

**PROGRAMME DE RECHERCHE THEMATIQUE CNRS
ENVIRONNEMENT ET SANTE**



RAPPORT FINAL DU PROJET 96/C/08

**Analyse du polymorphisme de *Plasmodium falciparum* et
des ses vecteurs *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis* et *An.
funestus*. Rôle dans la pathogénicité du paludisme dans 2
stations du Sénégal.**

Nom du responsable scientifique : FONTENILLE Didier

Chargé de Recherche 1, laboratoire IRD de zoologie médicale à l'Institut Pasteur de Dakar, BP
1386, Dakar, Sénégal

Tél : (221) 23 48 74 Fax : (221) 23 87 72

(actuellement IRD – OCEAC, BP 288, Yaoundé, Cameroun

Tél : (237) 23 22 32 Fax : (237) 23 00 61

Collaboration :

MERCEREAU-PUIJALON Odile

Chef de laboratoire , Unité d'immunologie Moléculaire des Parasites, - URA CNRS 1960

Institut Pasteur

25 Rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15

Tél : 1 45 68 86 23 Fax : 1 40 61 31 85

PLAN DU RAPPORT

RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

RAPPEL DES OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

METHODOLOGIE

Hétérogénéité de la transmission, diversité génétique des vecteurs
Diversité génétique des *Plasmodium*

RESULTATS

1- Les espèces du complexe *An. gambiae*

2- Dynamique des populations des vecteurs et transmission des *Plasmodium* à Dielmo et Ndiop

2-1 : *La transmission du paludisme à Dielmo au Sénégal*

2-2 : *La transmission du paludisme à Ndiop au Sénégal*

3- L'hétérogénéité de la transmission

3-1 : *Hétérogénéité dans le temps*

3-2 : *Hétérogénéité géographique*

4- Polymorphisme génétique d'*Anopheles gambiae* et *An. arabiensis*

4-1 : *Sélection des loci et des populations*

4-2 : *Résultats*

4-2-1) *Collaboration à l'étude des flux de gènes sur le continent africain chez *An. gambiae**

4-2-2) *Structuration génétique d'*An. arabiensis* au Sénégal et dans les îles de l'Océan indien*

4-2-3) *Faible différenciation génétique des populations d'*An. arabiensis* de Dielmo et de Barkedji*

4-2-4) *Absence de variation de la structuration génétique d'*An. arabiensis* à Barkedji au cours du temps*

4-2-5) *Structure génétique d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* à Dielmo et Ndiop*

5- Polymorphisme génétique d'*Anopheles funestus*

5-1 : *Sélection des marqueurs et des populations*

5-2 : *Résultats*

5-2-1) *Les inversions observées au Sénégal*

5-2-2) *Variations géographiques*

5-2-3) *Variations saisonnières et annuelles à Dielmo*

6- Analyse de la diversité parasitaire à Ndiop et à Dielmo

6-1 : *Etudes transversales au cours de la saison de transmission à Ndiop*

6-2 : *Analyse comparée de la diversité parasitaire à Dielmo et à Ndiop*

6-3 : *Influence du portage de l'hémoglobine S sur les fréquences alléliques des souches hébergées*

6-4 : *Etude de la dynamique des infections en période de non transmission à Ndiop*

6-5 : *Comparaison des populations parasitaires présentes à Ndiop lors de deux saisons de transmission consécutives*

7- Diversité génétique des *Plasmodium* chez les moustiques

FORMATION DE JEUNES CHERCHEURS

CONCLUSION

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DES EQUIPES

RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

Toutes les données de biologie moléculaire et de sérologie indiquaient que *Plasmodium falciparum*, parasite du paludisme, était une espèce très polymorphe. Mais en fait, en 1994-1995, on ne savait que très peu de choses sur l'étendue réelle de la diversité des parasites qui circulaient dans un endroit donné. Ces lacunes étaient un frein évident à la mise au point d'un vaccin et au contrôle de la maladie.

Trois facteurs majeurs contribuent à la diversité parasitaire: le polymorphisme allélique, le cycle de reproduction sexuée et la variation antigénique. Les études entomologiques, épidémiologiques et de biologie moléculaire menées dans deux villages du Sénégal, Dielmo où la transmission est pérenne (Fontenille *et al.* 1997) et Ndiop, où la transmission est saisonnière, (Fontenille *et al.* 1996) ont permis de comparer en même temps la diversité des populations parasitaires et des populations vectorielles dans les deux villages et d'apprécier dans quelle mesure la transmission et donc la reproduction sexuée contribuent à la diversité des *Plasmodium*. La transmission dépend des espèces vectrices présentes, de leur dynamique de population, de leur taux d'infestation et de leur comportement trophique. Chaque espèce de vecteur est peut être elle même divisée en populations à compétence et capacité vectorielle différentes selon les espèces et/ou génotypes de *Plasmodium*.

La dynamique des infections chez l'homme dépend de l'intensité et de la durée de la transmission, mais aussi du degré d'immunité et de la susceptibilité génétique du sujet. L'issue d'une infection est très variable, depuis le portage asymptomatique jusqu'à l'accès clinique grave. Les premières études d'épidémiologie moléculaire ont mis en lumière une diversité parasitaire considérable et une proportion importante d'infections contenant plusieurs souches. A Dielmo, le nombre moyen de souches hébergées à un moment donné, ainsi que la distribution de certains allèles différent selon les groupes d'âge, refletant de façon indirecte l'immunité acquise avec l'âge (Ntoumi *et al.*, 1995; idem 1997). En saison de forte transmission on observe un renouvellement rapides des populations parasitaires détectables dans le sang périphérique (Contamin *et al.*, 1996; Daubersies *et al.*, 1996).

La complexité des infections chez l'homme, la densité parasitaire, la présence ou non de gamétocytes, la dynamique de renouvellement des parasites dans le sang périphérique sont autant de paramètres qui influent sur le cycle parasitaire et la transmission des parasites aux moustiques.

Une analyse du polymorphisme parasitaire et des facteurs qui structurent localement les populations parasitaires nécessite de prendre en compte simultanément de nombreux facteurs de l'hôte et du vecteur si l'on veut déterminer leur influence réciproque.

RAPPEL DES OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

Notre projet a pour but de comparer la dynamique des populations parasites et des populations de vecteurs dans deux conditions épidémiologiques bien définies, différant par l'intensité et la durée de la transmission.

Le premier objectif est d'améliorer notre connaissance des espèces et populations vectrices, ainsi que celle des transferts de gènes parmi ces populations.

Le second objectif est de rechercher le lien qui existe entre l'intensité, la nature de la transmission et l'étendue de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* observé chez les sujets symptomatiques ou asymptomatiques.

Le troisième objectif est de mieux définir le rôle du fonds génétique humain, et surtout du type d'hémoglobine, sur la distribution allélique de *P. falciparum*.

Le quatrième objectif est de corrélérer les résultats obtenus de l'étude de la génétique des populations de *P. falciparum* avec ceux obtenus par l'étude de la génétique des populations de vecteurs, afin de déterminer si certaines espèces ou populations de vecteurs transmettent préférentiellement certaines populations de *P. falciparum*.

