-213. **(Voir en Annexe 12).**
- * Reifenberg J.M., Solano P., Bauer B., Kabore I., Cuny G., Duvallet G. & Cuisance D. (1997a). Apport de la technique PCR pour une meilleure compréhension de l'épizootiologie des trypanosomoses bovines : exemple de la zone d'aménagement pastoral de Yalé au Burkina Faso. *Rev. Elev. Méd. Vet. trop.*, 50 (1), 14-22.
- * Reifenberg J.M., Solano P., Duvallet G., Cuisance D., Simpore J. & Cuny G. (1997b). Molecular characterization of trypanosomes isolates from naturally infected animals in Burkina Faso. *Veterinary Parasitology*, 71, 251-262.
- * Solano P., Reifenberg J.M., Amsler-Delafosse S., Kabore I., Cuisance D. & Duvallet G. (1996). Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso. *Medical and Veterinary Entomology*, 10, 354-358. **(Voir en Annexe 13).**
- * Solano P., Dujardin J.P., Schofield C.J., Romana C. & Tibayrenc M. (1996). Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius* species. *Research & Reviews in Parasitology*, 56 (1), 41-47.
- * Solano P., Argiro L., Yao Y., Reifenberg J. M. & Duvallet G. (1995). Field application of the Polymerase Chain Reaction to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* (Diptera: Glossinidae) in Côte d'Ivoire. *Molecular Ecology*, 4, 781-785.
- * Solano P. & Amsler-Delafosse S. (1995) *Trypanosoma congolense* chez différentes espèces de taons (Diptera : Tabanidae) au Burkina Faso. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux*, 48 (2) 135-136.

ANNEXE 9

Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae)

P. Solano ^a, G. Duvallet ^b, V. Dumas ^c, D. Cuisance ^b, G. Cuny ^{c,*}

^a *Cirdes Bobo Dioulasso, Burkina Faso*

^b *CIRAD-EMVT campus de Baillarguet, Montpellier, France*

^c *Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteurs, Orstom, Département Santé 911 avenue Agropolis, Montpellier, France*

Received 5 November 1996; received in revised form 30 December 1996; accepted 10 February 1997

Abstract

Little is known about tsetse intraspecific variability and its consequences on vectorial capacity. Since isoenzyme analyses revealed little polymorphism, microsatellite markers have been developed for *Glossina palpalis gambiensis* species. Three loci have been identified and showed size polymorphisms for insectarium samples. Moreover, amplifications were observed in different species belonging to *palpalis* group. These molecular markers will be useful to estimate gene flow within *G. p. gambiensis* populations and analyses could be extended to related species. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Microsatellite; *Glossina palpalis*; Population genetics; Trypanosomosis; *G. fuscipes*; *G. morsitans*

1. Introduction

Most species of the genus *Glossina* play a potential vector role in the transmission of African *Trypanosomosis*, which has considerable economic impact in subsaharan

* Corresponding author. Present address: Centre Orstom, Département Santé, LEMV, BP 5045, 34 032 Montpellier Cedex. Tel.: + 33 67416298; fax: + 33 67547800; e-mail: cuny@orstom.rio.net

Africa (Janhke et al., 1988). In West Africa, species of the *palpalis* group (subgenus *Nemorhina*) are involved in transmission of Animal trypanosomosis (nagana) and Human trypanosomosis (sleeping sickness). Despite their importance little is known about tsetse population genetics and their implications for the transmission of trypanosomes: very little information is available on the possible structuration of tsetse populations which could lead them to express resistance to control measures, by avoiding traps or treated animals for example. Intraspecific variation and related differential vectorial capacity is suspected to occur in natural *G. palpalis gambiensis* populations (Bauer et al., 1995; Solano et al., 1996). However, previous studies using isozyme analyses were undertaken only for interspecies comparisons (Gooding et al., 1991) or for purpose of genetic assignment of loci (Gooding and Rolseth, 1995). Natural populations of tsetse flies of Burkina Faso showed little polymorphism using isozyme data on five loci (Gooding, 1981). Genetic studies were hence of limited value because of the lack of accurate technologies.

Among insects, microsatellite loci have mostly been developed for social species like ants (Gertsch et al., 1995), bees (Estoup et al., 1993, 1995), or wasps (Hughes and Queller, 1993). In the field of medical or veterinary entomology, studies are still rare, and microsatellites have only been developed in *Anopheles gambiae* (Zheng et al., 1993, 1996; Lanzaro et al., 1995) and *Simulium damnosum* (Dumas, unpublished results).

This paper reports on the isolation of microsatellite sequences in *G. p. gambiensis*, a riverine species widespread in West Africa and their potential use for population genetics in this taxa and in related species.

2. Material and methods

DNA (20 µg) from 50 individual *G. p. gambiensis*, originating from the CIRAD/ORSTOM insectarium (Montpellier, France), was digested to completion overnight with *Hae*III. The 400–800 bp fraction was recovered and ligated into the dephosphorylated *Eco*RV site of M13 BM 20 (Boehringer–Mannheim). Ligation products were used to transform *E. coli* XL1 Blue cells and 4500 recombinants clones were lifted on Hybond-N⁺ membranes. Hybridizations were carried out with (CA)_n and (GA)_n probes, labelled with dCTP-α[³²P], using rapid hybridization buffer (Amersham) according to manufacturer instructions. Positive clones were dot-blotted and re-screened to ensure specificity. Eleven clones were kept after this secondary screening. Eight of them were sequenced by the dideoxy-chain termination method, using the Taq dye primer kit and an automatic sequencer (Applied Biosystems).

Template DNA for PCR was prepared by incubating two legs of a fly in 5% chelex for 1 h at 56°C, then 30 min at 95°C. Amplification reactions were performed in a Perkin Elmer thermal cycler, in a final volume of 50 µl containing as final concentrations 1 × Appligene incubation buffer with 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 15 pmol of each primer and 0.5 U Appligene Taq Polymerase. Samples were first denatured during 90 s at 92°C and then processed through 35 cycles consisting of 30 s at 92°C, 30 s at 50°C for loci 55.3 and 19.62 and 48°C for

locus 69.22 and 1 min at 72°C. The last elongation step was lengthened to 10 min. An amount of 15 µl of each amplified sample was resolved on 12% non-denaturing polyacrylamide gel.

3. Results

Of these eight clones sequenced, four were false positives and microsatellite sequences were successfully obtained for four clones. The presence of false positives can be explained by an imperfect homology of sequences between the clones and the microsatellite probes due to the low stringency of the hybridization washes. Two clones had microsatellite sequences located too close to the cloning site to allow primer selection; fortunately, as one of them (19.62) owned a (TA) repeat also, three pairs of primers could be designed.

A sequence was considered as a microsatellite if the number of repetitions of the dinucleotide motif was six at a minimum (Stallings et al., 1991). According to Weber (1990), the three microsatellite loci were classified as 'perfect' for 69.22 and 19.62 ((TA)₁₀ and (GT)₁₂, respectively) and 'imperfect' for 55.3 (GT)₁₄ GC(GT)₄.

Eight individual *G. p. gambiensis* from the insectarium were individually tested by PCR with the three primer pairs and PCR products were size-fractionated on 12% acrylamide gels with appropriate markers. Results were as follows: locus 55.3 showed four alleles, locus 19.62 showed three and locus 69.22 showed two alleles (Table 1). Allele size was highly variable; for example, 20 bp separated the largest and smallest alleles at locus 19.62 (Table 1).

The three primer pairs gave also a strong signal with wild *G. p. gambiensis* from Mali; the three individuals tested had some alleles in common with some of the insectarium tsetse, for example allele 176 bp at locus 19.62, which appears as the most common. Wild *G. palpalis palpalis* from Cameroun and a laboratory colony of *G. fuscipes fuscipes* gave also scorable signals for the three primer pairs with intra-colony variability at the three loci for *G. p. palpalis*, and at loci 55.3 and 19.62 for *G. f. fuscipes* (Table 2). Only primer pairs 19.62 amplified an appropriate sized product from DNA of *G. tachinoides*. No amplification signal could be obtained at

Table 1
Characteristics of the three microsatellite loci among a laboratory sample of eight *G. p. gambiensis*

Locus	Repeat sequence	Allele sizes (bp)	Primer sequence
55.3	(GT) ₁₄ (GC) (GT) ₄	181, 183, 187, 197	5'GTA CTCAACGTGGTGCTTAAAGTTG3' 5'GTCTGAGATAGGACCATTTATCG3'
19.62	(GT) ₁₂	176, 178, 196	5'CAGATATGCTACACTTGGTCAGC3' 5'GCATTTAATGTTATACACTGAAGG3'
69.22	(TA) ₁₀	198, 200	5'CAAAACTCGACCAAATTGACCG3' 5'CGATAATGATACGATTAAATCAAACC3'

Table 2
Size of the bands (when observed) in other tsetse taxa

Locus	Bands observed (bp)				
	<i>G. p. palpalis</i>	<i>G. f. fuscipes</i>	<i>G. tachinoides</i>	<i>G. m. submorsitans</i>	<i>G. m. morsitans</i>
55.3	175, 171	181, 185	None	None	None
19.62	170, 174	174, 182	None	None	None
69.22	194, 200	192	None	None	None

any locus with either *G. morsitans morsitans* nor than with *G. morsitans submorsitans*.

4. Discussion

The (CA)_n and (GA)_n probes used in this work allowed three primer pairs which showed size polymorphisms in a laboratory sample of *G. p. gambiensis*, to be designed. The fact that one locus (69.22) consisted of a (TA)_n repeat whereas the probes used (CA)_n and (GA)_n could be explained by the presence of a second GT repeat too close to the cloning site to allow primer selection.

The tsetse individuals from different origins used in this study were just tested for scorable amplifications. After this first step, heritability of the presumed alleles should be demonstrated, then the microsatellite markers will be used to estimate gene flows within species. *G. p. gambiensis* is of particular interest since previous work has shown great plasticity of behaviour in Burkina Faso (Challier, 1973; Bauer et al., 1995; Solano et al., 1996) and great variability in transmitting *Trypanosoma brucei gambiense* (Elsen et al., 1994). At the moment, there is no strong evidence that tsetse populations are structured, as is the case in *Anopheles gambiae*, for example (Lanzaro et al., 1995), but this could be due to the lack of studies of this type of tsetse.

All tsetse belong to one genus *Glossina*, that is divided into three subgenera, *Austenina* (*fusca* group), *Nemorhina* (*palpalis* group) and *Glossina* (*morsitans* group). *G. m. submorsitans* and *G. m. morsitans* are in the *morsitans* group and could not be amplified with any primer sets used in this study. In contrast, all three loci were correctly amplified in both *G. p. palpalis* and *G. f. fuscipes* from the *palpalis* group. Indeed these species were first classified as a single one, *G. palpalis* (Van der Planck, 1949), and they showed great similarity at isoenzyme loci (Fig. 1). Finally, *G. tachinoides* belongs also to the *palpalis* group, but is known to be quite different from *G. palpalis*, regarding ecological behaviour as well as genetic data (Gooding et al., 1991). In this work, the primer specificity reflected well the generally accepted phylogenetic relationships between the tsetse taxa (Fig. 1). In the future, these genetic studies could be extended to related species because interspecific conservation of flanking sequences will support use of these loci.

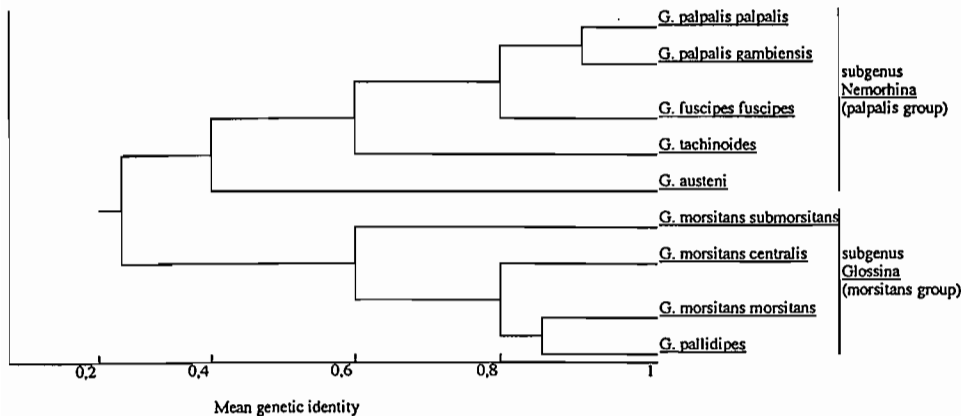


Fig. 1. Phenogram for nine taxa of tsetse flies, based upon loci for 12 enzymes (Gooding, 1981, modified).

Acknowledgements

This work was supported by the CIRAD-EMVT and the centre ORSTOM Montpellier, France, and will continue at the CrRDES Bobo Dioulasso, Burkina Faso. The authors acknowledge Dr O. Diall (Laboratoire Central Vétérinaire, Bamako, Mali) for the gift of the specimens from Mali.

References

- Bauer, B., Amsler-Delafosse, S., Clausen, P. et al. (1995) Successful application of deltamethrin pour on to cattle in a campaign against tsetse flies (*Glossina spp*) in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina-Faso. *Trop. Med. Parasitol.* 46, 183–189.
- Challier, A. (1973) Ecologie de *Glossina palpalis gambiensis* en savane d'Afrique Occidentale. Mem. ORSTOM, Paris, 64, 274 pp.
- Elsen, P., Roelants, P. and De Lile (1994) Cytogenetic and isozymic comparisons of two laboratory lines of *Glossina palpalis gambiensis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88(5), 511–522.
- Estoup, A., Solignac, M., Harry, M. and Cornuet, J.M. (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res.* 21(6), 1427–1431.
- Estoup, A., Scholl, A., Pouvreau, A. and Solignac, M. (1995) Monoandry and polyandry in bumble bees as evidenced by highly variable microsatellites. *Mol. Ecol.* 4, 89–93.
- Gertsch, P., Pamilo, P. and Varvio, S.L. (1995) Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants. *Mol. Ecol.* 4, 257–260.
- Gooding, R.H. (1981) Genetic polymorphism in three species of tsetse flies in Upper Volta. *Acta Trop.* 38, 149–161.
- Gooding, R.H., Moloo, S.K. and Rolseth, B.M. (1991) Genetic variation in *Glossina brevipalpis*, *G. Longipennis* and *G. pallidipes* and the phenetic relationships of *Glossina* species. *Med. Vet. Entomol.* 5, 165–173.
- Gooding, R.H. and Rolseth, B.M. (1995) Genetics of *Glossina palpalis palpalis*: designation of linkage groups and the mapping of eight biochemical and visible marker genes. *Genome* 38, 833–837.