Hétérogénéité de la transmission, diversité génétique des vecteurs

Captures des anophèles

Les anophèles ont été capturés selon le protocole prévu, par deux méthodes:

- 1) Sur des volontaires capturant les moustiques venant se gorger sur eux.
- 2) Par des pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides à base de pyréthre.

Les anophèles ont été identifiés à la loupe au niveau du complexe d'espèce. Selon les espèces, les études suivantes ont été entreprises à Dakar.

Détermination des taux d'infestation : Elisa CSP

La recherche du taux d'infestation (indice circumsporozoïtique) a été faite par un test Elisa permettant la détermination de l'espèce plasmodiale observée.

Détermination des préférences trophiques : Elisa repas de sang

Les repas de sang des moustiques ont été prélevés chaque mois et traités au laboratoire par une technique Elisa, afin d'identifier l'espèce de vertébré piqué.

Détermination des espèces du complexe *An. gambiae* : rDNA PCR

Le complexe *An. gambiae* est constitué de 6 espèces jumelles dont 3 sont présentes au Sénégal et dans notre zone d'étude : *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*.

L'identification s'est faite par PCR, sur un échantillon des moustiques capturés lors des captures hebdomadaires et mensuelles.

Génétique des populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* : PCR microsatellites

Neuf marqueurs microsatellites di-nucléotides polymorphiques, dont les séquences ont été publiées dans la littérature, ont été utilisés pour les PCR. La migration des produits d'amplification s'est faite sur gel d'acrylamide non dénaturant. La révélation se fait par coloration au nitrate d'argent. Les différents allèles observés sont répertoriés, et pour chaque population le taux d'hétérozygote, le nombre d'allèles par locus et les fréquences alléliques sont répertoriés. Des populations géographiques du Sénégal, des populations de différentes années d'une même station et des "populations comportementales" (différences de comportement trophique et/ou de taux d'infestation) sont comparées.

Génétique des populations d'*An. funestus* : cytogénétique

La cytogénétique des chromosomes polyténiques des cellules trophocytaires de l'ovocyte des femelles semi-gravidés a été faite par l'analyse des inversions chromosomiques. Les femelles sont capturées par pyrhétraie dans l'après-midi. Après dissection, les ovaires sont conservés au froid dans du liquide de Carnoy puis les squashes colorés de chromosomes polyténiques sont lus au microscope à contraste de phase.

Cette technique permet la comparaison de populations géographiques et de "populations comportementales" (différences de comportement trophiques et/ou de taux d'infestation).

Analyse des résultats de génétique des populations

L'analyse des résultats a été faite selon les méthodes classiques de génétique des populations par l'étude des fréquences alléliques, de l'hétérozygotie et du nombre d'allèles par locus, grâce au programme BIOSYS-1 (Swofford & Selander 1989). Les tests de conformité à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et de déséquilibre de liaison entre loci ont été réalisés avec le logiciel GENEPOP version 3.1 (Raymond & Rousset 1995). Le degré de différenciation génétique entre populations a été estimé par l'index de fixation : F_{st} et R_{st} calculés selon Weir & Cockerham 1984, estimations générées par GENEPOP 3.1.

Références concernant la méthodologie en entomologie.

- Beier, J. C., Perkins, P. V., Wirtz, R. A., Koros, J., Diggs, D., Gargan, T. P. II & Koech, D. K. (1988). Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Journal of Medical Entomology*, **25**, 9-16.
- Boccolini, D., Sagnon, N. & Touré, Y.T. (1998). Chromosomal polymorphism in *Anopheles funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia*, **40**, Supplement 1, p14.
- Burkot, T. R., Williams, J. L. & Schneider, I. (1984). Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **33**, 783-788.
- Fontenille, D., Faye, O., Konate, L., Sy, N. & Collins, F. H. (1993). Comparaison des techniques PCR et cytogénétique pour la détermination des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Sénégal. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **68**, 239-240.
- Gillies, M. T. & Coetzee, M. (1987). A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara. Johannesburg: South African Institute of Medical Research.
- Gillies, M. T. & De Meillon, B. (1968). The Anophelinae of Africa south of the Sahara. 2nd ed. Johannesburg: South African Institute of Medical Research.
- Green, C.A. & Hunt, R.H. (1980). Interpretation of variation in ovarian polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *Anopheles parensis* Gillies and *Anopheles aruni*? *Genetica*, **51**, 87-195.
- Lehmann T, Hawley WA and Collins FH, 1996a. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics* **144**: 1155-1163.
- Lehmann T, Hawley WA, Kamau L, Fontenille D, Simard F and Collins FH, 1996b. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: a comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity* **77**: 192-208.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995a). GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995b). An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280-1283.
- Scott, J. A., Brogdon, W. G. & Collins, F. H. (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**, 520-529.

II. Diversité génétique des *Plasmodium*

Stratégie d'analyse

La stratégie retenue est de procéder au typage des parasites sanguins à l'aide de techniques de PCR. Le typage par PCR présente l'avantage d'une grande sensibilité et d'une excellente spécificité. Il permet en particulier d'analyser les parasites sanguins des porteurs asymptomatiques, qui hébergent de très faibles charges parasitaires.

Les techniques développées au laboratoire ciblent des gènes à copie unique contenant des domaines polymorphes flanqués par des domaines très bien conservés dans toutes les souches où ils ont été étudiés. Les gènes retenus codent pour des antigènes du mérozoïte et présentent un polymorphisme allélique remarquablement étendu. Bien que le rôle biologique précis de ces antigènes soit encore inconnu, il est vraisemblable qu'ils ont une fonction importante dans l'interface parasite/homme.

Le gène *msp-1*, localisé sur le chromosome 9, code pour un antigène majeur de surface du mérozoïte. Les données de la littérature indiquent que le domaine variable localisé près de l'extrémité 5' du gène, appelé bloc 2, est particulièrement polymorphe (Miller *et al.*, (1993). L'amplification des séquences du bloc 2 est utilisée pour le typage (Contamin *et al.*, 1995). Les allèles *msp-1* sont classés en 3 grandes familles alléliques: K1, MAD20 et RO33. Les allèles MAD 20 et K1 présentent un polymorphisme de type mini-satellite, alors que les allèles R033 diffèrent essentiellement par des mutations ponctuelles (Miller *et al.*, (1993).

Le gène *msp-2*, localisé sur le chromosome 2, code également pour un antigène de la surface du mérozoïte. Ce gène est composé d'une région centrale codant pour des motifs répétitifs polymorphes, encadrée par deux domaines très conservés. Les divers allèles sont regroupés en deux familles alléliques, FC27 et 3D7, qui diffèrent complètement dans la séquence du domaine central répétitif (Fenton *et al.*, 1991). C'est ce domaine qui est analysé pour le typage (Contamin *et al.*, 1995).

Le gène *glurp*, localisé sur le chromosome 10, code pour un antigène de la vacuole parasitophore. C'est un antigène qui contient des séries de répétitions riches en acide glutamique. Il a été décrit dans la littérature un polymorphisme portant sur le nombre de répétitions (Borre *et al.*, 1991). La réaction de typage utilisée ici met à profit ce polymorphisme (Viriyakosol *et al.*, 1995; Contamin *et al.*, 1995).

Références concernant la méthodologie pour l'étude des parasites.

Borre, M.B., Dziegiel, M., Hogg, B., Petersen, E., Rieneck, K., Riley, E., Meis, J.F., Aikawa, M., Nakamura, K., Harada, M., Wind, A., Jakobsen, P.H., Cowland, J., Jepsen, S., Axelsen, N.H. and Vuust, J. (1991). Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein

(GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 49, 119-132.

Contamin H., Fandeur T., Bonnefoy S., Skouri F., Ntouni F., Mercereau-Puijalon O. PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum* J. Clin. Microbiol. 33, 944-951, 1995.

Fenton, B., Clark, J., Khan, C.M., Robinson, J., Walliker, D., Ridley, R., Scaife, J. and McBride, J. (1991). Structural and antigenic polymorphism of the 35-kilodalton to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSP-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Biology*. 11, 963-971.

Miller, L.H., Roberts, T., Shahabuddin, M. and McCutchan, T.F. (1993). Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol*. 59, 1, 1-14.

Viriyakosol, S., Siripoon, N., Petcharapirat, C., Petcharapirat, P., Jarra, W., Thaitong, S., Brown, K.N. and Snounou, G. (1995). Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ*. 73, 1, 85-95.

Les références du groupe de recherche impliqué dans le projet sont à la fin

Mise au point des nested PCR

Pour ce projet, nous avons dû retravailler les conditions de PCR, qui n'étaient pas adaptées aux prélèvements de porteurs asymptomatiques de Ndiop, dont au moins 50% hébergent de très faibles densités parasitaires.

- Nous avons modifié les conditions de "nested PCR" pour les loci *msp-1* et *msp-2*. Les réactions primaires sont réalisées à l'aide d'amorces externes conservées; les réactions secondaires sont réalisées à l'aide d'amorces spécifiques de chaque famille allélique. Nous avons réalisé 9 réactions secondaires pour le locus *msp-1* (3 familles alléliques et les 6 hybrides potentiels) et 4 réactions secondaires pour le locus *msp-2* (2 familles alléliques et les 2 hybrides potentiels). Nous avons validé cette méthode en effectuant en parallèle le typage par PCR secondaire avec les amorces spécifiques des familles alléliques et le typage par amplification secondaire avec des amorces conservées suivie d'hybridation avec des sondes spécifiques des familles alléliques,
- Nous avons établi les conditions de "nested PCR" pour le locus *glurp*.

Les divers allèles sont classés selon leur taille pour les 3 loci et dans le cas de *msp-1* et de *msp-2* selon leur appartenance à une famille allélique donnée. Ces techniques sont décrites dans Zwetyenga *et al* (1998).

Analyse de la diversité génétique des souches parasitaires chez l'homme

Ce volet du projet a été réalisé dans les villages de Dielmo et Ndiop, mettant à profit les prélèvements capillaires mensuels (conservés congelés) effectués dans le cadre du protocole de suivi longitudinal des habitants des deux villages. Le protocole est approuvé par les autorités sénégalaises et a obtenu les autorisations éthiques et le consentement éclairé des villageois. Le suivi comprend des visites quotidiennes à domicile, accompagnées de questionnaire sur l'état de santé des villageois et la prise éventuelle de médicaments. Tout épisode clinique est

immédiatement traité et l'efficacité des traitements vérifiée grâce à la présence permanente de personnel de santé (médecin et infirmiers enquêteurs) dans chacun des deux villages (Trape *et al* 1994). Rappelons qu'à Dielmo la transmission est perenne et intense, alors qu'elle est modérée et saisonnière à Ndiop.

Le nombre total d'accès palustres au cours d'une vie n'est pas différent dans les 2 villages, mais ce qui diffère d'un village à l'autre c'est le nombre d'accès palustres par an et l'incidence en fonction de l'âge. La cinétique d'acquisition de l'immunité est donc différente dans les 2 villages, suggérant qu'elle dépend de la transmission. La base de données permet d'effectuer une analyse d'une grande précision, intégrant de nombreux facteurs susceptibles d'intervenir dans la relation hôte/parasite.

Les ADN sont préparés à partir de prélèvements capillaires mensuels, obtenus lors du suivi systématique des villageois. L'ADN est préparé après traitement par la protéinase K et extraction au phénol/chloroforme à partir d'environ 50 microlitres de globules rouges. Après précipitation à l'éthanol l'ADN est resuspendu dans l'eau distillée et conservé à -20°C .

Les ADN de 5 analyses transversales à Ndiop et de deux analyses transversales à Dielmo ont été étudiés de cette façon.

Diversité génétique des *Plasmodium* chez les moustiques

La mise au point méthodologique a pris du retard. Les conditions de PCR établies pour les prélèvements sanguins ne permettent pas l'amplification à partir d'échantillons de glandes salivaires. Une technique a été publiée, qui n'a pas pu être établie à Dakar, les PCR ne fonctionnant toujours pas dans ces conditions, même en "contaminant" les ADN extraits à partir du moustique par de l'ADN contrôle provenant de cultures de *P. falciparum* en sang humain. Une analyse systématique des facteurs potentiels d'interférence avec la PCR n'a pas pu être réalisée.

RESULTATS

1- Les espèces du complexe *An. gambiae*

- La PCR et le complexe *An. gambiae*

Jusqu'aux années 1990, la détermination des 6 espèces jumelles du complexe *An. gambiae* (maintenant 7, Hunt *et al.* (1998). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 231-235) se faisait essentiellement par l'analyse des inversions des chromosomes polyténiques des cellules trophocytaires des ovaires des femelles semi-gravides. En 1990 une technique PCR a été développée par l'équipe de F. Collins, aux USA, qui permet d'identifier facilement les 6 espèces (figure 1). Dès 1991, nous avons introduit cette technique au Sénégal et validée par rapport à la technique cytogénétique de référence.

L'intérêt majeur de la technique PCR est l'identification de tous les *Anopheles* du complexe *gambiae* capturés, et ce seulement à partir des pattes, contrairement à l'étude cytogénétique qui nécessite d'avoir des femelles semi-gravides et une grande expérience pour l'interprétation.

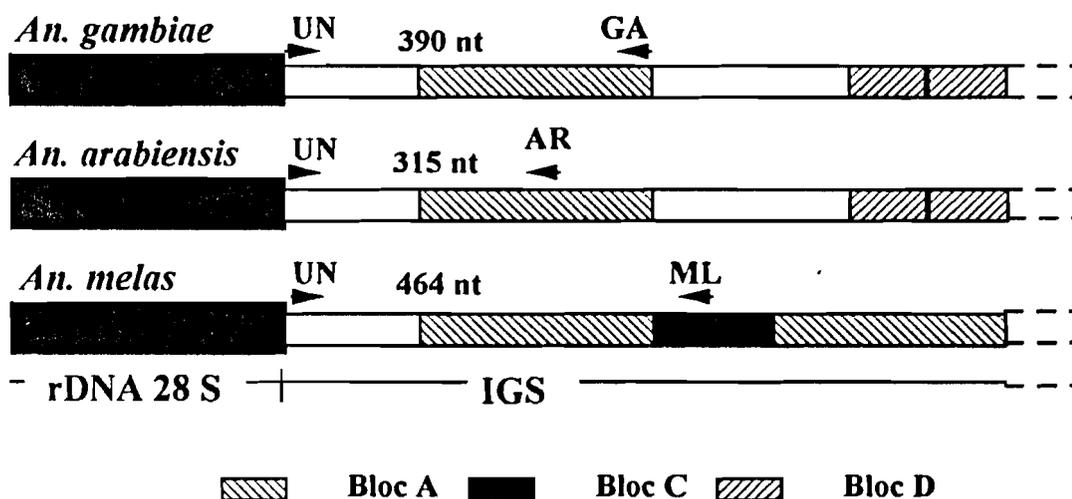


Figure 1 : emplacement des amorces spécifiques des espèces du complexe *An. gambiae*

La PCR, alliée aux techniques classiques de l'entomologie médicale (dissection, ELISA), permet de préciser quels vecteurs transmettent quels *Plasmodium*, où, quand et à quel taux ils transmettent. La technique PCR pour *An. gambiae* est maintenant utilisée en routine pour l'ensemble des études entomologiques réalisées au Sénégal, mais également dans d'autres pays africains avec lesquels nos équipes collaborent.