- Hughes, C.R. and Queller, D.C. (1993) Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.* 2, 131–137.
- Janhke, H.E., Tacher, G., Keil P et al. (1988) Livestock production in tropical Africa, with special reference to the tsetse-affected zone. In: *Livestock Production in Tsetse Affected Areas of Africa*. Proc. Meeting 23-27/1 1/88, Nairobi, Kenya, ILCA-ILRAD.
- Lanzaro, G.C., Zheng, L. and Toure, Y.T. (1995) Microsatellite DNA and isozyme variability in a West African population of *Anopheles Gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 4(2), 105–112.
- Solano, P., Reifenberg, J.M. and Amsler-Delafosse, S. (1996) Trypanosome characterization by PCR in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso. *Med. Vet. Entomol.* 10, 354–358.
- Stallings, R.L., Ford, A.F. and Nelson, D. (1991) Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10, 807–815.
- Van der Planck, F.L. (1949) The classification of *Glossina palpalis*, including the descriptions of new subspecies and hybrids. *Proc. R. Entomol. Soc. London (B)*18, 69–77.
- Weber, J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n- (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7, 524–530.
- Zheng, L., Collins, F.H., Kumar, V. and Kafatos, F.C. (1993) A detailed genetic map for the X chromosome of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Science* 26(1), 605–608.
- Zheng, L., Benedict, M.Q., Cornell, A.J., Collins, F.H. and Kafatos, F.C. (1996) An integrated genetic map the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics* 143(2), 941–952.

ANNEXE 10

Les techniques de génétique moléculaire au service de l'épidémiologie des trypanosomoses. Intérêt de l'étude du polymorphisme des microsatellites des glossines

P. Solano ^{1,2*} G. Cuny ³ G. Duvallet ²
D. Cuisance ² S. Ravel ³ I. Sidibé ¹ S.M. Touré ¹

Mots-clés

Trypanosomose - *Glossina palpalis gambiensis* - PCR - Microsatellite - Variation génétique - Epidémiologie.

Résumé

L'introduction des techniques moléculaires a apporté de nouvelles connaissances sur l'épidémiologie des trypanosomoses. Dans le domaine du diagnostic, la technique d'amplification en chaîne par polymérase (ou *polymerase chain reaction*) apporte une sensibilité supérieure à celle des techniques classiques, et permet aussi de différencier des trypanosomes morphologiquement identiques ayant des importances économiques très différentes. Chez les vecteurs cycliques, les glossines, on soupçonne l'existence de populations plus dangereuses que d'autres au sein d'une même espèce ; les auteurs décrivent et proposent d'appliquer la technique du polymorphisme des marqueurs microsatellites à l'évaluation des conséquences de la variabilité intraspécifique des mouches tsé-tsé sur l'épidémiologie de la trypanosomose.

■ INTRODUCTION

Les trypanosomoses africaines sont causées par des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma* et sont transmises principalement par des insectes diptères, les glossines. Leur importance économique en Afrique subsaharienne est considérable puisqu'elles provoquent chez l'homme la maladie du sommeil (50 millions de personnes exposées) et chez les animaux domestiques le nagana ou trypanosomose animale ; certains experts estiment les pertes économiques du secteur de l'élevage dues aux trypanosomoses à 1 milliard de dollars par an à l'échelle du continent (3).

Il est donc nécessaire d'être capable de diagnostiquer la maladie lorsqu'elle existe, mais aussi et surtout de pouvoir la contrôler en abaissant son importance à un niveau n'empêchant pas la production. Un moyen pour y parvenir est de lutter contre les cibles définies que sont certaines populations de glossines propageant l'épizootie.

■ UTILISATION DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DU PARASITE

Ces dernières années, le développement des techniques d'étude moléculaire, notamment la PCR (*polymerase chain reaction*) (16, 21) ou ACP (amplification en chaîne par polymérase), a généré des connaissances nouvelles dans l'épidémiologie des trypanosomoses. Il est maintenant possible de distinguer chez les glossines des trypanosomes morphologiquement similaires mais différents par leurs caractères nosologiques et leur spectre d'hôtes : il en est ainsi, dans le sous-genre *Nannomonas*, de l'espèce *T. simiae*, pathogène pour les Suidés domestiques mais inoffensive pour les Ruminants (8), et de l'espèce *T. congolense* qui infecte également les Suidés, mais qui compte parmi les trypanosomes les plus pathogènes pour le cheptel bovin. Dans le domaine du diagnostic, la PCR permet même de détecter différents sous-groupes taxonomiques de *T. congolense* (11, 12, 13) : en Afrique de l'Ouest sont présents principalement le groupe « Savane » et le groupe « Forêt » (14, 17, 19, 22, 23) ; on les soupçonne également d'avoir des pathogénicités différentes (18) et des études sont actuellement en cours pour confirmer ces présomptions.

De nombreuses applications de la technique PCR ont été développées. Cette technique prometteuse dans le domaine du diagnostic par sa sensibilité et sa spécificité reste pour l'instant limitée dans

1. CIRDES, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

2. CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

3. ORSTOM Montpellier, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex, France

* Auteur assurant la correspondance : voir adresse 1

Tél. : 226 97 22 87 ; fax : 226 97 23 20

ses applications par son coût relativement élevé. Pour le diagnostic des trypanosomes, les séquences d'ADN satellite (courte séquence répétée en tandem un grand nombre de fois) ont été utilisées. Ces séquences sont spécifiques du groupe de trypanosomes recherchés et leur utilisation comme cible d'amplification, à l'aide d'amorces connues, permet d'augmenter la sensibilité du test. Ces informations (diagnostic fiable et rapide, identification des agents pathogènes) permettent d'apprécier rapidement la situation épidémiologique et constituent des outils stratégiques d'aide à la décision.

Les RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (31, 32) sont également dérivés de la PCR. La réaction fait intervenir une seule amorce, courte et de séquence aléatoire. Du fait de leur faible longueur, ces amorces ont une probabilité importante de trouver plusieurs séquences homologues dans le génome. On obtient ainsi des profils à bandes multiples, spécifiques de souches ou d'ensembles de souches de trypanosomes. Cette technique a notamment permis de montrer que *T. congolense* forme une espèce polyphylétique : on ne trouve pas d'ancêtre unique, commun aux lignées actuelles, mais plusieurs. Ceci a pour conséquence la très faible probabilité de trouver une séquence diagnostique de l'espèce *T. congolense* dans son ensemble (22).

■ UNE APPROCHE COMPLÉMENTAIRE : LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DES VECTEURS

Si on est capable d'identifier au niveau intraspécifique chez les trypanosomes certains taxons dont l'épidémiologie ou la pathogénie sont différentes, il n'en est pas encore de même chez les vecteurs majeurs que sont les glossines. Or pour un taxon donné d'insectes, le déterminisme génétique de la capacité à s'infecter et à transmettre les trypanosomes a déjà fait l'objet de plusieurs observations. Janssen et Wijers trouvent des différences de transmission d'un même clone de *T. simiae* entre *Glossina brevipalpis* et *G. pallidipes* et suggèrent que l'espèce de glossine peut être un facteur conditionnant la pathogénicité de la souche transmise (9). Avec le même parasite, Moloo et coll. observent une différence de susceptibilité entre deux populations allopatriques de *G. pallidipes* (15). Ces deux populations montrent aussi des différences de transmission d'un clone de *T. congolense*. Reifenberg et coll., en comparant la capacité vectorielle de plusieurs taxons de glossines vis-à-vis de *T. congolense* montrent, entre autres, que les deux sous-espèces *G. morsitans submorsitans* et *G. m. morsitans* n'ont pas la même capacité à transmettre le parasite au laboratoire (17). En allant plus loin, au niveau infra-taxon, Elsen et coll. observent des différences significatives de réceptivité du même clone de *T. brucei gambiense* chez deux populations d'insectarium de *G. palpalis gambiense* provenant du même site géographique mais ayant été maintenues séparément plusieurs années (5). Ces auteurs, en utilisant les isoenzymes et l'aspect des chromosomes, trouvent certaines différences génétiques qu'ils attribuent essentiellement à un phénomène de dérive, classique dans des populations élevées au laboratoire. Makumyaviri et coll. comparent une population sauvage de *G. m. morsitans* à un phénotype mutant *salmon* (couleur de l'œil), et observent une meilleure colonisation de l'intestin moyen par *T. brucei* chez le phénotype mutant, qui serait liée à une modification du métabolisme du tryptophane (10).

Il semble donc intéressant d'appréhender la variabilité génétique des populations de vecteurs, avec pour objectif dans un taxon donné :

1. De clarifier les relations fines parasite-vecteur (compétence vectorielle), ce qui pourrait permettre une meilleure définition des cibles des campagnes de contrôle de la trypanosomose. La compétence vectorielle est l'aptitude physiologique d'un vecteur à acquérir le pathogène et à le transmettre (20).

2. D'essayer de distinguer des populations de valeur épidémiologique différente (capacité vectorielle). La capacité vectorielle est le nombre de nouvelles infections par situation et par jour du fait d'un vecteur ; elle dépend de la compétence vectorielle et de facteurs du milieu (20). Le moyen est d'identifier au sein d'un taxon donné une structuration génétique des populations en analysant des fréquences alléliques. Le fait de trouver des fréquences alléliques significativement différentes pour un ensemble d'individus dans un espace donné peut montrer que la reproduction ne se fait pas de manière aléatoire entre ces individus ; il y a donc des sous-groupes différents au sein de la même espèce (ou sous-espèce) dans le même espace ou sur des espaces voisins qui peuvent indiquer :

- des préférences différentes d'hôte nourricier : risque épidémiologique ;
- des préférences différentes de biotopes : distribution spatiale et temporelle ;
- un comportement d'évitement de leurres artificiels (pièges, écrans, etc.), ou vivants (bétail imprégné d'insecticides) : résistance aux mesures de lutte ;
- une différence d'aptitude à la maturation des trypanosomes : compétence vectorielle.

■ LA TECHNIQUE

Une séquence microsatellite est constituée de courtes répétitions (< 6) de 2, 3, ou 4 nucléotides (28, 29). Ces motifs sont localisés à différents endroits du génome, constituant chacun un locus. Ces séquences existent chez tous les eucaryotes où on les a recherchées, et se sont révélées de très bons marqueurs polymorphes pour des études de génétique des populations. Les microsatellites présentent, pour un locus donné, un polymorphisme de longueur dû à la variation du nombre de répétitions, permettant ainsi de définir des allèles.

Exemples de séquences microsatellites :

Motif dinucléotidique
AT AT AT AT AT AT AT AT AT AT

Motif trinucléotidique
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG

Après avoir détecté, isolé et séquencé ces motifs microsatellites, des amorces (ou *primers*) sont définies de part et d'autre du motif répété (figure 1), mais pas dans son voisinage immédiat (instabilité des séquences flanquant le microsatellite). Une amplification par PCR est réalisée et on obtient sur gel une bande ou deux dont les tailles sont directement proportionnelles au nombre de répétitions du motif. Ces signaux d'amplification (ou allèles) vont donc varier entre les individus, en fonction du nombre de répétitions que ceux-ci possèdent.

Par exemple, un individu (AT)₁₀ donne une bande de 180 paires de bases : cette taille correspond à un motif microsatellite qui est ici de 20 nucléotides (2 x 10), plus les amorces et la séquence flanquante totalisant dans cet exemple 160 nucléotides (taille invariante entre les individus).

BIBLIOGRAPHIE

1. COLLINS F.H., 1994. Prospects for malaria control through the genetic manipulation of its vectors. *Parasitol. today*, 10: 370-371.
2. CURTIS C.F., 1994. The case for malaria control by genetic manipulation of its vectors. *Parasitol. today*, 10: 371-374.
3. DE HAAN C., BEKURE S., 1991. Animal health services in Sub-Saharan Africa: Initial experiences with new approaches. Washington DC, USA, World Bank.
4. DUMAS V., HERDER S., BEBBA A., CADOUX-BARNABE C., BELLEC C., CUNY G., 1997. Polymorphic microsatellites in *Simulium damnosum* s.l. and their use for differentiating two savannah populations. Implications for epidemiological studies. *Genome* (sous presse).
5. ELSÉN P., ROELANTS P., DE LIL E., DUJARDIN J.P., LE RAY D., CLAES Y., 1994. Cytogenetic and isozymic comparisons of two laboratory lines of *Glossina palpalis gambiensis*. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 88: 511-522.
6. EPPLÉN J.E., 1993. Diagnostic applications of repetitive DNA sequences. *Clin. Chem. Acta*, 209: S5-S13.
7. GOODING R.H., 1981. Genetic polymorphism in three species of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) in Upper Volta. *Acta trop.*, 38: 149-161.
8. ITARD J., 1981. Trypanosomoses animales africaines. In : Précis de parasitologie vétérinaire tropicale, tome II. Paris, France, Ministère de la coopération et du développement, p. 305-468.
9. JANSSEN J.A.H.A., WIJERS D.J.B., 1974. *Trypanosoma simiae* at the Kenya coast. A correlation between virulence and the transmitting species of *Glossina*. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 68: 5-19.
10. MAKUMYAVIRI A.M., DISTELMANS W., CLAES Y., D'HAESELEER F., LE RAY D., GOODING R.H., 1984. Capacité vectorielle du type sauvage et du mutant *salmon* de *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 dans la transmission de *Trypanosoma brucei* Plimmer et Bradford, 1899. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol.*, 22 : 283-288.
11. MAJIWA P.A.O., MAINA M., WAITUMBI J.N., MIHOK S., ZWEYGARTH E., 1993. *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*, 106: 151-162.
12. MASIGA D.K., SMYTH A.J., HAYES P., BROMIDGE T.J., GIBSON W.C., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.*, 22: 909-918.
13. MCNAMARA J.J., MOHAMMED G., GIBSON W.C., 1994. *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: biological and biochemical characterisation. *Parasitology*, 109: 497-509.
14. MCNAMARA J.J., SNOW W.F., 1991. Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from the Gambia. *Acta trop.*, 48: 127-136.
15. MOLOO S.K., ZWEYGARTH E., SABWA C.L., 1995. A comparison of susceptibility to stocks of *Trypanosoma simiae* of *Glossina pallidipes* originating from allopatric populations in Kenya. *Med. vet. Entomol.*, 9: 224-228.
16. MULLIS L.B., FALOONA F.A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
17. REIFENBERG J.M., CUISANCE D., FREZIL J.L., CUNY G., DUVALLET G., 1997. Comparison of the susceptibility of different *Glossina* species to simple and mixed infections with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Savannah and riverine-forest types. *Med. vet. Entomol.*, 11: 246-252.
18. REIFENBERG J.M., SOLANO P., BAUER B., KABORE I., CUNY G., DUVALLET G., CUISANCE D., 1997. Apport de la technique PCR pour une meilleure compréhension de l'épizootologie des trypanosomoses bovines : exemple de la zone d'aménagement pastoral de Yalé au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vet. Pays trop.*, 50 : 14-22.
19. REIFENBERG J.M., SOLANO P., DUVALLET G., CUISANCE D., SIMPSON J., CUNY G., 1997. Molecular characterization of trypanosome isolates from naturally infected domestic animals in Burkina Faso. *Vet. Parasitol.*, 71: 251-262.
20. REISEN W.K., 1989. Estimation of vectorial capacity : introduction. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, 14: 39-40.
21. SAIKI R.K., GELFLAND D.H., STOFFEL S., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
22. SIDIBE I., 1996. Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense*, agent de la trypanosomose animale : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse doct., Université de Montpellier II, France, 92 p.
23. SOLANO P., ARGIRO L., REIFENBERG J.M., YAO Y., DUVALLET G., 1995. Field application of the polymerase chain reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* in Côte d'Ivoire. *Mol. Ecol.*, 4: 781-785.
24. SOLANO P., DUVALLET G., DUMAS V., CUISANCE D., CUNY G., 1997. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta trop.*, 65: 175-180.
25. SOLANO P., REIFENBERG J.M., AMSLER-DELAFOSSÉ S., KABORE I., CUISANCE D., DUVALLET G., 1996. Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso. *Med. vet. Entomol.*, 10: 354-358.
26. SPIELMAN A., 1994. Why entomological antimalaria research should not focus on transgenic mosquitoes. *Parasitol. today*, 10: 374-376.
27. TAUTZ D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.*, 17: 6463-6471.
28. WATKINS W.S., BAMSHAD M., JORDE L.B., 1995. Population genetics of trinucleotide repeat polymorphisms. *Hum. mol. Gen.*, 4: 1485-1491.
29. WEBER J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)n-(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530.
30. WEISSENBAACH J., DE CHENAY A., 1992. Le génome humain balisé par des microsatellites. *La Recherche*, 261 : 84-85.
31. WELSH J., MCCLELLAND M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 7213-7218.
32. 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 genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531-6535.
33. ZHENG L., COLLINS F.H., KUMAR V., KAFATOS F.C., 1993. A detailed genetic map for the X chromosome of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Science*, 261: 605-608.