Trois espèces de ce complexe ont été signalées au Sénégal: *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. melas*. Nous avons identifié plusieurs milliers d'anophèles de différentes régions du

Sénégal : Vallée du Fleuve Sénégal, Ferlo (Barkedji), Dakar, Sine (Niakhar), Saloum (Dielmo, Ndiop, Djifer), Sénégal oriental (Wassadou, Bandafassi), Casamance (Mlomp),

Au Sénégal, *An. arabiensis* est le moustique du complexe le plus abondant dans la partie Nord du pays, alors qu'il se raréfie dans le Sud, contrairement à *An. gambiae*. *An. melas* est par place abondant dans le Saloum.

2- Dynamique des populations des vecteurs et transmission des *Plasmodium* à Dielmo et Ndiop

Les 3 vecteurs majeurs du paludisme (*An. funestus*, *An. gambiae*, *An. arabiensis*) ont été retrouvés dans les deux stations.

2-1 : La transmission du paludisme à Dielmo au Sénégal

Ce village de 250 habitants avait été sélectionné dès 1990 en raison d'une transmission continue et du niveau holoendémique du paludisme. La première étape de notre travail a consisté à mettre au point, pour nos conditions de terrain et de laboratoire, les outils que nous voulions utiliser: ELISA CSP et repas de sang, PCR. Ces techniques n'étaient jusqu'alors pas utilisées à Dakar.

De janvier 1992 à mars 1997, 31 815 vecteurs ont été capturés, identifiés et testés à Dielmo. Ce programme a permis de démontrer le rôle joué par chacune des espèces dans la transmission au cours du temps. De très grandes différences ont été observées selon les années. *An. funestus* peut être l'espèce la plus abondante ou au contraire la moins fréquente. Dans l'ensemble *An. arabiensis* est l'espèce la plus capturée (Figure 2).

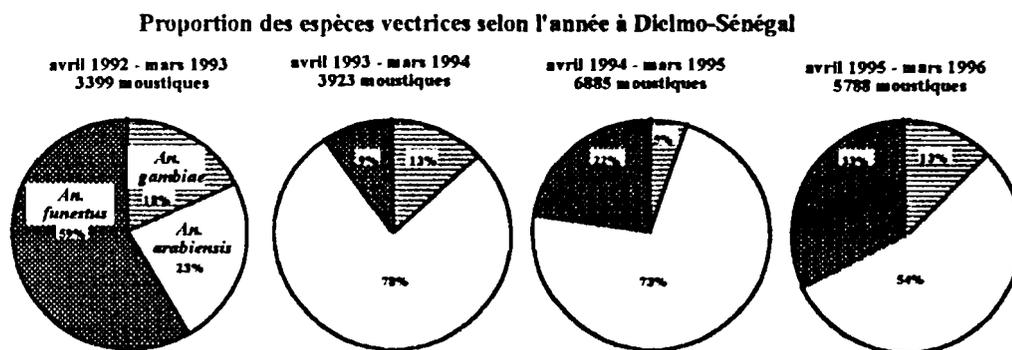


Figure 2

Le taux d'agressivité, l'espèce vectrice préférentielle, le nombre de piqûres infestées reçues par habitant par mois, ont considérablement variés au cours de chaque année et d'une année sur l'autre (Figure 3). Pendant le suivi réalisé d'avril 1992 à mars 1995, *Plasmodium falciparum* a été

retrouvé dans 92% des moustiques positifs, *P. malariae* dans 7,3% et *P. ovale* dans 1,7%. Pour la même période, l'indice circumsporozoitique moyen d'*An. gambiae* était de 1,46%, celui d'*An. arabiensis* de 0,6% et celui d'*An. funestus* de 2,62%. D'avril 1992 à mars 1995, *An. gambiae* a assuré 11,6% de la transmission, *An. arabiensis* 36,2% et *An. funestus* 52,2%, alors que chacune de ces espèces représentait respectivement 10,5%, 62,3% et 27,2% des moustiques capturés sur homme. Le nombre moyen de piqûres infectées par homme par an (du 1er janvier au 31 décembre) mesuré en ELISA (donc surévalué d'environ un facteur 1,5) a été de 348 en 1991, 230 en 1992, 115 en 1993, 157 en 1994, 263 en 1995, 304 en 1996 (moyenne annuelle: 236).

La prise en considération de cette hétérogénéité de la transmission est essentielle pour la compréhension des variations des paramètres parasitologiques, cliniques et immunologiques, observées chez les habitants de Dielmo, pendant la même période. La connaissance de l'intensité et de la cinétique de la transmission est également indispensable pour analyser les données sur le polymorphisme génétique des *Plasmodium*.

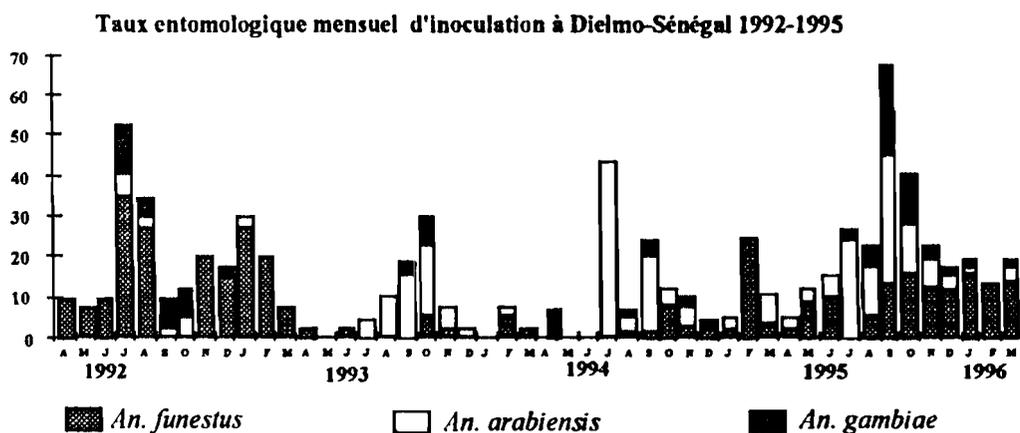


Figure 3

Ce travail a été mené en étroite collaboration avec le laboratoire de paludologie de l'IRD (ex Orstom) et d'épidémiologie de l'Institut Pasteur de Dakar (J.F. Trape, C. Rogier, A. Spiegel, N. Diagne, C. Sokhna).

Afin de corréler le mieux possible la transmission avec la survenue des accès palustres le suivi entomologique est passé, en 1996, de mensuel à hebdomadaire (Figure 4).

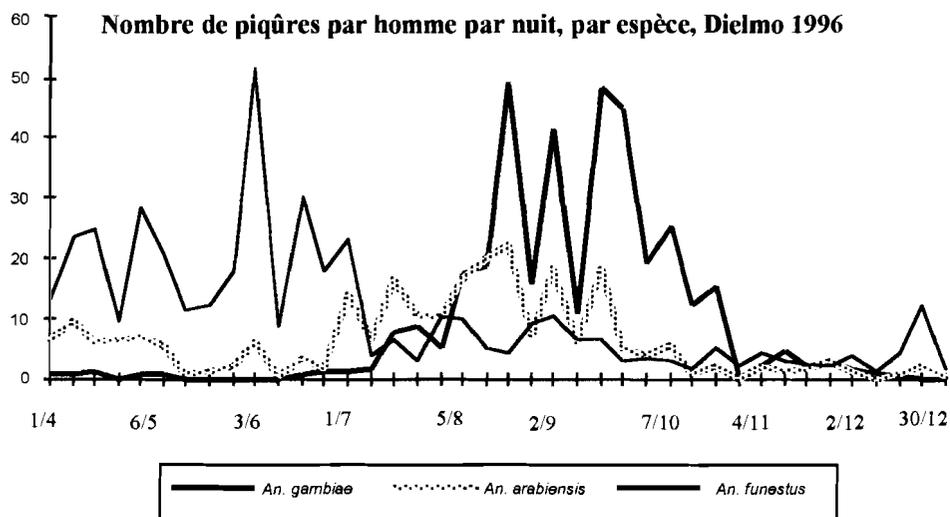


Figure 4

Le nombre de femelles capturées pour chaque espèce varie très fortement d'une semaine à l'autre. Ainsi en août et septembre 1996, alors que les densités d'*An. funestus* ont peu variés, les densités d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* ont subi des fluctuations très importantes, probablement liées à des émergences. L'année 1996 montre très clairement les différences entre les espèces vectrices. *An. funestus* a été très abondant en saison sèche et a été responsable d'une transmission très élevée (Figure 5), *An. gambiae* était très abondant en saison des pluies, alors qu'*An. arabiensis* est resté présent toute l'année, à des densités faibles, avec un pic en saison des pluies.

Nombre de piqûres par homme par nuit (ma) et taux hebdomadaire d'inoculation (h) par espèce plasmodiale. Dielmo 1996

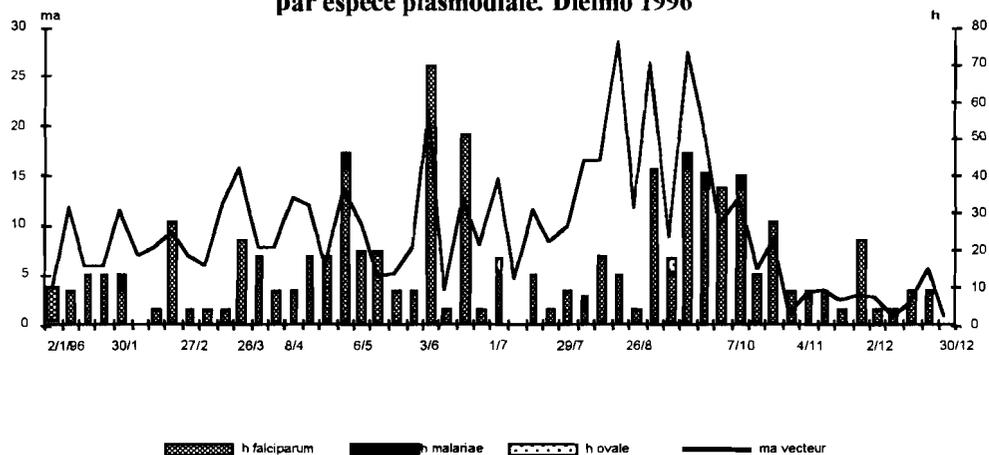
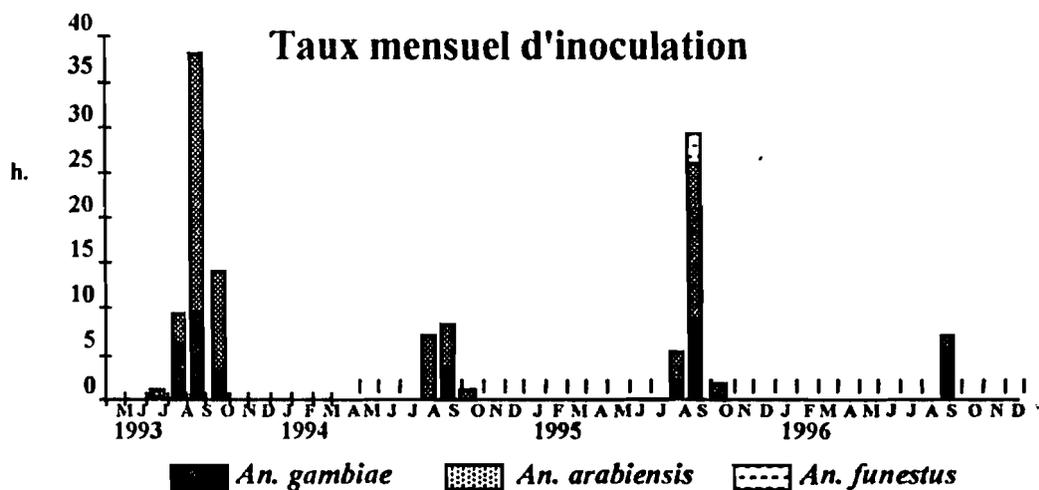
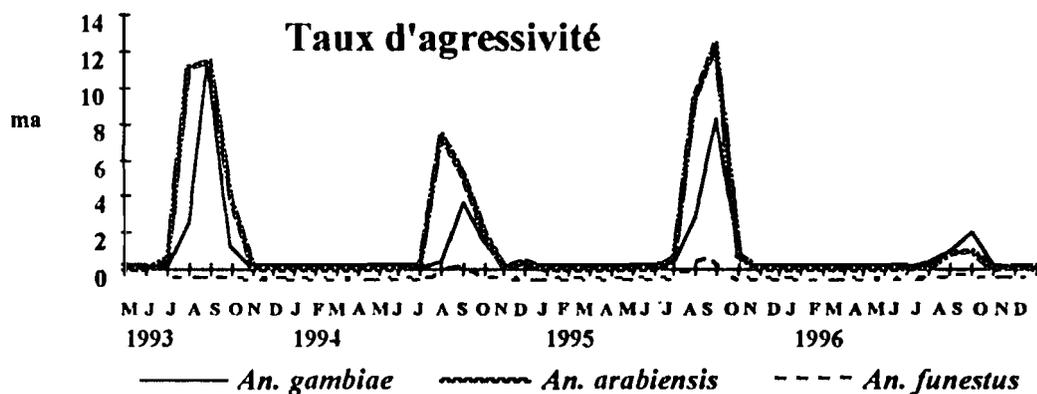
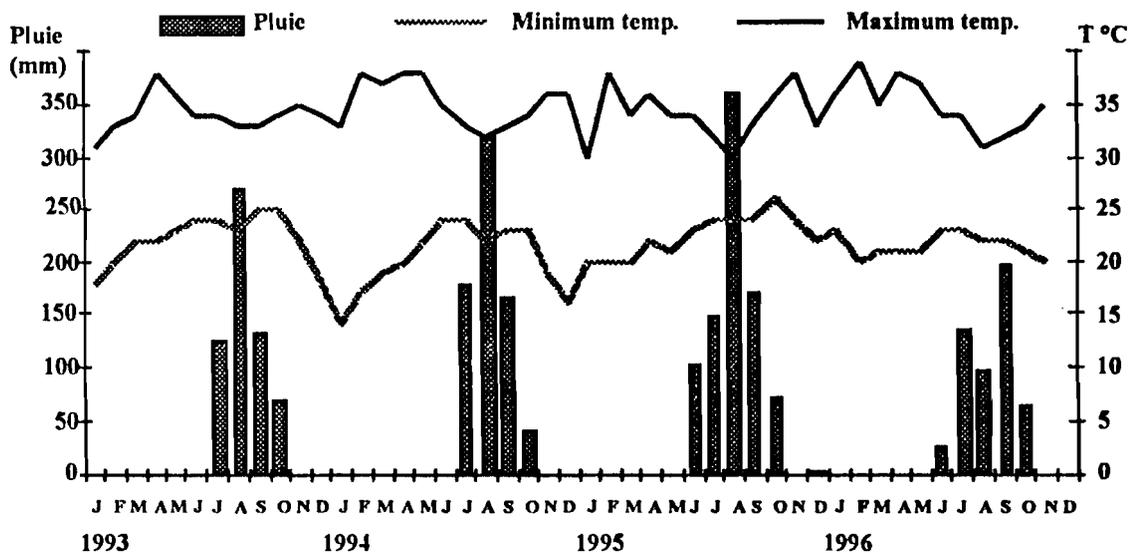