Reçu le 12.1.98, accepté le 24.2.98

Summary

Solano P., Cuny G., Duvallet G., Cuisance D., Ravel S., Sidibé I., Touré S.M. Molecular genetic techniques applied to the epidemiology of trypanosomoses. Advantages of the microsatellite polymorphism study in tsetse flies

A further understanding of trypanosomosis epidemiology has been brought about by the development of molecular techniques. With regard to diagnosis, the polymerase chain reaction (PCR) combines the advantages of greater sensibility than classical techniques and the possibility to differentiate trypanosomes with similar morphology but a very different economic impact. Populations of cyclic vectors (tsetse flies) have been suspected to exist with varying degrees of dangerousness within the same species. The authors describe and propose to apply the technique of microsatellite DNA polymorphism to assess the consequences of tsetse intraspecific variability on the epidemiology of trypanosomosis.

Key words: Trypanosomosis - *Glossina palpalis gambiensis* - PCR - Microsatellite - Genetic variation - Epidemiology.

Resumen

Solano P., Cuny G., Duvallet G., Cuisance D., Ravel S., Sidibé I., Touré S.M. Las técnicas de genética molecular al servicio de la epidemiología de las tripanosomosis. Importancia del polimorfismo de los microsatélites de las glosinas

Las técnicas moleculares han aportado nuevos conocimientos sobre la epidemiología de las tripanosomosis. En el campo del diagnóstico, la técnica de amplificación en cadena por polimerasas (o reacción en cadena de las polimerasas) aporta una sensibilidad superior que las técnicas clásicas, permitiendo también la diferenciación de los tripanosomas morfológicamente idénticos, con diferentes importancias económicas. En el caso de los vectores cíclicos, las glosinas, se sospecha la existencia de algunas poblaciones más peligrosas que otras, en el seno de una misma especie. Los autores describen y proponen la aplicación de la técnica del polimorfismo de los microsatélites marcadores, para la evaluación de las consecuencias de la variabilidad intra específica de las tse-tse sobre la epidemiología de la tripanosomosis.

Palabras clave: Tripanosomosis - *Glossina palpalis gambiensis* - PCR - Microsatélite - Variación genética - Epidemiología.

ANNEXE 11

New epidemiological features on animal trypanosomiasis by molecular analysis in the pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso

T. LEFRANÇOIS,*† P. SOLANO,*† S. DE LA ROCQUE*† Z. BENGALY,* J. M. REIFENBERG,† I. KABORE,* and D. CUISANCE†

*CIRDES, 01 BP 454, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso, †CIRAD-EMVT campus de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier, France, ‡ENVA, Laboratoire de Neurobiologie, 94704 Maisons-Alfort, France

Abstract

A multidisciplinary work was undertaken in the agropastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso to try to elucidate the key factors determining the presence of tsetse flies. In this study the PCR was used to characterize trypanosomes infecting the vector (*Glossina tachinoides* and *Glossina palpalis gambiensis*) and the host, i.e. cattle. A 2-year survey involved dissecting 2211 tsetse of the two *Glossina* species. A total of 298 parasitologically infected tsetse were analysed by PCR. *Trypanosoma vivax* was the most frequently identified trypanosome followed by the savannah type of *T. congolense* and, to a lesser extent, the riverine forest type of *T. congolense*, and by *T. brucei*. No cases of *T. simiae* were found. From the 107 identified infections in cattle, the taxa were the same, but *T. congolense* savannah type was more frequent, whereas *T. vivax* and *T. congolense* riverine forest types were found less frequently. A correlation was found between midgut infection rates of tsetse, nonidentified infections and reptile bloodmeals. These rates were higher in *G.p. gambiensis*, and in the western part of the study area. *T. vivax* infections were related to cattle bloodmeals, and were more frequent in *G. tachinoides* and in the eastern study area. The PCR results combined with bloodmeal analysis helped us to establish the relationships between the vector and the host, to assess the trypanosome challenge in the two parts of the area, to elucidate the differences between the two types of *T. congolense*, and to suspect that most midgut infections were originating from reptilian trypanosomes.

Keywords: African trypanosomes, Burkina Faso, cattle, *Glossina palpalis gambiensis*, *Glossina tachinoides*, PCR

Received 10 October 1997; revision received 17 February 1998; accepted 17 February 1998

Introduction

Animal trypanosomiasis represents a major constraint in Sub-Saharan Africa, and it is considered the most important vector-borne cattle disease transmitted by vectors in this region (FAO 1994). Nonpolluting control methods are now currently used and can prove successful under certain conditions (Vale *et al.* 1988; Cuisance *et al.* 1991; Bauer *et al.* 1992, 1995). However, these methods require a thorough knowledge of the epidemiological situation, which is both time and labour consuming. Also, there is still a great lack

of knowledge about the diagnosis of the disease, the characterization of the pathogenic agents, and the complex relationships between the tsetse and the parasites they transmit (Welburn & Maudlin 1989; Maudlin 1991; Desquesnes & de La Rocque 1995; Solano *et al.* 1996; Van den Abbeele *et al.* 1996; Reifenberg *et al.* 1997a). The PCR on tsetse organs using specific primers for different species or subgroups of trypanosomes has already proven successful in characterizing trypanosomes at the molecular level and in revealing multiple infections in single tsetse from the field (Masiga *et al.* 1992; Solano *et al.* 1995; McNamara *et al.* 1995; Woolhouse *et al.* 1996; Reifenberg *et al.* 1996). PCR on buffy-coat samples seems a promising tool (Majiwa *et al.* 1994; Penchenier *et al.* 1996; Desquesnes & Tresse 1996).

Correspondence: P. Solano. Fax: +33 4 67 59 37 97; E-mail: cuisance@cirad.fr

In the pastoral zone of Sideradougou, southwest of Burkina Faso, a multidisciplinary work tried to identify the key factors determining the presence of tsetse flies (De La Rocque & Cuisance 1997). All data on entomology, parasitology, livestock, drainage lines, environment, and human pressures were sampled in order to be included in a Geographic Information System. A tsetse eradication program had already been conducted 13 years earlier in this area through the combined use of impregnated screens and the sterile insect technique (Cuisance *et al.* 1984; Politzar & Cuisance 1984; Bauer *et al.* 1988).

The present study reports on one of the aspects of this program, i.e. the PCR characterization of the trypanosomes infecting *Glossina tachinoides* and *Glossina palpalis gambiensis*, two widespread riverine species of the *palpalis* group in West Africa, as well as cattle in the same area.

Materials and methods

Entomological surveys

The study area lies in the south sudanian savannah zone (4°20' west, 10°55' north); the hydrographic network is principally represented by the Koba and the Tolé rivers (Fig. 1). A total area of 120 km was prospected in 1996 and 1997, with biconical (Challier & Laveissière 1973) and Vavoua (Laveissière & Grebaut 1990) traps deployed at 100-m intervals (De La Rocque & Cuisance 1997). Dissections were carried out on nonteneral flies. The dissecting instruments were cleaned between each dissected organ and each dissected fly with sodium hypochloride followed by rinsing with sterile distilled water. The proboscis was first pulled out from the fly, then the salivary glands and the midgut. The three organs from each fly

were then examined for trypanosomes under a microscope at 400× magnification. When a tsetse organ was found to be positive it was placed in a single Eppendorf tube containing 50 µL of sterile distilled water (except the proboscis which was put in a tube without water).

Epidemiological surveys

In 1996 and 1997, sentinel herds were regularly checked for trypanosome infections using the buffy-coat/dark ground method (Murray *et al.* 1977) and thin blood smear. A measure of the haematocrit was routinely performed (Z. Bengaly *et al.* unpublished). Furthermore, cattle of farmers living close to the Koba and the Tolé rivers who complained about the health of their animals were also examined.

A second buffy-coat sample was collected when animals were found positive or for every individual with a haematocrit value below 25%. The sample was immediately emptied into an Eppendorf microtube containing 50 µL of sterile, distilled water, conserved at the surrounding temperatures and brought back to the CIRDES laboratory.

Preparation of samples for PCR

Sample preparation was performed according to Penchenier *et al.* (1996). Each tsetse organ was crushed with clean instruments. Salivary glands were used as crude template for PCR after simple agitation. The midgut, proboscis, and buffy coat were centrifuged at 13000 g for 8 min. After removing 30 µL of the supernatant, an amount of 50 µL of Readyamp (Promega) was added to the pellet. After agitation the samples were incubated for 20 min at 56 °C, then at 95 °C for 8 min. They

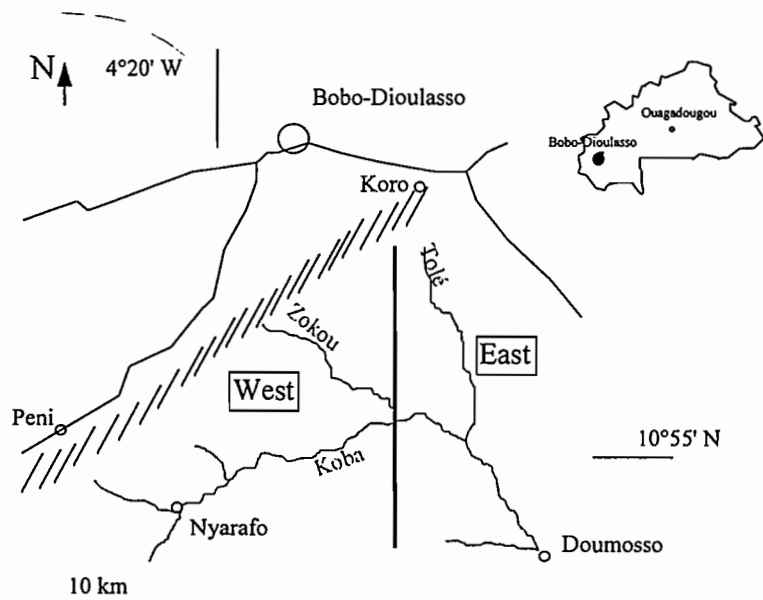


Fig. 1 Map of the area under study. The map shows the prospected gallery along the Koba and Tolé rivers, main road (—), and escarpment (indicated by diagonal lines). The vertical bar separates western and eastern parts of the area. The small map of the Burkina Faso indicates the localization of the Sideradougou area (near Bobo-Dioulasso).

were centrifuged at 13 000 g for 2 min and then frozen at -20°C before further handling.

PCR analysis

Oligonucleotide primers for trypanosome characterization were kindly provided by CIRAD-EMVT Baillarguet, France, and ILRI, Nairobi, Kenya. These primers amplified repetitive nuclear DNA sequences specific of the following taxonomic groups: *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* (T.c.) savannah type (Majiwa *et al.* 1993) and riverine forest type (Masiga *et al.* 1992), *T. (Nannomonas) simiae* (Masiga *et al.* 1992), *T. (Duttonella) vivax* (Dickin & Gibson 1989), and *T. (Trypanozoon) brucei sensu lato* (Moser *et al.* 1989).

Standard PCR amplifications and electrophoresis were carried out as described previously (Solano *et al.* 1995). Parasitologically positive samples which gave negative results were systematically subjected to a new amplification reaction for 35 or 40 cycles and, if still negative, were DNA-extracted and submitted again to an amplification reaction.

Each amplification was performed in duplicates to ensure reproducibility, and a positive control (with reference DNA of each type of trypanosome) and a negative control (without DNA) were added in each PCR assay.

When the amplification reaction gave a signal of the expected size of DNA with the primers used without signal in the negative control, the trypanosome was considered as characterized.

Analysis of tsetse blood meals

When the midgut of the flies contained sufficient blood residues, it was crushed on Whatman paper no. 1, air-dried and brought back to CIRDES for analyses. An ELISA test of antisera of defined host species was used (Kaboré *et al.* 1994).

Statistical tests

Proportions were statistically analysed with a classical χ^2 test, using Yates correction for small numbers (< 5 by cell), and means were compared using a Student's *t*-test.

Results

Parasitological results

Out of 4357 captured flies (57% *Glossina tachinoides*, and 43% *Glossina palpalis gambiensis*), 1210 *G. tachinoides* and 1001 *G.p. gambiensis* were dissected.

Among the dissected flies the overall infection rates were not statistically different between *G. tachinoides* (14.6%) and *G.p. gambiensis* (12.1%).

Infections of both proboscis and midgut were not statistically different between *G. tachinoides* (13.6%) and *G.p.*

gambiensis (7.4%). Infections of midgut alone were found less frequently in *G. tachinoides* than in *G.p. gambiensis* ($P < 0.001$). In contrast, proboscis infections were more abundant in *G. tachinoides* than in *G.p. gambiensis* ($P < 0.001$) (Table 1).

PCR analysis

A total of 298 infected tsetse (177 *G. tachinoides* and 121 *G.p. gambiensis*) were analysed by PCR. The PCR identification rate of trypanosomes in the flies was higher in *G. tachinoides* than in *G.p. gambiensis* ($P < 0.001$; Tables 1 and 2).

Combining the two species, the PCR identification rate of trypanosomes was lower for midgut infections only (15.8%) than for infections of both proboscis and midgut (72.7%) and proboscis alone (87.9%), $P < 0.001$.

In both tsetse species, *Trypanosoma vivax* was dominant when looking at overall infections. The tsetse were also infected by the savannah and the riverine-forest types of *T. congolense* and by *T. brucei*. *T. simiae* was never detected. *T. c.* savannah type, *T. vivax*, and *T. brucei* infection rates were significantly higher in *G. tachinoides* than in *G.p. gambiensis* (Table 2).