Figure 5

2-2 : La transmission du paludisme à Ndiop au Sénégal

Cette station proche de Dielmo a été sélectionnée en 1992 pour son niveau de transmission plus faible et discontinu. D'avril 1993 à mars 1997, 2 602 vecteurs ont été capturés, identifiés et testés à Ndiop. Parmi les moustiques capturés sur homme, 64% étaient *An. arabiensis*, 33% *An. gambiae*, 2,9% *An. funestus* et 0,1% *An. melas*. La quasi-absence d'*An. melas* s'explique par l'éloignement des gîtes d'eau saumâtre. De même, il n'y a pas de gîtes à végétation élevée, favorables à *An. funestus*, autour de Ndiop. La transmission est très nettement saisonnière, avec un pic chaque année en septembre (Figure 6). Sur les 4 ans d'étude, l'indice circumsporozoïtique d'*An. gambiae* était 3,2% et celui d'*An. arabiensis* 3,7%. Au total 86,5% des *Plasmodium* identifiés chez les moustiques étaient *P. falciparum*, 8,1% *P. malariae* et 5,4% *P. ovale*. Pour les 4 ans d'étude le taux moyen d'inoculation entomologique a été de 31 piqûres infectées par homme par an, avec des variations très importantes selon l'année (63, 17, 37 et 7 respectivement pour 1993, 1994, 1995 et 1996). *An. arabiensis* a été responsable de 66% de la transmission totale, *An. gambiae* de 31% et *An. funestus* de 3%.

Comme à Dielmo, nos études sur la transmission ont été le support à des études cliniques, épidémiologiques et génétiques.



Pluviométrie, température, taux d'agressivité et taux annuel d'inoculation entomologique (calculé par Elisa) pour chaque espèce de vecteur de mai 1993 à décembre 1996 à Ndiop, Senegal.

Figure 6

3 - L'hétérogénéité de la transmission

3-1 : Hétérogénéité dans le temps

Quelles que soit les zones étudiées, la transmission est variable dans le temps. Cette hétérogénéité se retrouve à différents niveaux :

(1) - Variations au cours de l'année.

Soit la transmission est saisonnière (Ndiop), et les pics de transmission sont atteints en fin de saison des pluies. Soit la transmission est continue, et elle dépend de la succession des espèces vectrices: *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus* à Dielmo. A Dielmo, par exemple, la transmission peut être très élevée (30 piqûres infectées par homme par mois) en saison sèche si *An. funestus* est abondant. Ces variations ont très probablement des implications sur le polymorphisme génétique des *Plasmodium* et donc sur l'acquisition de l'immunité.

(2) - Variations inter-annuelles.

Le niveau de la transmission au cours d'années successives peut être très différent (Tableau 1). A Dielmo, sur 6 années d'étude la transmission a varié d'un facteur 3 (de 115 à 348 piqûres infestantes par homme par an). A Ndiop, la transmission a varié d'un facteur 9 (de 7 à 63 piqûres infestantes par homme par an). A Dielmo, la part prise par chaque vecteur dans la transmission a été très différente selon les années. Certaines années (1992, 1996) *An. funestus* a été le vecteur majeur, d'autres années c'est *An. arabiensis*.

	DIELMO	NDIOP	Rapport Dielmo sur Ndiop
1991	348	-	
1992	230	-	
1993	115	63	1,8
1994	157	17	9,2
1995	263	37	7,1
1996	304	7	43,4
Moyenne	236	31	7,6

Tableau 1 : Taux annuels d'inoculation à Dielmo et Ndiop, Sénégal.

Ces variations intra et inter-annuelles démontrent clairement l'intérêt des études longitudinales sur de longues périodes de temps. Dans des études visant à comprendre les mécanismes d'acquisition de l'immunité, la connaissance et la prise en compte de telles variations sont essentielles.

3-2 : Hétérogénéité géographique

(1)- Dielmo et Ndiop

Les villages de Dielmo et de Ndiop sont distants de seulement 5 km mais le type de transmission y est très différent. Selon les années les habitants de Dielmo reçoivent de 2 à 43 fois plus de piqûres infectantes par an que ceux de Ndiop (Tableau 1). Ces différences observées sur de si faibles distances sont évidemment liées à l'environnement. A Dielmo il existe des gîtes larvaires permanents, alors qu'ils sont liés aux pluies à Ndiop.

(2) - A l'intérieur d'un même village.

Avec l'aide de C. Rogier et A. Spiegel, épidémiologistes de l'Institut Pasteur de Dakar, nous avons entrepris une analyse de la répartition des vecteurs dans le village de **Dielmo** au Sénégal. L'analyse multivariée, après réduction de la surdispersion, permet d'évaluer l'importance des variables du milieu (en particulier concernant les habitations) dans l'attraction des moustiques. Cette étude a confirmée ce que l'expérience du terrain suggérait. Les facteurs attractifs des moustiques sont entre autres : un toit de chaume, plutôt que de tôle, des ouvertures dans les murs, un nombre élevé de dormeurs par chambre. Notre étude n'a permis d'expliquer qu'une partie de la surdispersion, suggérant d'autres variables non mises en évidence. Ces variations ont très probablement des répercussions sur le polymorphisme allélique et le cycle de reproduction sexuée des *Plasmodium* transmis.

4- Polymorphisme génétique d'*Anopheles gambiae* et *An. arabiensis*

(participation de Frédéric Simard et Mathurin Diatta, thésards).

Le complexe *An. gambiae* est relativement bien connu entre autre grâce aux travaux pionniers de Davidson, 1962, Chauvet *et al* 1969, White, 1972, Hunt 1973, Coluzzi *et al.*, 1979. Ce complexe est composé de 6 espèces (peut être 7 (Hunt *et al.* 1998)). Les études sur la génétique d'*An. gambiae* sont très avancées.

L'espèce *An. gambiae* elle même, se subdivise en différents cytotypes (forest, savanna, mopti, bamako, bissau), dont la répartition dépend de l'environnement (climat, nature des gîtes larvaires) (Toure *et al.* 1994). Certains cytotypes sont maintenant différenciables par une RFLP-PCR (Favia *et al.* 1997).

Des études sur le polymorphisme isoenzymatique des espèces du complexe *An. gambiae* ont montré, au Burkina Faso (ou plusieurs cytotypes sont sympatriques), et au Burundi (cytotype Savanna) une forte structuration des populations, au point de pouvoir différencier les populations endophages des populations exophages dans un même village, (Smits *et al.* 1996, Coosemans *et al.* 1998).

Des marqueurs microsatellites, préalablement identifiés à des fins de cartographie du génome (Zheng *et al.* 1996), ont fourni un outil remarquable pour l'étude de la structuration génétique des populations (Lehmann *et al.* 1996, Lanzaro *et al.* 1998).

An. arabiensis, un autre membre du complexe, également excellent vecteur, a indirectement bénéficié de ces recherches puisque la majorité des séquences microsatellites identifiées sur *An. gambiae* sont également présentes chez *An. arabiensis* (Simard *et al.* 1996, 1999, 2000). Une grande attention doit être portée à ce vecteur car il est souvent responsable de la transmission dans des zones de paludisme instable. A ce titre une diminution des densités vectorielles peut entraîner une diminution importante de la prévalence palustre, contrairement à ce qu'on observe dans des régions où le taux entomologique d'inoculation est très élevé.

Les études utilisant des marqueurs microsatellites ont montré, chez *An. gambiae*, que la discontinuité géographique était un facteur majeur de la différenciation génétique. Des populations d'*An. gambiae* cytotype Savanna, présenteraient plus de différences entre deux régions du Kenya séparées par la vallée du Rift (Kamau *et al.* 1998) qu'entre des populations en continuité géographique entre le Sénégal et l'ouest du Kenya (Lehmann *et al.* 1996). En revanche pour une même région des différences importantes dans la structure des populations peuvent être observées entre différents cytotypes, particulièrement si les marqueurs microsatellites testés sont localisés sur le chromosome 2 présentant les inversions discriminantes (Lanzaro *et al.* 1998).

Nos études ont porté sur ces deux espèces, avec un intérêt particulier pour *An. arabiensis*, au niveau micro et macrogéographique.

4-1 : Sélection des loci et des populations

Sélection des loci :

30 loci microsatellites (dinucléotides) ont été testés au laboratoire sur *An. gambiae* et *An. arabiensis*. 9 loci ont été sélectionnés pour les études de génétique des populations sur la base d'une bonne différenciation des membres du complexe *An. gambiae* s.l. et d'un polymorphisme suffisant (mais pas trop élevé).

Sélection des populations :

La variabilité génétique est analysée au niveau des espèces *An. gambiae* et *An. arabiensis* entre des populations:

- séparées par de grandes distances sur le continent africain en comparant des moustiques du Sénégal et du Kenya,

- séparées par des zones défavorables au déplacement des moustiques (mers et océans) en comparant des moustiques du Sénégal et ceux prélevés sur les îles de la Réunion, Maurice et Madagascar ,
- à l'échelle microgéographique, entre les différentes populations présentes au Sénégal, le long d'un transect Nord-Sud (Barkedji dans la vallée du Ferlo, Dielmo, Ndiop),
- entre les différentes populations présentes au Sénégal en un même lieu (Dielmo, Ndiop, Barkedji), en début et en fin de saison des pluies et d'une année sur l'autre. Bien qu'éloignée de Ndiop et de Dielmo, la station de Barkedji a également été sélectionnée en raison de son isolement géographique et du caractère temporaire de la transmission. L'étude des variations de la fréquence allélique dans le temps trouve également son application dans les zones à transmission discontinue (alternance saison sèche / saison des pluies avec présence uniquement de gîtes temporaires) dans la mesure où elle pourra apporter des éléments sur le devenir des moustiques en saison sèche.
- entre les différentes populations présentes au Sénégal en un même lieu (Dielmo, Ndiop), en fonction de leur préférences trophiques (« populations » gorgées sur homme ou sur bœuf) et des taux d'infestation (« populations » CSP positives et CSP négatives)

4-2 : Résultats

4-2-1 : Collaboration à l'étude des flux de gènes sur le continent africain chez *An. gambiae* :

Nous avons testé les loci microsatellites sélectionnés par T. Lehmann du CDC sur nos anophèles puis nous lui avons fait parvenir des *An. gambiae*, cytotype Savanna, prélevés à Barkedji pendant le mois d'octobre 1995 afin de les comparer aux anophèles d'Afrique de l'Est. Le but de ce travail était de comparer les résultats obtenus sur cinq loci microsatellites, avec de précédents résultats obtenus sur six loci isoenzymes concernant des localisations adjacentes (Miles 1978). Il a été suggéré que certaines forces telles qu'un taux de mutation biaisé (Garza *et al.* 1995) ou la sélection agissant sur la taille des allèles (Epplen *et al.* 1993) imposent des contraintes aux loci microsatellites. Si de telles forces agissent sur un ou plusieurs loci, l'utilisation de ces loci dans une étude de génétique des populations conduira forcément à des résultats erronés avec sous-estimation de la différenciation entre sous-populations et surestimation du taux de flux de gènes réel. L'étude de la différenciation entre populations séparées par 6000 km de distance sur le continent africain a donc été entreprise dans l'optique de comparer la valeur informative des loci microsatellites par rapport à celle des loci isoenzymes.

Les deux populations ont montré un faible mais néanmoins significatif taux de différenciation. Les résultats obtenus dans les deux cas ont été très comparables et il est surprenant de constater une telle similitude entre des estimations procurées par des marqueurs

génétiques évoluant à court (microsatellites) et long (isoenzymes) terme (tableau 2). Le taux de flux de gènes semble donc important à travers tout le continent africain. Dans notre cas, un habitat de type savane ininterrompu relie ces deux populations, ce qui peut expliquer ce résultat, les gènes diffusants de proche en proche. Les loci microsatellites semblent donc dans ce cas au moins aussi informatifs que les loci isoenzymes pour l'étude de la divergence entre populations.