When comparing the infections in *G. tachinoides* and *G.p. gambiensis*, mature infections (defined as proboscis or salivary glands with PCR-identified trypanosomes) were more frequent in the first (Table 2). The savannah and riverine-forest types of *T. congolense* and *T. vivax* mature infection rates were significantly higher in *G. tachinoides* than in *G.p. gambiensis*. For example, in *G. tachinoides*, 85.7% of the *T.c.* riverine forest-type infections were mature; none of the *T.c.* riverine forest-type infections of *G.p. gambiensis* were mature ($P < 0.01$) (Table 2).

Comparison between parasitological and PCR results

Looking at overall infections of both proboscis and midgut (parasitologically classified as *Nannomonas*), 54.5% were effectively attributed by PCR to *Nannomonas* (with 21.2% of mixed infections with another trypanosome), 15.2% to

Table 1 Epidemiological differences between *Glossina tachinoides* and *G. palpalis gambiensis*

	<i>G. tachinoides</i>		<i>G.p. gambiensis</i>
Midgut infections	39.0%	***	68.6%
Nonidentified trypanosomes	36.2%	***	71.1%
Reptile bloodmeal	15.4%	***	34.5%
Proboscis infections	45.8%	***	21.5%
<i>Trypanosoma vivax</i>	46.9%	***	18.2%
Ruminant bloodmeal	46.3%	***	19.0%

Significant differences: ***, $P < 0.001$. The midgut infections and proboscis infections refer to microscopic examination; the non-identified trypanosomes and *T. vivax* are PCR results.

	Overall infections		Mature infections	
	<i>G. tachinoides</i>	<i>G.p. gambiensis</i>	<i>G. tachinoides</i>	<i>G.p. gambiensis</i>
Identified infections	63.8%	*** 28.9%	54.2%	*** 23.1%
<i>T.c. savannah</i> type	20.3%	** 8.3%	12.4%	* 4.1%
<i>T.c. riverine-forest</i> type	7.9%	4.1%	6.8%	** 0%
<i>T. vivax</i>	46.9%	*** 18.2%	46.3%	*** 18.2%
<i>T. brucei</i>	9.6%	* 2.5%	5.1%	2.5%

Table 2 PCR results of infected flies

Percentages of identified infections and mature infections by PCR among infected flies. The column 'overall infections' refers to positive PCR results obtained on any tsetse organ. A 'mature infection' is a positive PCR result obtained in the mouthparts and/or the salivary glands of the tsetse. The sum of the different percentages is more than 100% because of mixed infections. Significant differences: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

T. vivax, 3% to mixed *T. vivax*/*T. brucei*, and 27.3% to other nonidentified trypanosomes. From the proboscis infections (parasitologically interpreted as *Duttonella*), 86% were identified by PCR as *T. vivax*.

The PCR allowed characterization of 15.8% infections of midgut alone which could not have been identified by classical criteria. Among them the highest infection rate was with *T.c. savannah* type (11.2%) vs. *T.c. riverine forest* type (3.3%) and *T. brucei* (3.9%).

Bloodmeal analyses

A total of 233 blood relics found in the midgut gave interpretable results. The bloodmeal origins differed significantly between the two tsetse species. Bloodmeals from ruminants were more frequent in *G. tachinoides* than in *G.p. gambiensis*. In contrast, bloodmeals from reptiles were more frequent in *G.p. gambiensis* (see Table 1). Most of the other bloodmeals originated from suids, and from humans, dogs and equines in lower proportions.

Spatial analysis

As a first step in the spatialization of the results, differences were observed between the western and eastern parts of the Sidéradougou zone (see Table 3).

Localization of the tsetse showed that 52% of the *G. tachinoides* and 60% of the *G.p. gambiensis* were captured in the western area. The infection rates were higher in the western than in the eastern area for *G. tachinoides* (19% vs. 11.8%, $P < 0.01$) and for *G.p. gambiensis* (17.3% vs. 2.3%, $P < 0.001$).

For the two combined species, midgut infections and bloodmeals from reptiles were more frequent in the western than in the eastern area, whereas proboscis infections and bloodmeals from ruminants were more frequent in the eastern.

The PCR identification rate of trypanosomes in the flies was higher in the eastern than in the western area, and *T. vivax* infection rate was higher in the eastern area.

Buffy-coat analyses by PCR

Buffy-coat analysis was performed by PCR on 137 cattle found infected by parasitological analysis, or with a haematocrit lower than 25%. The PCR made it possible to characterize 90% of parasitologically positive animals. Furthermore, 50% of parasitologically negative cattle with a haematocrit below 25% were found to be infected by PCR analysis.

Among infections identified by PCR (see Table 4), *T. congolense* infections (64.3%) were more frequent than *T. vivax*

	West		East
Parasitological infection rate	23%	***	10.0%
Proportion of midgut infections	65.5%	***	20.0%
Proportion of proboscis infections	22.7%	***	64.2%
Proportion of <i>T. vivax</i> by PCR	21.2%	***	65.3%
Proportion of bloodmeals on ruminants	21.2%	**	42.8%
Proportion of non identified infections by PCR	66.5%	***	15.8%
Proportion of bloodmeals on reptiles	36.4%	**	16.9%

Table 3 Epidemiological differences between western and eastern areas

Significant differences: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Table 4 PCR analysis of tsetse and cattle infections

	Tsetse		Cattle
Identified by PCR	124		107
<i>T.c. savannah</i> type	21.8%	***	64.3%
<i>T.c. riverine</i> forest type	9.7%	*	3.1%
<i>T. vivax</i>	83.9%	***	39.8%
<i>T. brucei</i>	9.7%		11.2%
Mixed	20.2%		16.3%

Percentages of identified infections by PCR for the combined two tsetse species (mature infections) and for the buffy-coat analysis of cattle blood. The sum of the different percentages is more than 100% because of mixed infections. Significant differences: *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

(39.8%, $P < 0.001$) which again were superior to *T. brucei* (11.2%, $P < 0.01$). The savannah type of *T. congolense* was much more frequent than the riverine forest type ($P < 0.001$). Mixed infections involving various trypanosome groups were observed (see Table 4). The *T.c. riverine* forest type was found only in three suspect animals (parasitologically negative, with haematocrit under 25%).

Discussion

In this work, the trypanosome infection rates of the two tsetse taxa were higher than generally reported in West Africa (Nash & Page 1953; Jordan 1961; Baldry 1964). This was notably true when looking at mature infection rates in *Glossina palpalis gambiense* in West Africa (Squire 1954), particularly in Burkina Faso (Bauer *et al.* 1995; Solano *et al.* 1996), but also to a lesser extent for *G. tachinoides* (see Buxton 1955).

When parasitological interpretation was compared with PCR looking at the two tsetse species, 45.5% of the presumed (i.e. by microscopic examination) *Nannomonas* infections were attributed by PCR as *Trypanosoma vivax*, *T. brucei* or were not identified. These infections were actually characterized mainly as *T. vivax* in the proboscis with a concomitant infection of another species in the midgut, thus leading to a false diagnosis of *Nannomonas*.

The primer sets used in this work allowed the distinction of *T. congolense* and *T. simiae*. However, in our study, *T. simiae* was never characterized by PCR, although it had already been found in these tsetse taxa in other parts of Burkina Faso (Solano *et al.* 1996; Reifenberg *et al.* 1997b). Trypanosomes at the infraspecies taxonomic level could also be differentiated (savannah and riverine forest types of *T. congolense*), which might infect different host species (Sidibe 1996; Reifenberg *et al.* 1997b). The PCR technology also made it possible to detect mixed infections involving two types of trypanosomes, and to characterize some of the midgut infections.

The analysis of the buffy coat using PCR proved a very effective diagnostic tool in this work because 90% of parasitologically infected and 50% of suspect cattle were infected. Majiwa *et al.* (1994), also reported positive PCR results on 12.5% antigenemic but aparasitaemic cattle. The results also underline the value of haematocrit as an indicator of cattle herd health. Combining parasitological prevalence analyses with haematocrit readings provides a reliable method to assess the trypanosome challenge.

The identification rate of infections in the midgut alone of the tsetse was very low. This could have been due to technical failure (PCR inhibitors in the midgut) or to the fact that the majority of trypanosomes in the midgut were eventually found to be *T. grayi*- or *varani*-like (Hoare 1931; Minter-Goedbloed *et al.* 1993) infections, not recognized by our set of primers. DNA extraction, known to prevent PCR inhibitors, failed to characterize the nonidentified midgut infections. Second, in some of these midguts, the trypanosomes were observed just at the limit between the midgut and the hindgut, suggesting the presence of reptile-specific trypanosomes. This hypothesis was strengthened by the various reptile fauna (crocodiles, monitor lizards) frequently seen in the area, on which tsetse of the *palpalis* group are known to feed preferentially (Jordan 1961; Gouteux *et al.* 1982; Laveissière & Boreham 1982). This also appeared to be true for *G.p. gambiense* in Burkina Faso (Bauer *et al.* 1995). In this study, the overall negative PCR results on observed infections were higher in *G.p. gambiense* than in *G. tachinoides*, the first species having a higher proportion of infections in the midgut alone, with a higher proportion of reptile bloodmeals. Furthermore, 75% of bloodmeals originated from reptiles in nonidentified midgut infections. Therefore, it is postulated that most of these midgut infections can be attributed to *T. grayi*- and *T. varani*-like trypanosomes. However, the other infected midguts which were not characterized could also harbour other pathogenic trypanosomes not recognized by the set of primers used in this work (Masiga *et al.* 1992; Majiwa *et al.* 1993; McNamara *et al.* 1994).

When looking at overall infections characterized by PCR in both species, *T. vivax* was the most frequent. This was not the case in the examined cattle, as the most frequent identified trypanosome was *T.c. savannah* type. All infected tsetse with a bloodmeal of ruminant origin were infected by *T. vivax*, confirming the correlation between the acquisition of *T. vivax* infections and host preferences (Jordan 1965; Ryan *et al.* 1986). *T. vivax* infection rates were higher in *G. tachinoides* than in *G.p. gambiense*; this was related to a higher proportion of infections in the proboscis alone and with a higher proportion of ruminant bloodmeals.

These results emphasize the interest of using PCR and systematic bloodmeal analysis of infected tsetse, eventually improving the latter through the use of PCR methods.

The discrepancies between the dominant trypanosome taxa in the tsetse (*T. vivax*) and in cattle (*T.c. savannah*) raise the followings questions. (i) Did we catch the true vectors, i.e. are the tsetse entering the traps those that transmit the trypanosomes found in cattle? If some vector populations could avoid the traps, this could account for some of the observed discrepancies (RTTCP 1996). (ii) Were the cattle of this area able to control *T. vivax* infections? (iii) Do we have a sufficiently reliable method of detecting *T. vivax* in the blood of cattle? Due to the fact that this trypanosome sometimes causes aparasitaemic phases in animals and might hide in extravascular refuges (Desquesnes & Gardiner 1993), it could exist in greater proportions than those detected in this study. Indeed, a proportion of infections of cattle identified by PCR as *T. vivax* needed 40 reaction cycles to obtain a signal, suggesting also that the primers used lacked sensitivity (Dickin & Gibson 1989) or that *T. vivax* DNA was present in small quantities. It could also be inferred that these primers do not amplify DNA of all *Duttonella* stocks circulating in West Africa (Solano *et al.* 1997), as suggested by a recent work in a wildlife area of Burkina Faso (T. Lefrançois *et al.* unpublished). Perhaps new *T. vivax* primers isolated from the DNA coding for recently described antigen would help to clarify these problems (Masake *et al.* 1997).

To our knowledge, it is the first time that the riverine forest type of *T. congolense* has been identified by PCR in cattle in West Africa. It was only observed in three suspect (negative by microscopic examination) animals, and was associated with *T.c. savannah* in two out of these three cases. Its infection rates were significantly lower in cattle than in tsetse, particularly when compared with *T.c. savannah*-type infection (*T.c. savannah* type was two times more frequent than *T.c. riverine* forest type in tsetse, when it was 20 times more frequent in cattle). This suggests a difference in the transmission of the two taxa. In the present study, the *T.c. riverine* forest type seemed to mature easily in *G. tachinoides*, but not in *G.p. gambiensis*. In a previous work in the Gambia (McNamara & Snow 1991), the riverine forest type of *T. congolense* had been found in *G.p. gambiensis* living in relic forest areas. The forest type seemed to be more frequently transmitted by the riverine species (*palpalis* group), whereas the savannah-type parasite would be confined to the *morsitans* group flies (Reifenberg *et al.* 1997b). In the present work these associations do not appear so clearly. Genetic studies on tsetse at the population level would eventually add some new insights for these host-parasite relationships (Solano *et al.* 1997b). Studies on the compared pathogenicities of trypanosome subgroups could also help to better understand the epidemiology of animal trypanosomiasis in West Africa.

Looking at the differences between the western and the eastern part of the area (Table 3), one can see that epi-

demiology of trypanosomiasis strongly differs between the two parts that are separated by a few kilometres. The western part comprises high overall infection rates in both tsetse, most of them not being identified by PCR, with the two tsetse species feeding more readily on reptiles thus being less 'dangerous'. In the eastern part, the infected flies are less numerous, but due to the high proportion of bloodmeals on cattle, and of identification of mature infections with known pathogenic trypanosomes, the risk seems as high as in the western part. This stresses the usefulness of a spatial approach to determine the trypanosomiasis risk in a given area. Other information on the human pressure, cattle distribution, and ecological data could help to design a model of the epidemiological situation in this part of West Africa.

Acknowledgements

This work was funded by CIRAD-EMVT (Action Thématique Programmée 'Santé-Environnement'), CNRS (Programme Interdisciplinaire 'Environnement, Vie et Société'), AUPELF-UREF, LAF no. X/7.10.02/4581-306. We are indebted to Dr S. M. Touré, director of CIRDES for allowing us to do all the work in CIRDES, and we thank all the technical staff for excellent work. Thanks to Drs G. Duvallet, B. Bauer, I. Sidibe and J. F. Michel for helpful comments.

References

- Baldry DAT (1964) Observations on a close association between *Glossina tachinoides* and domestic pigs near Nsukka, eastern Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **58**, 32-43.
- Bauer B, Petric-HBauer J, Kabore I *et al.* (1988) Epidemiological survey in the pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. Proceedings of an International Symposium on Modern Insect Control, Vienna, 16-20/11/1987.
- Bauer B, Kaboré I, Liebisch A *et al.* (1992) Simultaneous control of ticks and tsetse flies in Satiri, Burkina Faso, by the use of flumethrin pour on to cattle. *Tropical Medicine and Parasitology*, **43**, 41-46.
- Bauer B, Amsler-Delafose S, Clausen P-H *et al.* (1995) Successful application of deltamethrin pour on to cattle in a campaign against tsetse flies in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Tropical Medicine and Parasitology*, **46**, 183-189.
- Buxton (1955) The natural history of tsetse flies. *London School of Hygiene and Tropical Medicine, Memoir* 10.
- Challier A, Laveissière C (1973) Un nouveau piège pour la capture des glossines: description et essais sur le terrain. In *Cahiers ORSTOM Série Entomologie Médicale Et Parasitologie*, **11**, 251-262.
- Cuisance D, Politzar H, Merot P, Tamboura I (1984) Les lâchers de mâles irradiés dans la campagne de lutte intégrée contre les glossines dans la zone pastorale de Sideradougou (Haute Volta). *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **37**, 449-467.
- Cuisance D, Cailton P, Kota-Guinza A *et al.* (1991) Lutte contre *Glossina fuscipes fuscipes* par piégeage chez les éleveurs Mbororo de République Centrafricaine. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **44**, 81-89.

- De La Rocque S, Cuisance D (1997) Facteurs discriminants de la présence de glossines au Burkina faso. Interêt dans la prévision du risque de trypanosomoses. *Epidémiologie et Santé Animale*, 31–32.
- Desquesnes M, Gardiner PR (1993) Epidémiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane française. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 46, 463–470.
- Desquesnes M, de La Rocque S (1995) Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 48, 247–253.
- Desquesnes M, Tresse L (1996) Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 49, 322–327.
- Dickin SK, Gibson WC (1989) Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33, 135–142.
- FAO (1994) The coordination of research and development within a global programme to clarify and solve the problem of African Animal Trypanosomiasis. Meeting of an FAO, joint FAO/IAEA Consultative Group, under the programme for the Control of African Animal Trypanosomiasis and related Development, Vienne 22–25 November, 1994.
- Gouteux JP, Laveissière C, Boreham PFL (1982) Ecologie des glossines en secteur pré-forestier de Côte d'Ivoire. 2. Les préférences trophiques de *Glossina palpalis* s.l. *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie médical et Parasitologie*, Vol. XX, no. 1, pp. 3–18.
- Hoare CA (1931) Studies on *Trypanosoma grayi*. 3. Life-cycle in the tsetse fly and in the crocodile. *Parasitology*, 23, 449–484.
- Jordan AM (1961) An assessment of the economic importance of the tsetse species of southern Nigeria and the southern Cameroons based on their trypanosome infection rates and ecology. *Bulletin of Entomological Research*, 52, 431–441.
- Jordan AM (1965) The host of *Glossina* as the main factor affecting trypanosome infection rates of tsetse flies in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, 59, 423–431.
- Kaboré I, Amsler-Delafosse S, Bauer B *et al.* (1994) Analyse des repas de sang de mouches tsé-tsé pour une contribution aux études épidémiologiques des trypanosomoses africaines. 4ème congrès de la Société Ouest-Africaine de Parasitologie, Ouagadougou, Burkina-Faso.
- Laveissière C, Boreham PFL (1982) Ecologie de *Glossina tachinoides* Westwood, 1850, en savane humide d'Afrique de l'Ouest. I. Préférences trophiques. *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie médical et Parasitologie*, Vol. XIV, no. 3, 187–200.
- Laveissière C, Grebaut P (1990) Recherches sur les pièges à glossines (Diptera: Glossinidae). Mise au point d'un modèle économique, le piège Vavoua. *Tropical Medicine and Parasitology*, 41, 185–192.
- Majiwa PAO Maina M, Waitumbi JN *et al.* (1993) *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*, 106, 151–162.
- Majiwa PAO Thatthi R, Moloo SK *et al.* (1994) Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenemic but aparasitaemic cattle. *Parasitology*, 108, 313–322.
- Masake RA, Majiwa PAO Moloo SK *et al.* (1997) Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the Polymerase Chain Reaction. *Experimental Parasitology*, 85, 193–205.
- Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P *et al.* (1992) Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal for Parasitology*, 22, 909–918.
- Maudlin I (1991) Transmission of African trypanosomiasis: interactions among tsetse immune system, symbionts, and parasites. *Advances in Disease Vector Research*, 7, 117–147.
- McNamara JJ, Snow WF (1991) Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from the Gambia. *Acta Tropica*, 48, 127–136.
- McNamara JJ, Mohammed G, Gibson WC (1994) *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: biological and biochemical characterization. *Parasitology*, 109, 497–509.
- McNamara JJ, Laveissière C, Masiga DK (1995) Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Côte d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta Tropica*, 59, 85–92.
- Minter-Goedbloed E, Leake CJ, Minter DM *et al.* (1993) *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: development in vitro and in insect hosts. *Parasitological Research*, 79, 329–333.
- Moser DR, Cook GA, Ochs DE *et al.* (1989) Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. *Parasitology*, 99, 57–66.
- Murray M, Murray PK, McIntyre WIM (1977) An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 325–326.
- Nash TAM and Page WA (1953) The ecology of *Glossina palpalis* in Northern Nigeria. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 104, 71–169.
- Penchenier L, Dumas V, Grebaut P *et al.* (1996) Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite*, 4, 387–389.
- Politzar H, Cuisance D (1984) An integrated campaign against riverine tsetse *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* by trapping and the release of sterile males. *Insect Science and its Application*, 5, 439–442.
- R.T.T.C.P. (1996) Overview of the presentations to the RTTCP workshop on priorities in research and development, Harare, 12–14/03/96.
- Reifenberg JM, Cuisance D, Gidudu A *et al.* (1996) Evaluation de la compétence vectorielle de *Glossina tachinoides* vis-à-vis de *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Broden, 1904: implications épidémiologiques. *Parasite*, 3, 267–276.
- Reifenberg JM, Cuisance D, Frézil JL *et al.* (1997a) Comparison of the susceptibility of different *Glossina* species to simple and mixed infections with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Savannah and riverine-forest types. *Medical and Veterinary Entomology*, 11, 246–252.
- Reifenberg JM, Solano P, Bauer B *et al.* (1997b) Apport de la technique PCR pour une meilleure compréhension de l'épizootologie des trypanosomoses bovines: exemple de la zone pastorale de Yallé au Burkina Faso. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 50, 14–22.
- Ryan L, Küpper W, Molyneux DH, Clair M (1986) Relationships between geographical and dietary factors and trypanosome infection rates of tsetse flies in the field (Diptera: Glossinidae). *Entomology Genera*, 12, 077–081.

- Sidibe I (1996) *Variabilité Génétique de Trypanosoma congolense Agent de la Trypanosomose Animale: Implications Taxonomiques et Épidémiologiques*. PhD Thesis, Université Montpellier II.
- Solano P, Argiro L, Reifenberg JM *et al.* (1995) Field application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* in Côte d'Ivoire. *Molecular Ecology*, **4**, 781–785.
- Solano P, Reifenberg JM, Amsler-Delafose S *et al.* (1996) Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso. *Medical and Veterinary Entomology*, **10**, 354–358.
- Solano P, Desquesnes M, Sidibé I (1997a) Le diagnostic de *Trypanosoma vivax*: un problème non résolu dans l'épidémiologie des trypanosomoses. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **50**, 209–213.
- Solano P, Duvallet G, Dumas V, Cuisance D, Cuny G (1997b) Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta tropica*, **65**, 175–180.
- Squire FA (1954) Observations on the incidence of trypanosomes in *Glossina palpalis* in Sierra Leone. *Bulletin of Entomological Research*, **45**, 797–801.
- Vale GA, Lovemore DF, Flint S, Cockbill GF (1988) Odour-baited targets to control tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae), in Zimbabwe. *Bulletin of Entomological Research*, **78**, 31–49.
- Van Den Abbeele J, Van Driessche E, Claes Y *et al.* (1996) Trypanosome-binding proteins of the tsetse flies *Glossina palpalis gambiensis* and *G. morsitans morsitans*. *International Journal For Parasitology*, **26**, 113–116.
- Welburn SC, Maudlin I (1989) Lectin signalling of maturation of *T. congolense* infections in tsetse. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**, 141–145.
- Woolhouse MEJ, McNamara JJ, Hargrove JW, Bealby KA (1996) Distribution and abundance of trypanosome (subgenus *Nannomonas*) infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in Southern Africa. *Molecular Ecology*, **5**, 11–18.

T. Lefrançois, P. Solano, S. de La Rocque, J. M. Reifenberg and Z. Bengaly collected the biological material and performed the PCR analyses at the CIRDES (Centre international de Recherche-Développement sur l'Élevage en Zone subhumide) in Burkina Faso (West Africa); I. Kabore performed the bloodmeal analyses. This work represents a part of a multidisciplinary study on the spatialization of the trypanosomian risk directed by D. Cuisance (CIRAD-EMVT France).

ANNEXE 12

Le diagnostic de *Trypanosoma vivax* : un problème non résolu dans l'épidémiologie des trypanosomoses

P. Solano ^{1,2*} M. Desquesnes ^{1,2} I. Sidibe ¹

Mots-clés

Trypanosoma vivax - Diagnostic - PCR - Test ELISA - Ruminant - *Glossina* - Parasitologie - Epidémiologie - Burkina Faso - Afrique occidentale.

Résumé

Trypanosoma (Duttonella) vivax est un parasite des ruminants domestiques en Afrique et en Amérique latine. Les souches en Amérique latine, transmises mécaniquement par divers insectes piqueurs, ont perdu la capacité d'infecter les glossines qui les transmettent cycliquement en Afrique subsaharienne. Les auteurs ont passé en revue diverses techniques de diagnostic utilisées pour détecter *T. vivax* sur le terrain, allant des examens parasitologiques classiques aux techniques moléculaires (PCR), en passant par les tests sérologiques. La PCR, qui offrait une sensibilité et une spécificité non égalées, a été utilisée au CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, et les résultats obtenus par cette technique pour identifier *T. vivax* sur les bovins et sur les pièces buccales des glossines ont été comparés aux résultats parasitologiques de plusieurs études récentes en Afrique de l'Ouest. Le fait le plus marquant concernait, dans certaines régions, une proportion non négligeable de mouches infectées seulement dans le proboscis (cycle de *T. vivax*) ne donnant aucun signal PCR avec les amorces *T. vivax*. Les auteurs ont envisagé plusieurs hypothèses pour expliquer ces résultats, la plus probable semblant être la circulation de souches du sous-genre *Duttonella* non reconnues par les marqueurs utilisés. Des études de variabilité génétique et de pathogénicité des souches locales seraient intéressantes à mener.

■ INTRODUCTION

Trypanosoma (Duttonella) vivax Ziemann, 1905 est un protozoaire parasite de la section des *Salivaria* affectant l'élevage, principalement les ruminants domestiques. Il est surtout présent en Afrique subsaharienne où il est transmis cycliquement et mécaniquement par les glossines, ou mouches tsé-tsé, et mécaniquement par d'autres insectes piqueurs (Tabanides, stomoxes...). En Amérique du Sud et dans les Caraïbes, sa propagation mécanique est principalement assurée par les Tabanides et les stomoxes (*Tabanus* spp.,

Chrysops spp., *Stomoxys* spp...). *T. vivax* est pathogène chez les bovidés domestiques ainsi que chez les petits ruminants, causant une anémie sévère en phase aiguë de l'infection (12). Contrairement à *T. congolense*, les animaux infectés semblent avoir une plus grande capacité à pouvoir contrôler l'infection ; des formes hyperaiguës hémorragiques ont cependant été décrites, pouvant entraîner la mort ou des avortements avant diagnostic ou traitement (14, 28). Les pertes économiques dues à ce parasite sont importantes et difficiles à évaluer : pertes directes (mort) et indirectes (avortement, amaigrissement, baisse de productivité...).

■ LES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic de l'infection repose classiquement sur la mise en évidence des trypanosomes dans le sang des animaux, soit par l'examen du *buffy-coat* (25, 36), où l'on reconnaît le parasite par

1. CIRDES, BP 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

2. CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

* Auteur pour la correspondance : CIRDES, BP 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso
Tél : 226 97 22 87 ; fax : 226 97 23 20

sa taille et sa motilité (2), soit sur frottis, où l'identification est réalisée sur les critères de morphologie et morphométrie (13). Ces techniques, si elles sont très spécifiques pour *T. vivax*, sont reconnues pour manquer de sensibilité, surtout en phase chronique de la maladie où les parasitemies sont généralement basses (12). Une difficulté supplémentaire réside dans le fait que *T. vivax* ne se cultive pas *in vitro* sur des milieux classiques, et n'infecte que très peu les rongeurs de laboratoire.

Une alternative aux méthodes directes de diagnostic est la mise en évidence d'anticorps antitrypanosomiens dans le sang des animaux testés. Toutefois, elle ne permet pas de faire la différence entre une infection passée et une infection active, pas plus qu'elle ne permet de différencier les diverses espèces de trypanosomes pathogènes présents (*T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei*). Un grand espoir fut soulevé par la mise au point des tests de détection des antigènes circulants par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (26, 27). Mais après plusieurs années d'évaluation dans divers laboratoires (ILRI*, CIRAD-EMVT**, CIRDES***), il est maintenant reconnu que ce test présente une sensibilité et une spécificité très limitées, voire inférieures aux techniques microscopiques, surtout pour la détection de *T. vivax* (4, 5, 15).

Une avancée sensible a vu le jour après l'élaboration de sondes ADN spécifiques d'espèces de trypanosomes (16). Dickin et Gibson (7) ont ainsi mis au point une sonde spécifique de *T. vivax* basée sur des séquences répétées, afin d'augmenter la sensibilité du test. Cette sonde permet de détecter *T. vivax* dans le sang des animaux et dans les pièces buccales des glossines où le trypanosome effectue son cycle. Toutefois, la sensibilité de détection des parasites avec cette technique était encore limitée à 1 000 trypanosomes/*dot blot* (7). La découverte de la technique PCR (*polymerase chain reaction*, ou amplification en chaîne par polymérase) (23, 31) utilisant des amorces oligonucléotidiques issues de ces sondes a permis de progresser dans la sensibilité du diagnostic : pour *T. vivax*, la PCR permet de détecter jusqu'à 2 trypanosomes/ml de sang avec un kit commercial de purification (6).

■ LES TECHNIQUES MOLECULAIRES POUR LE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMOSES

La technique PCR, considérée comme la plus sensible et la plus spécifique, fut mise en place au CIRDES en 1993 afin de pouvoir diagnostiquer de manière fiable les trypanosomes pathogènes du bétail, aussi bien sur les hôtes mammifères que sur les glossines vectrices (10). Des amorces spécifiques de groupes de trypanosomes furent mises au point à l'ILRI et à Bristol et utilisées au CIRDES (tableau I). Il faut préciser qu'il existe au moins cinq couples d'amorces issues de sondes génomiques amplifiant des groupes taxonomiques différents dans le sous-genre *Nannomonas* (*T. congolense* savane ; *T.c.* forêt ; *T.c.* Kilifi ; *T.c.* Tsavo ; *T. godfreyi* ; *T. simiae*). Bien que ces trypanosomes diffèrent par des caractéristiques moléculaires distinctes, on ne sait pas encore s'ils présentent des pathogénicités propres (29, 30), sauf pour *T. simiae*, pathogène surtout chez les suidés domestiques (35). En revanche pour *Duttonella*, les sondes existantes sont décrites comme spécifiques du sous-genre dans la majorité de sa distribution géographique (7, 9, 19). Deux couples d'amorces PCR amplifiant l'ADN

de *T. vivax* et issus de la même sonde (7) sont actuellement les plus utilisés (tableau I). Toutefois, l'ADN de certaines souches de *T. vivax* d'Afrique de l'Est n'hybriderait pas avec ces sondes (19). Enfin, aucune réaction croisée entre ces différentes espèces et sous-groupes de trypanosomes n'est rapportée avec les amorces et sondes citées.

Au CIRDES, le diagnostic de la trypanosomose repose aussi bien sur les techniques classiques que sur les techniques moléculaires, et il est réalisé sur les hôtes mammifères et chez les vecteurs (3, 29, 30, 33, 34). Rappelons que chez les glossines, le diagnostic microscopique classique repose sur la localisation des trypanosomes dans les organes de la mouche (17) : ainsi lorsque seul le proboscis est infecté, on conclut à la présence de *T. vivax*. Grâce à la technique PCR, les auteurs ont pu comparer lors de plusieurs études les interprétations parasitologiques et les caractérisations par la technique moléculaire. En général, de bonnes corrélations ont été observées par les auteurs entre les interprétations parasitologiques *Nannomonas* (présence des trypanosomes dans l'intestin moyen et le proboscis de la glossine) et la détection par PCR de *T.c.* savane et forêt, ou *T. simiae* (appartenant tous effectivement au sous-genre *Nannomonas*). Il n'en est pas toujours de même pour *T. vivax*.

■ COMPARAISON DE DIFFERENTES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC DE *T. VIVAX* ET DISCUSSION

Sur les glossines chez lesquelles seul le proboscis s'est révélé infecté en microscopie, des résultats PCR très variables ont été observés (tableau II). Au Burkina Faso, par exemple, si l'on observe ce type d'infection chez *Glossina tachinoides* dans la zone de Sidéradougou, la corrélation entre la parasitologie et la PCR pour l'identification de *T. vivax* est pratiquement parfaite. En revanche, dans le ranch de Nazinga, la PCR ne permet plus d'identifier qu'un cinquième des infections du proboscis. L'hypothèse de l'existence de DNase ou autres inhibiteurs de la réaction PCR pour expliquer les faux négatifs paraît peu probable dans le proboscis, milieu biochimiquement plus inerte que l'intestin. L'hypothèse d'un problème technique lors de la réaction peut être rejetée car les examens de Sidéradougou et Nazinga ont été réalisés sur la même espèce (*G. tachinoides*) et avec le même lot de réactifs. Sur chaque proboscis positif au microscope et ne donnant aucun signal en PCR, une extraction d'ADN a été réalisée mais n'a pas fourni de résultats positifs. Une autre hypothèse serait que la présence de trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* aurait pu passer inaperçue au microscope, du fait de leur faible abondance ou de leur disparition de l'intestin moyen (1). Toutefois, lorsqu'une glossine est positive dans un organe, tous les organes sont systématiquement prélevés pour la PCR et, dans le cas de Nazinga, aucun signal PCR n'est apparu avec la batterie d'amorces testées dans tous les organes examinés. Enfin, il ne faut pas négliger la présence transitoire possible dans le proboscis de trypanosomes non pathogènes (*Megatrypanum* spp...) ayant pu être ingérés lors d'un repas de sang récent des glossines. Mais la fréquence élevée de ces observations, ainsi que l'état nutritionnel des glossines (pas ou peu de résidus sanguins dans l'intestin, indiquant un repas ancien) ne sont pas en faveur de cette hypothèse.

Il paraît plus probable que certaines souches ayant un développement de type *Duttonella* chez le vecteur circulent dans la région de Nazinga et peut-être dans d'autres secteurs géographiques, et ne sont pas reconnues par les amorces utilisées. Il conviendrait d'isoler ces trypanosomes des pièces buccales des glossines et de les cultiver, ce qui n'a pas encore été réalisé. Ceci permettrait aussi de

* ILRI : International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya

** CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement ; EMVT : département d'Elevage et de médecine vétérinaire

*** CIRDES : Centre international de recherche-développement sur l'élevage en zone subhumide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Tableau I
Couples d'amorces utilisés au CIRDES pour la PCR

Couples d'amorces	Référence	Groupe taxonomique	Taille du produit amplifié
VOL 1,2	Dickin and Gibson, 1989 <i>Mol. Biochem. Parasitol.</i> , 33: 135-142	<i>T. vivax</i>	180 pb
TVW-1, 2	Masiga et coll., 1992 <i>Int. J. Parasitol.</i> , 22: 909-918	<i>T. vivax</i>	150 pb
IL 0344-0345	Majiwa et coll., 1993 <i>Parasitology</i> , 106: 151-162	<i>T. congolense</i> type savane	320 pb
TCF 1,2	Masiga et coll., 1992 <i>Int. J. Parasitol.</i> , 22: 909-918	<i>T. congolense</i> type forêt	350 pb
TSM-1,2	Masiga et coll., 1992 <i>Int. J. Parasitol.</i> , 22: 909-918	<i>T. simiae</i>	437 pb
TBR 1,2	Moser et coll., 1989 <i>Parasitology</i> , 99: 57-66	<i>T. brucei</i> s.l.	177 pb

Tableau II

Proportions de *T. vivax* reconnus par la PCR sur des mouches infectées uniquement dans le proboscis, ou sur des bovins où *T. vivax* a été reconnu morphologiquement, dans diverses études en Afrique de l'Ouest

Espèce hôte	Lieu	% de <i>T. vivax</i>	Référence
<i>G. longipalpis</i>	Côte d'Ivoire	17	Solano et coll., 1995 <i>Mol. Ecol.</i> , 4: 781-785
<i>G. p. gambiensis</i> et <i>G. tachinoides</i>	Padema, Burkina Faso	100	Solano et coll., 1996 <i>Med. vet. Entomol.</i> , 10: 354-358
<i>G. tachinoides</i> et <i>G.m.submorsitans</i>	Nazinga, Burkina Faso	13	Lefrançois et coll., en préparation
<i>G. tachinoides</i>	Sideradougou Burkina Faso	88	Lefrançois et coll., en préparation
Bovins	Yalé, Burkina Faso	41	Reifenberg et coll., 1997 <i>Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.</i> , 50: 14-22

savoir si ces trypanosomes sont restreints à la faune sauvage, ou s'ils présentent un pouvoir pathogène pour les espèces domestiques (21). Ainsi on peut se demander si certains trypanosomes (par exemple *T. uniforme*, appartenant au sous-genre *Duttonella* mais considéré comme peu pathogène (13)), hybrideraient avec les sondes spécifiques de *T. vivax* actuellement disponibles.

La technique des isoenzymes a été utilisée pour la caractérisation de stocks de *T. vivax* mais n'a pas permis de séparer distinctement les souches de *T. vivax* d'Afrique de l'Ouest de celles d'Amérique du Sud (9, 24), ni celles d'Afrique de l'Ouest et d'Ouganda (11). Malgré certaines études moléculaires (PCR avec amorces arbitraires) (8), dans l'état actuel des connaissances, aucune technique

n'a permis de distinguer de manière discriminante les souches africaines transmises cycliquement et les souches sud-américaines transmises mécaniquement, certaines de ces dernières ayant perdu la capacité d'infecter les glossines (9). Il semble donc judicieux d'entreprendre des études de variabilité génétique des populations de *T. vivax* par des isollements de souches circulant dans la nature en association avec des études de pathogénicité. Les techniques du polymorphisme de l'ADN microsatellite et de l'amplification de l'ADN à l'aide d'amorces aléatoires (RAPD) pourraient être d'une grande utilité dans ce type d'étude ; en effet, des résultats récents sur les trypanosomes des sous-genres *Nannomonas* et *Trypanozoon* (*T. brucei* s.l.) montrent un polymorphisme important par la technique des RAPD (32).

Remerciements

Nous remercions vivement Dr S.M. Touré, Directeur du CIRDES, de nous avoir autorisés à mener ces travaux dans cet institut. Nous remercions le CIRAD-EMVT et l'AUPELF-UREF (LAF 306) pour le financement de ces travaux.

BIBLIOGRAPHIE

- BALDRY D.A.T., 1969. The epidemiological significance of recent observations in Nigeria on the ecology of *Glossina tachinoides* Westwood. *Bull. Entomol. Soc.*, 2: 34-38.
- BRUCE D., HAMERTON A.E., BATEMAN H.R., MACKIE F.P., BRUCE M., 1910. Trypanosome diseases of domestic animals in Uganda. III. *Trypanosoma vivax* Ziemann. *Proc. R. Soc., Series B*, 83: 150-162.
- DELAFOSSÉ A., BENGALY Z., DUVALLET G., 1996. Utilisation du test ELISA de détection des antigènes circulants de trypanosomes dans le cadre d'un suivi épidémiologique dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 49 : 32-37.
- DESQUESNES M., 1996. Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes with an isolate of *Trypanosoma vivax* from French Guyana. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 791: 172-184.
- DESQUESNES M., DE LAROCQUE S., 1995. Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 48 : 247-253.
- DESQUESNES M., TRESSE L., 1996. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 49 : 322-327.
- DICKIN S.K., GIBSON W.C., 1989. Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 33: 135-142.
- DIRIE M.F., MURPHY N.B., GARDINER P.R., 1993. DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. *J. Euk. Microbiol.*, 40: 132-134.
- DIRIE M.F., OTTE M.J., THATTI R., GARDINER P.R., 1993. Comparative studies of *Trypanosoma vivax* isolates from Colombia. *Parasitology*, 106: 21-29.
- DUVALLET G., TOURE S.M., 1994. Transfert de nouveaux outils biotechnologiques au CIRDES pour une meilleure connaissance des trypanosomoses animales et de leur épidémiologie. *Tropicultura*, 12 : 155-156.
- FASOGBON A.I., KNOWLES G., GARDINER P.R., 1990. A comparison of the isoenzymes of *Trypanosoma vivax* isolates from East and West Africa. *Int. J. Parasitol.*, 20: 389-394.
- GARDINER P., 1989. Recent studies on the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv. Parasitol.*, 28: 229-317.
- HOARE C.B., 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Oxford, United Kingdom, Blackwell Scientific Publications.
- HUDSON J.R., 1944. Acute and subacute trypanosomiasis in cattle caused by *T. vivax*. *J. comp. Pathol.*, 54: 108-119.
- KANWE A.B., BENGALY Z., SAULNIER D., DUVALLET G., 1992. Evaluation du test de détection des antigènes circulants de trypanosomes à l'aide d'anticorps monoclonaux. Infections expérimentales et naturelles. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 45 : 265-271.
- KUKLA B. A., MAJIWA P.A.O., YOUNG J.R., MOLOO S.K., OLE-MOIYOI O., 1987. Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology*, 95: 1-16.
- LLOYD L., JOHNSON W.B., 1924. The trypanosome infections of tsetse flies in Northern Nigeria and a new method of estimation. *Bull. Entomol. Res.*, 14: 265-288.
- MAJIWA P.A.O., MAINA M., WAITUMBI J.N., MIHOK S., ZWEYGARTH E., 1993. *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*, 106: 151-162.
- MASAKE R., MAJIWA P.A.O., MOLOO S.K., MAKAU J.M., NJUGUNA J.T., MAINA M., KABATA J., OLE-MOIYOI O.K., NANTULYA V.M., 1997. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Exp. Parasitol.*, 85: 193-205.
- MASIGA D.K., SMYTH A.J., HAYES P., BROMIDGE T.J., GIBSON W.C., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.*, 22: 909-918.
- MATTIOLI R.C., JEAN O., BELEM A.M.G., 1990. Incidence de la trypanosomose sur la faune sauvage d'un ranch de gibier au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 43 : 459-465.
- MOSER D.R., COOK G.A., OCHS D.E., BAILEY C.P., MCKANE M.R., DONELSON J.E., 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, 99: 57-66.
- MULLIS L.B., FALOONA F.A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- MURRAY A.K., 1982. Characterization of stocks of *Trypanosoma vivax*. I. Isoenzyme studies. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 76: 275-282.
- MURRAY M., MURRAY P.K., MCINTYRE W.I.M., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 71: 325-326.
- NANTULYA V.M., LINDQVIST K.J., 1989. Antigen detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasitol.*, 40: 267-272.
- NANTULYA V.M., MUSOKE A.J., RURANGIRWA F.R., SAIGAR N., MINJA S.H., 1987. Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei*. *Parasite Immunol.*, 9: 421-431.
- OLUBAYO R.O., MUGERA G.M., 1985. Pathogenesis of haemorrhages in *Trypanosoma vivax* infection in cattle I. Disseminated intravascular coagulation. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.*, 33: 211-217.
- REIFENBERG J.M., SOLANO P., BAUER B., KABORE I., CUNY G., DUVALLET G., CUISANCE D., 1997. Apport de la technique PCR pour une meilleure compréhension de l'épizootologie des trypanosomoses bovines : exemple de la zone d'aménagement pastoral de Yalé au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 50 : 14-22.
- REIFENBERG J.M., SOLANO P., DUVALLET G., CUISANCE D., SIMPSON J., CUNY G., 1997. Molecular characterization of trypanosome isolates from naturally infected domestic animals in Burkina Faso. *Vet. Parasitol.* (sous presse)
- SAIKI R.K., GELFLAND D.H., STOFFEL S., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- SIDIBE I., 1996. Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense*, agent de la trypanosomose animale : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse doct., Université Montpellier II, Montpellier, France, 81 p.
- SOLANO P., ARGIRO L., REIFENBERG J.M., YAO Y., DUVALLET G., 1995. Field application of the polymerase chain reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* in Côte d'Ivoire. *Mol. Ecol.*, 4: 781-785.
- SOLANO P., REIFENBERG J.M., AMSLER-DELAFOSSÉ S., KABORE I., CUISANCE D., DUVALLET G., 1996. Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso. *Med. vet. Entomol.*, 10: 354-358.
- STEPHEN L.E., 1966. Pig trypanosomiasis in Africa. Farnham House, United Kingdom, Commonwealth Bureau for Animal Health, p. 28-36. (Reviews Series No. 8)
- WOO P.T.K., 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta trop.*, 27: 384-386.

Reçu le 4.9.97, accepté le 2.10.97

ANNEXE 13

Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso

P. SOLANO, J. M. REIFENBERG,[†] S. AMSLER-DELAFOSSÉ,
I. KABORE, D. CUISANCE* and G. DUVALLET* CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso,
*CIRAD-EMVT, Campus de Baillarguet, Montpellier, France, and [†]CIRAD-EMVT c/o Centre ORSTOM, Montpellier, France

Abstract. Following the discovery of four cases of African human trypanosomiasis, an entomological survey was conducted along the Mouhoun river in southwest Burkina Faso to collect *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides*. Among 226 flies dissected, 4.87% (eleven individuals) were infected in midgut or proboscis, but never in the salivary glands. Polymerase chain reaction analysis was undertaken, and was able to characterize all the proboscis infections, and half of the midgut infections. Only *Trypanosoma simiae* and *T. vivax* were found in the organs of infected flies, in single or mixed-species infections. Ten more flies, negative with parasitological examination, were tested with *Trypanozoon* primers and remained negative. The epidemiological significance of the absence of *T. brucei* group infections in wild tsetse populations and the presence of *T. simiae* in *G. p. gambiensis* are discussed.

Key words. Tsetse flies, *G. p. gambiensis*, *G. tachinoides*, PCR, Burkina Faso, trypanosomes, *T. simiae*, *T. brucei*.

Introduction

In 1994, four cases of autochthonous African human trypanosomiasis (due to *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) were recorded by the Direction Provinciale de la Santé in the village of Natema, near the Mouhoun river (old denomination: Black Volta), in the southwest of Burkina Faso. Therefore an entomological survey was conducted along the Mouhoun in the area of the two adjacent villages of Sangoulema and Natema. The objective of the survey was to evaluate the tsetse challenge and to detect and characterize the trypanosomes infecting the organs of the tsetse flies (Diptera: Glossinidae). As the number of tsetse flies infected with *Trypanozoon* was generally thought to be low (Duke, 1935; Sachs *et al.*, 1980; Croft *et al.*, 1984), both classic methods and new technologies using the polymerase chain reaction (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) were used.

The classic method involves the dissection of the tsetse and trypanosomes in the infections are diagnosed at the subgenera level by examining different organs for presence of trypanosomes. Infections in the midgut alone are classified as immature subgenus *Nannomonas* Hoare or *Trypanozoon* Lühe, in the midgut and proboscis as *Nannomonas*, in the salivary glands

and the midgut as *Trypanozoon*, and in the proboscis alone as *Duttonella* Chalmers (Lloyd & Johnson, 1924).

The PCR of tsetse organs using primers specific for different trypanosome types has already proved successful in characterizing trypanosomes at the molecular level and in revealing multiple infections in single tsetse from the field (Moser *et al.*, 1989; Masiga *et al.*, 1992; Majiwa *et al.*, 1994; Solano *et al.*, 1995; McNamara *et al.*, 1995).

In order to help our understanding of the epidemiology of animal and human trypanosomiasis in this region of Burkina Faso, data on the infection rates of two species of the *Glossina palpalis* (Robineau-Desvoidy) group, *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplanck and *G. tachinoides* Westwood and on the molecular characterization of the trypanosomes they harbour, are presented.

Material and Methods

Study sites and trapping. Two entomological surveys were undertaken along the Mouhoun river near the two villages (11.6°N, 4.6°W), the first one in the rainy season (26–28 July 1994) and the second one in the dry season (31 January to 1 February 1995). A total of twenty-nine traps were set for 48 h, fifteen Vavoua traps (Laveissière & Grebaut, 1990) and fourteen biconical traps (Challier & Laveissière, 1973), and the collections were made every 24 h.

Correspondence: Dr J. M. Reifenberg, CIRAD-EMVT, c/o Centre ORSTOM, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

Table 1. Polymerase chain reaction primers used in this study.

Primers	Reference	Specificity	Amplification size product
TBR 1-2	Moser <i>et al.</i> , 1989	<i>T.brucei</i> s.l.	177
COL 1-2 (IL 0344-0345)*	Majiwa <i>et al.</i> , 1993	<i>T.congolense</i> 'savannah type'	320
TCK 1-2	Masiga <i>et al.</i> , 1992	<i>T.congolense</i> 'Kilifi type'	294
TCF 1-2	Masiga <i>et al.</i> , 1992	<i>T.congolense</i> 'Riverine-forest type'	350
TCT 1-2 (IL 0893-0892)	Majiwa <i>et al.</i> , 1993	<i>T.congolense</i> 'Tsavo type'	450
SOL 1-2 (IL 0346-0347)	Majiwa & Otieno, 1990	<i>T.simiae</i>	504
TSM 1-2	Masiga <i>et al.</i> , 1992	<i>T.simiae</i>	437
TVW 1-2	Masiga <i>et al.</i> , 1992	<i>T.vivax</i>	150
VOL 1-2	Dickin & Gibson, 1989	<i>T.vivax</i>	180

* ILRI identification number.

The first trapping captured 139 *G.palpalis gambiensis* and 35 *G.tachinoides*; the second one resulted in the capture of 63 *G.palpalis gambiensis* and 47 *G.tachinoides*.

Dissections. The tsetse were dissected and the proboscis, salivary glands and midguts were separately examined for the presence of trypanosomes. Organs from infected tsetse and from ten microscopically negative *G.palpalis gambiensis* were placed in Eppendorf tubes containing 50 µl of sterile distilled water (the proboscis and the salivary glands of each tsetse were put into a single tube, and the midgut in another). Dissecting instruments were cleaned by immersion in sodium hypochloride solution followed by rinsing with sterile distilled water after each single use.

Preparation of DNA samples. Each tube containing the organs was placed individually in a microfuge (Sigma) and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. Lysis buffer containing (Tris HCl 10 mM, pH 8.3, Proteinase K 100 µg/ml, Nonidet P40 1%) was then added to the pellet; the remaining supernatant was preserved. The samples were incubated overnight at 37°C, then proteinase K was inactivated at 95°C for 10 min (Masiga *et al.*, 1992). They were then frozen at -20°C before further handling.

Primers. Oligonucleotide primers were kindly provided by ILRI, Nairobi, Kenya, and CIRAD-EMVT Baillarguet, France (see Table 1). Note that two different couples of primers were used for *T.vivax* and also for *T.simiae*.

PCR cycling. Standard PCR amplifications were carried out in 25 µl reaction mixtures containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM each of the four desoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), primers at 100 ng/µl, DNA template and 1 unit of taq DNA Polymerase (HITAQ, Bioprobe). The reaction mixtures were overlaid with 40 µl of mineral oil to prevent evaporation, and were then placed in a thermal

cycler (Stuart Scientific, Gene Tech Apparatus). The samples were incubated at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min for thirty cycles. The synthesis reaction was continued at 72°C for 10 min and finally the temperature was decreased to 4°C. An amount of 15 µl of each amplified sample was resolved by electrophoresis in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under ultraviolet illumination.

Results

Entomological and parasitological results

When comparing the two surveys with respect to the season, the following are apparent. The number of *G.palpalis gambiensis* caught decreased between the wet and the dry season, whereas there was a slight increase in the *Glossina tachinoides* collected (see Table 2). Hence, the ratio *G.p.g./G.t.*, which was 4/1 in the wet season decreased to approximately 1.5/1 in the dry season. The infection rates of the two species were lower in the dry season than in the wet season and ranged from a minimum of 0% in *G.tachinoides* in the dry season to a maximum of 7% in *G.palpalis gambiensis* in the wet season. The mean infection rates of the two species during the two surveys were 5.7% in *G.palpalis gambiensis* and 2.9% in *G.tachinoides*.

A total of eleven tsetse (nine *G.palpalis gambiensis* and two *G.tachinoides*) were found to be infected using classical microscopic examination. Among these, seven had only midgut infection, two had midgut and proboscis infections (which would lead to *Nannomonas* identification), and two had trypanosomes only in their proboscis (*Duttonella*). None was found infected in the salivary glands.

Table 2. Entomological and parasitological results of the tsetse captured during the two surveys.

	Date	No. captured	No. dissected	No. infected	Infected (%)
<i>Glossina palpalis gambiensis</i>	July 94	139	113	8	7.07
	January 95	63	45	1	2.22
<i>Glossina tachinoides</i>	July 94	35	29	2	6.90
	January 95	47	39	0	0
Total		284	226	11	4.87

PCR results

For logistical constraints, only the tsetse flies which were found to have trypanosomes in either organ by dissection were subjected to the PCR analysis with all the primers listed in Table 1, with an exception for the primers of *Trypanozoon* which were tested on ten more (parasitologically negative) flies. Each amplification was done in duplicates to ensure reproducibility, and a positive control (with reference DNA of each trypanosome type) and a negative control (without DNA) were added in each PCR assay.

Of the eleven tsetse flies which harboured trypanosomes by classic criterion, the PCR made it possible to characterize the trypanosomes infections in six individuals (see Table 3). All the proboscis infections produced scoreable signals, whereas six midgut infections were not recognized by the set of primers used in this study. On the contrary, a midgut (fly 2) which seemed negative by parasitological examination gave a positive signal when tested with *T.simiae* primers.

Only amplifications with primers specific for *T.simiae* and *T.vivax* gave positive signals. Four tsetse were found infected with *T.vivax* in the proboscis and four flies with *T.simiae* in the midgut (one having *T.simiae* in the proboscis and the midgut). Two of these tsetse had both trypanosomes species in their organs.

All the individuals which gave a positive signal with either one of *T.simiae* or *T.vivax* primers also gave a positive signal with the second set of primers available (VOL 1–2 and TVW 1–2 for *T.vivax*, and SOL 1–2 and TSM 1–2 for *T.simiae*), except for one specimen (fly 2) which was amplified only by SOL 1–2.

All the other primers used failed to give any signal (except with the positive controls which always gave the expected amplification product), suggesting the absence of *T.congolense* of any type and *T.brucei* *s.l.* The ten parasitologically negative tsetse tested with *Trypanozoon* primers remained negative.

Table 3. Parasitological results and polymerase chain reaction characterization of the trypanosomes in infected tsetse.

Tsetse	Sp	Parasitology		PCR	
		P	M	P + SG	M
1	Gpg	+	–	<i>T.vivax</i>	–
2	Gpg	+	–	<i>T.vivax</i>	<i>T.simiae</i>
3	Gpg	+	+	<i>T.vivax</i> + <i>T.simiae</i>	<i>T.simiae</i>
4	Gpg	–	+	–	<i>T.simiae</i>
5	Gpg	–	+	–	<i>T.simiae</i>
6	Gpg	–	+	–	–
7	Gpg	–	+	–	–
8	Gpg	–	+	–	–
9	Gpg	–	+	–	–
10	Gt	–	+	–	–
11	Gt	+	+	<i>T.vivax</i>	–

P is for proboscis, SG for salivary glands, and M for midgut. For parasitological results (microscopic examination), + is noted when trypanosomes are observed in the corresponding organ, – if not. Gpg is for *Glossina palpalis gambiensis* and Gt for *Glossina tachinoides*.

Discussion

This work, as in previous studies (Majiwa *et al.*, 1994; McNamara *et al.*, 1995; Solano *et al.*, 1995; Solano & Amsler-Delaforse, 1995), shows the great power of the PCR technology in characterizing the trypanosome types infecting tsetse populations and in identifying multiple infections in single tsetse. Furthermore, new data on associations between trypanosomes and tsetse are presented, highlighting the potential vector role of *G.palpalis gambiensis* with *Nannomonas* trypanosomes in this region of Burkina Faso.

The trypanosome infection rates of the two tsetse species in this work were similar to those previously reported in West Africa for the *palpalis* group (Nash, 1948; Jordan, 1961; Ryan *et al.*, 1986; I.T.C., 1988; Gouteux *et al.*, 1993).

The fact that the flies were found more infected in the wet season than in the dry season could reflect the better ecological conditions of the wet season. Such conditions provide the tsetse with possibility of living longer, and then the ability for the trypanosomes to achieve their biological cycle (Nekpeni *et al.*, 1991), and also the ability to disperse and then be in contact with more infected hosts.

In all the probosces found infected by microscopic examination, the trypanosomes could be characterized by the PCR. *T.vivax* appeared in the four cases, but one proboscis (tsetse 3) had in addition *T.simiae*. Some infected midguts gave no amplification signal with any of the primer sets used in this study. In two of these midguts the trypanosomes were observed just at the limit between the midgut and the hindgut, suggesting the presence of *T.grayi*-like trypanosomes. This suggestion was strengthened by the various reptile fauna (crocodiles, monitor lizards, snakes) frequently seen in this area, on which tsetse of the *palpalis* group are known to feed preferentially (Jordan, 1961; D'Amico, 1993). This also appeared to be true for *G.palpalis gambiensis* in Burkina Faso (Bauer *et al.*, 1995). In the area, animals other than reptiles seemed scarce. However, for the other infected midguts which could not be characterized, the question remains of whether it could be due to inhibitors of the amplification reactions or to the presence of trypanosomes which could not be recognized by the set of primers used in this work (McNamara *et al.*, 1994; Solano *et al.*, 1995).

Despite the low number of tsetse submitted to the PCR and the preliminary characters of the results presented here, some technical factors can be mentioned.

The PCR results in this work did not show the presence of any *Trypanozoon* infection, either in the midgut nor in the proboscis of the twenty-one tsetse (eleven infected and ten parasitologically negative) tested. This might not be attributed to technical problems because such infections had already been detected in tsetse from the field in Burkina Faso (unpublished results). When compared to the numerous previous works which evaluated the trypanosome infection prevalences in the field (with classic dissection method), a constant phenomenon remained: the absence of *Trypanozoon* in the proboscis and the salivary glands of the tsetse analysed (Maudlin, 1991). Hypotheses raised on whether this phenomenon could be explained by the inadequacy of the classic parasitological methods or to some unknown aspects of the epidemiology of these trypanosomes (Jordan, 1974; Otieno, 1983; Croft *et al.*, 1984; Nekpeni *et al.*, 1991; Frezil & Cuisance, 1994). Only few

data on the *Trypanozoon* infections of *palpalis* group tsetse with the new technologies are now available (McNamara *et al.*, 1995; Masiga *et al.*, 1996). The first work addressed only the midgut infections and showed a remarkably high infection rate (46%) of *T. brucei* s.l. in *G. palpalis palpalis* in Côte d'Ivoire. The midgut and proboscis were taken in account in the second one, which showed also a high prevalence of *Trypanozoon* infections in *palpalis* group tsetse from Côte d'Ivoire by PCR. One of the decisive advances of molecular technology in characterizing trypanosomes in tsetse is the possibility of distinguishing between *T. congolense* and *T. simiae*, these trypanosomes having the same morphology and cyclical development in the tsetse, but causing very differential pathogenicity in mammals (Itard, 1981). The usefulness of being able to recognize these trypanosomes had already been emphasized by McNamara *et al.* (1989), when they found that the majority of the *Nannomonas* infections in *G. morsitans submorsitans* in The Gambia belonged to *T. simiae*. However, to our knowledge, the present work is the first where *G. palpalis gambiensis* is found infected with *T. simiae* in the field, one tsetse out of four having a mature infection. Tsetse of the *palpalis* group are often considered to be poor vectors of the *Nannomonas* subgenus trypanosomes in most of experimental or field studies (Nash & Page, 1953; Harley & Wilson, 1968; Moloo & Kutzua, 1988; Moloo *et al.*, 1992a; Dia, 1993; Reifenberg *et al.*, in prep.), especially with *T. simiae* (Roberts & Gray, 1972; Agu, 1984). So it seems that one needs to be careful when evaluating the potential vector role of *G. palpalis gambiensis* in this region. This seems particularly valuable at a time when diversification of food sources is encouraged by rearing monogastric animals (domestic suids for example). These animals are often considered to be potential reservoirs of African human trypanosomiasis (Baldry, 1980) and moreover are known to be very susceptible to *T. simiae* infections which can result in an acute disease and a rapid death (Nash, 1948; Mihok *et al.*, 1994). Families are currently rearing these animals for sale within the village of Natema. Control measures would be necessary in this situation.

It was observed that the two couples of primers specific for *T. simiae* amplified equally the organs of the four flies infected with *T. simiae*, except the midgut of tsetse 2, which gave a signal only for SOL 1–2 and not for TSM 1–2. The two couples of primers were extracted from the same satellite monomer, although the first one was synthesized from a trypanosome stock from Kenya (KETRI 2431; Majiwa & Otieno, 1990), whereas the second one came from a Gambian stock (BAN 7, Masiga *et al.*, 1992). According to the latter authors, TSM 1–2 was chosen in regions of homology between East and West African sequences in order to amplify both *T. simiae* stocks, whenever present, because SOL 1–2 failed to work on West African material. The results presented here were somehow unexpected according to this feature (keeping in mind that only one midgut displayed this apparent discrepancy). One hypothesis could be that we were faced with the natural genetic variability of *T. simiae* with a minimum of two different strains of this species, the one which amplified only SOL 1–2 being more related to East African stocks than Gambian stocks. It would be of interest to study this natural genetic variability in relation with differences in virulence (Moloo *et al.*, 1992b, (1995) or trypanocide resistance (Mihok *et al.*, 1994).

Acknowledgments

We thank P. A. O. Majiwa (ILRI Nairobi, Kenya), W. C. Gibson (TRL Bristol, U.K.), and A. Diallo (CIRAD-EMVT) for the gift of probes and primers. We are indebted to Drs S. M. Touré (Director of CIRDES Bobo Dioulasso, Burkina Faso), B. Bauer (CIRDES), I. Hastings (Edinburgh University), J. L. Frézil (ORSTOM) and G. Cuny (ORSTOM) for their help in the improvement of the manuscript. This work was funded by the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD; ATP 70/92) and the Centre International de Recherche Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES).

References

- Agu, W.L. (1984) Comparative study of the susceptibility to infection with *Trypanosoma simiae* of *Glossina morsitans* and *G. tachinoides*. *Acta Tropica*, **41**, 131–134.
- Bauer, B., Amsler-Delafosse, S., Clausen, P.H., Kabore, I. & Petrich-Bauer, J. (1995) Successful application of deltamethrin pour-on to cattle in a campaign against tsetse flies (*Glossina* spp.) in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Tropical Medicine and Parasitology*, **46**, 183–189.
- Baldry, D.A.T. (1980) Local distribution and ecology of *Glossina palpalis* and *G. tachinoides* in forest foci of West African human trypanosomiasis, with special reference to associations between peri-domestic tsetse and their hosts. *Insect Science and its Application*, **1**, 85–93.
- Challier, A. & Laveissière C. (1973) Un nouveau piège pour la capture des glossines: description et essais sur le terrain. *Cahiers ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **11**, 251–262.
- Croft, S.L., Kuzoe, F.A.S., Ryan, L. & Molyneux, D.H. (1984) Trypanosome infection rates of *Glossina* spp. in transitional forest-savanna near Bouafé, Ivory Coast. *Tropical Medicine and Parasitology*, **35**, 247–250.
- D'Amico, F. (1993) Rôle de *Glossina fuscipes fuscipes* dans la transmission des trypanosomoses bovines en Afrique centrale: le cas de la zone d'élevage d'Ouro-Djafoun (RCA). Thèse, Université Montpellier II.
- Dia, M.L. (1993) Capacité vectorielle de *Glossina fuscipes fuscipes* Newstead, 1910 au laboratoire. DEA de Parasitologie, Université de Montpellier I, France.
- Dickin, S.K. & Gibson, W.C. (1989) Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **33**, 135–142.
- Duke, H.L. (1935) On the power of *Glossina morsitans* and *Glossina palpalis* to transmit the trypanosomes of the *brucei* group. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **30**, 37–38.
- Frézil, J.L. & Cuisance, D. (1994) Trypanosomiasis, maladies d'avenir: leurs perspectives et leurs inconnues. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **87**, 391–393.
- Gouteux, J.P., Kounda Gboubi, J.C., Noutoua, L., D'Amico, F., Bailly, C. & Rongou, J.B. (1993) Man-fly contact in the Gambian trypanosomiasis focus of Nola-Bilolo (Central African Republic). *Tropical Medicine and Parasitology*, **44**, 213–218.
- Harley, J.M.B. & Wilson, A.J. (1968) Comparison between *Glossina morsitans*, *G. pallidipes* and *G. fuscipes* as vectors of trypanosomes of the *Trypanosoma congolense* group. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **30**, 178–187.
- Itard, J. (1981) Trypanosomoses animales africaines. *Précis de Parasitologie Vétérinaire Tropicale*, Vol. 2, pp. 305–468. IEMVT.

- I.T.C. (1988) Research project on the productivity of Ndama cattle in Senegambia. Third Annual Report.
- Jordan, A.M. (1961) An assessment of the economic importance of the tsetse species of southern Nigeria and the southern Cameroons based on their trypanosome infection rates and ecology. *Bulletin of Entomological Research*, 52, 431–441.
- Jordan, A.M. (1974) Recent developments in the ecology and methods of control of tsetse flies: a review. *Bulletin of Entomological Research*, 63, 361–399.
- Laveissière, C. & Grebaut, P. (1990) Recherches sur les pièges à glossines (Diptera: Glossinidae): mise au point d'un modèle économique, le piège Vavoua. *Tropical Medicine and Parasitology*, 41, 185–192.
- Lloyd, L.I. & Johnson, W.B. (1924) The trypanosome infections of tsetse flies in Northern Nigeria and a new method of estimation. *Bulletin of Entomological Research*, 14, 265.
- Majiwa, P.A.O. & Otieno, L.H. (1990) Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 40, 245–254.
- Majiwa, P.A.O., Maina, M., Waitumbi, J.N., Mihok, S. & Zwegarth, E. (1993) *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*, 106, 151–162.
- Majiwa, P.A.O., Thatthi, R., Moloo, S.K., Nyeko, J.H.P., Otieno, L.H. & Maloo, S. (1994) Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenemic but aparasitaemic cattle. *Parasitology*, 108, 313–322.
- Masiga, D.K., Smyth, A.J., Hayes, P., Bromidge, T.J. & Gibson, W.C. (1992) Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal for Parasitology*, 22, 909–918.
- Masiga, D.K., McNamara, J.J., Laveissière, C., Truc, P. & Gibson, W.C. (1996) A high prevalence of mixed trypanosome infections in tsetse flies in Sinfra, Côte d'Ivoire, detected by DNA amplification. *Parasitology*, 112, 75–80.
- Maudlin, I. (1991) Transmission of african trypanosomiasis: interactions among tsetse immune system, symbionts, and parasites. *Advances in Disease Vector Research*, Vol. 7, pp. 117–147.
- McNamara, J.J., Dukes, P., Snow, W.F. & Gibson, W.C. (1989) Use of DNA probes to identify *Trypanosoma congolense* and *T. simiae* in tsetse flies from The Gambia. *Acta Tropica*, 46, 55–61.
- McNamara, J.J., Mohammed, G. & Gibson, W.C. (1994) *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: biological and biochemical characterization. *Parasitology*, 109, 497–509.
- McNamara, J.J., Laveissière, C. & Masiga, D.K. (1995) Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Côte d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta Tropica*, 59, 85–92.
- Mihok, S., Weygarth, E., Munyoki, E.N., Wambua, J. & Kock, R. (1994) *Trypanosoma simiae* in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) and the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Veterinary Parasitology*, 53, 191–196.
- Moloo, S.K. & Kutzua, S.B. (1988) Comparative study on the infection rates of different laboratory strains of *Glossina* species by *Trypanosoma congolense*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2, 253–257.
- Moloo, S.K., Olubayo, R.O., Kabata, J.M. & Okumu, I.O. (1992a) A comparison of African buffalo, N'Dama and Boran cattle as reservoirs of *Trypanosoma congolense* for different *Glossina* species. *Medical and Veterinary Entomology*, 6, 225–230.
- Moloo, S.K., Zwegarth, E. & Sabwa, C.L. (1992b) Virulence of *Trypanosoma simiae* in pigs infected by *Glossina brevipalpis*, *G. pallidipes* or *G. morsitans centralis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86, 681–683.
- Moloo, S.K., Zwegarth, E. & Sabwa, C.L. (1995) A comparison of susceptibility to stocks of *Trypanosoma simiae* of *G. pallidipes* originating from allopatric populations in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, 9, 224–228.
- Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs, D.E., Bailey, C.P., McKane, M.R. & Donelson, J.E. (1989) Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, 99, 57–66.
- Mullis, L.B. & Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.
- Nash, T.A.M. (1948) *Tsetse Flies in British West Africa*. H.M. Stationery Office, London.
- Nash, T.A.M. & Page, W.A. (1953) The ecology of *Glossina palpalis* in Northern Nigeria. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 104, 71–169.
- Nekpeni, E.B., Eouzan, J.P. & Dagnogo, M. (1991) Infection de *Glossina palpalis palpalis* par les trypanosomes en zone forestière de Gagnoa en Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and Parasitology*, 42, 399–403.
- Otieno, L.H. (1983) Inadequacy of the dissection method of estimating trypanosome infection rates. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77, 329–330.
- Ryan, L., Küpper, W., Molyneux, D.H. & Claire, M. (1986) Relationships between geographical and dietary factors and trypanosome infection rates of tsetse flies in the field (Diptera: Glossinidae). *Entomologia Generalis*, 12, 077–081.
- Roberts, C.J. & Gray, R.A. (1972) Comparison of *Glossina morsitans submorsitans* Newst. and *G. tachinoides* West., collected and maintained under similar conditions, as vectors of *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*, *T. (N.) simiae* and *T. (Duttonella) vivax*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 66, 1.
- Sachs, R.D., Mehltz, C. & Staak, C. (1980) Host preference and trypanosome infection of three tsetse species (*Glossina palpalis*, *G. pallicera* and *G. nigrofusca*) in rain forest zones of Liberia, West Africa. *Proceedings of 10th International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Manila*, pp. 216–217.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.
- Solano, P., Argiro, L., Reifenberg, J.M., Yao, Y. & Duvallet, G. (1995) Field application of the polymerase chain reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* in Côte d'Ivoire. *Molecular Ecology*, 4, 781–785.
- Solano, P. & Amsler-Delafosse, S. (1995) *Trypanosoma congolense* chez différentes espèces de taons (Diptera: Tabanidae) au Burkina Faso. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 48, 145–146.

Accepted 1 July 1996

ANNEXE 14

Liste des abréviations

AIEA : Agence Internationale de l'Energie Atomique, Vienne, Autriche

ATP : Action Thématique Programmée du CIRAD

CATT : Card Agglutination Test for Trypanosomosis

CIRAD : Centre International de coopération en Recherche Agronomique pour le Développement

CIRDES : Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

CRTA : Centre de Recherche sur les Trypanosomoses Animales (ancien nom du CIRDES)

DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane

DFMO : DL-a-difluoromethylornithine

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EMVT : Elevage et Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux (département du CIRAD)

FAO : Food and Agriculture Organization

FITCA : Farming In Tsetse Control Areas

IAEA : International Atomic Energy Agency

IEMVT : Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux

ILRI : International Livestock Research Institute

ORSTOM (= IRD) : Institut de Recherche pour le développement

PAAT : Program Against Animal Trypanosomosis

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RLO : Rickettsia-like Organisms

RTTCP : Regional Tsetse and Trypanosomiasis Control Program

SIG : Système d'Information Géographique

SNOAPAD : Standardized Nomenclature Of Animal PArasitic Diseases

TAA : Trypanosomoses Animales Africaines

THA : Trypanosomoses Humaines Africaines

RESUME

Des marqueurs moléculaires polymorphes (ADN microsatellite) ont été développés chez une glossine (ou mouche tsé-tsé) vectrice de trypanosomoses, *Glossina palpalis gambiensis*. L'objectif était de déceler une structuration des populations au niveau intraspécifique, et de relier cette structuration à l'épidémiologie des trypanosomoses africaines.

Après s'être assuré sur des populations d'insectarium de la transmission mendélienne des allèles microsatellites, l'échantillonnage s'est porté sur les populations naturelles de ce taxon de diverses origines géographiques.

Au niveau macrogéographique, deux loci polymorphes montrent des différences génétiques importantes entre les glossines du Sénégal et celles du Burkina Faso. Ces différences impliquent aussi la taille des ailes de ces mêmes glossines, étudiée par la morphométrie grâce à un logiciel de mesures semi-automatiques (Fly Picture Measurements).

A l'échelle de la zone agro-pastorale, deux terroirs ont été retenus : Samorogouan et Sidéradougou, au Burkina Faso. Dans ces deux zones, des informations épidémiologiques ont aussi été recueillies sur les glossines capturées : densité, taux d'infection, caractérisation par PCR des trypanosomes, analyse des repas de sang. A Sidéradougou, une structuration des populations de *G. palpalis gambiensis* est mise en évidence entre l'ouest et l'est du réseau hydrographique du Koba, sur une échelle de quelques kilomètres. Le mode de transmission de la trypanosomose diffère aussi entre ces deux côtés de la zone. Sur trois loci, dans le bois de Nyarafo, il semble exister un mélange de populations génétiquement distinctes vivant en sympatrie.

L'hypothèse avancée est que la structuration des populations de cette glossine ripicole est plus liée au réseau hydrographique d'appartenance qu'à la simple distance géographique.

Ces premiers résultats acquis sur la différenciation de populations au niveau intraspécifique chez les glossines montrent l'intérêt d'étendre ce type d'études sur d'autres vecteurs de pathologies.

SUMMARY

Epidemiological consequences of genetic variability in natural populations of tsetse. Example of *Glossina palpalis* in West Africa.

In West Africa, tsetse of the subgenus *Nemorhina* (*palpalis* group) transmit trypanosomes to cattle, causing severe losses in these areas. Little is known about tsetse intraspecific variability and its consequences on the epidemiology of trypanosomosis. Three microsatellite sequences were isolated, cloned and sequenced from a CIRAD/ORSTOM insectarium sample of *Glossina palpalis gambiensis*. PCR amplification using primers derived from these microsatellite sequences showed size polymorphisms and mendelian inheritance. These loci were subsequently used for genetic studies in natural populations.

At the scale of the geographic repartition of *G. palpalis gambiensis*, flies originating from Senegal showed genetic differences with flies from Burkina Faso at two of these loci. On the same flies, significant morphometric differences were also found on the wings of the tsetse, measured by a semi-automatical package : Fly Picture Measurement.

At a smaller scale, population differentiation was investigated in a cattle-raising area in Burkina Faso. This was part of a CIRAD program which aims at identifying areas at high risk of transmission using GIS. Along the main hydrographic network of the agropastoral zone, flies were shown to be genetically structured on a scale of a few kilometers. In a particular woodland area, microsatellite polymorphism showed a mixture of genetically distinct sympatric populations.

The results led to the hypothesis that the origin of the hydrographic network could act on the structuration of these populations of this riverine species of tsetse.

This first investigation of intraspecific variability of tsetse using microsatellite DNA polymorphism is discussed regarding the epidemiology and control of African Trypanosomoses. The methodology used could be extended to other vector-borne diseases.

Mots clés : *Glossina palpalis gambiensis*
Burkina Faso

microsatellite
épidémiologie

génétique
diagnostic

303 références.