Tableau 2 : Différence entre des populations d'*An. gambiae* du Kenya et du Sénégal

Microsatellites		Allozymes	
Locus	Wright's Fst (Nm)	locus	Wright's Fst (Nm)
AG2H46	0.013 (9.5)	Est-1	0.087 (1.3)
33C1	0 NS (>>1)	Est-2	0.018 NS (6.8)
29C1	0.077 (1.5)	Est-3	0.037 (3.3)
1D1	0 NS (>>1)	ODH	0 NS
2A1	0.01 (12.4)	PGM-1	0 NS
		PGM-2	0 NS
MOYENNE	0.016 (7.7)	MOYENNE	0.036 (3.3)

NS : non significatif, en gras : $P < 0.01$

D'après Lehmann *et al.* 1996

4-2-2 : Structuration génétique d'*An. arabiensis* au Sénégal et dans les îles de l'Océan indien

An. arabiensis est réparti sur tout le continent africain, à l'exception de l'Afrique centrale. Afin de vérifier, comme pour *An. gambiae*, si les loci microsatellites sont de bon marqueurs de la structuration des populations, des échantillons de populations, *a priori* les plus séparées possible géographiquement, ont été testés et comparés. Ces populations viennent du Sénégal, de l'île Maurice, de l'île de la Réunion et des hauts plateaux de Madagascar. *An. arabiensis* est la seule espèce du complexe présente sur l'île de La Réunion et sur les hauts plateaux de Madagascar.

1) variabilité génétique au sein de chaque population

Chacune des 4 populations testées séparément est en équilibre de H-W. Cependant la variabilité génétique (le nombre d'allèles par locus) est très différente selon les populations. Le nombre d'allèles par locus est respectivement de 7,3 ; 5,9 ; 3,4 et 2,6 pour les populations du Sénégal, des hauts plateaux de Madagascar, de l'île Maurice et de l'île de la Réunion.

2) des populations très différenciées

Si les 4 populations sont testées toutes ensemble l'équilibre de H-W n'est plus du tout respecté avec un très fort déficit en hétérozygotes ($F_{is} = 0,214$, $P < 10^{-4}$). Une importante différenciation génétique a été mise en évidence entre les populations sénégalaises et les populations prélevées sur ces îles, ainsi qu'entre chaque population insulaire. Les F_{st} variaient de 0,08 à 0,215 et les R_{st} de 0,022 à 0,30 (tableau 3).

Tableau 3

Populations	Fst	Rst	Nm
Sénégal x Madagascar	0,109	0,095	1,4
Sénégal x Réunion	0,206	0,302	0,6
Sénégal x Maurice	0,188	0,169	0,7
Madagascar x Réunion	0,214	0,174	0,6
Madagascar x Maurice	0,08	0,022	0,9
Réunion x Maurice	0,215	0,132	0,5
Les 4 populations ensemble	0,169	0,213	1,3

Cette différenciation génétique est due essentiellement à l'isolement géographique, à des pressions de sélection par insecticides et à la dérive génétique.

Les flux migratoires doivent être très réduits entre les îles et le continent africain. Il s'ensuit très probablement un effet fondateur, lui même suivi de dérive génétique. Par ailleurs sur chacune des îles des campagnes insecticides passées ou actuelles ont très probablement provoquées des goulets d'étranglement génétique (bottle neck), qui ont abouti à la structuration génétique actuelle.

4-2-3 : Faible différenciation génétique des populations d'*An. arabiensis* de Dielmo et de Barkedji au Sénégal

Ces deux localités sont séparées par 250 km. *An. arabiensis* est présent toute l'année à Dielmo et seulement en saison des pluies à Barkedji. Une très faible différenciation génétique a été mise en évidence chez *An. arabiensis* entre la population de Dielmo et celle de Barkedji ($F_{st} = 0,012$, $R_{st} = 0,0088$). Les échanges géniques semblent importants entre ces deux populations (tableau 4).

tableau 4: différenciation génétique des populations d'*An. arabiensis* de Dielmo et de Barkedji.

Locus	Fst			RST		
	Fst	P	Nm	Rst	P	Nm
7*	0.005	0.47	68	-0.005	0.61	∞
24D	0.029	0.14	8.4	-0.004	0.59	∞
147	-0.007	0.93	∞	-0.010	0.99	∞
141	0.018	0.18	13.5	0.056	0.054	4.2
26	0.002	0.70	127	0.004	0.38	58
803	0.022	0.16	11.2	0.007	0.30	35.8
45C	0.009	0.31	26.1	0.013	0.27	19.5
29C	-0.001	0.87	∞	-0.010	0.85	∞
All loci	0.012	0.013	21.4	0.009	0.20	28.1

P refers to the statistical significance of Fst and Rst, based on 1000 permutations procedure (Schneider *et al.*, 1997). Bolded values : P<0.05.

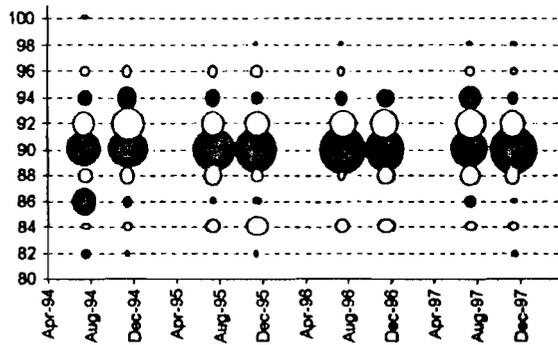
* Nm values for locus 7 (on the X chromosome) are adjusted assuming that Ne for the X chromosome is three-fourth that for the autosomes.

4-2-4 : Absence de variation de la structuration génétique d'*An. arabiensis* à Barkedji au cours du temps

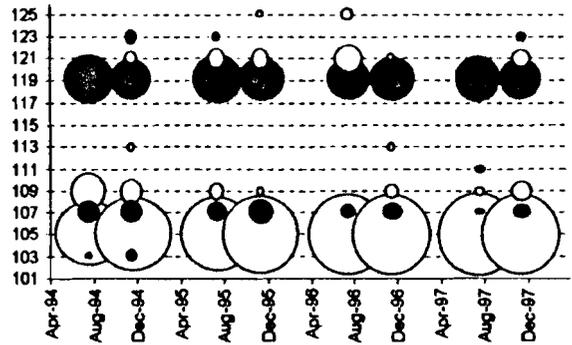
A Barkedji, en zone sahélienne, malgré une longue saison sèche sans vecteur, la structure génétique de la population d'*An. arabiensis* est restée remarquablement stable au cours de 4 années (figure 7). Huit « sous-populations » ont été analysées. Une en début de saison des pluies et l'autre en début de saison sèche, chaque année de 1994 à 1997. Les loci microsatellites étaient relativement polymorphes avec une moyenne de 8,6 (extrêmes: 2-11) allèles par locus. Le taux de polymorphisme moyen par locus et par population était de 3,8 allèles avec une hétérozygotie moyenne calculée de 0,56. L'analyse par F-statistics montre que la spéciation *An. gambiae/An. arabiensis* est bien reconnue quel que soit le locus considéré (Fst>0,25) mais aucune différenciation n'a été révélée entre les 8 « sous-populations ». Ces données suggèrent, soit le maintien d'une large population d'*An. arabiensis* durant la saison sèche, soit une recolonisation rapide en début de saison des pluies, soit les deux. Des efforts d'échantillonnage des vecteurs en saison sèche nous ont permis de capturer quelques femelles venant piquer l'homme la nuit, et ceci en l'absence de gîtes larvaires. Cette observation montre qu'une population d'*An. arabiensis* suffisante pour maintenir le polymorphisme d'une année sur l'autre, persiste à Barkedji durant la saison sèche.

Figure 7

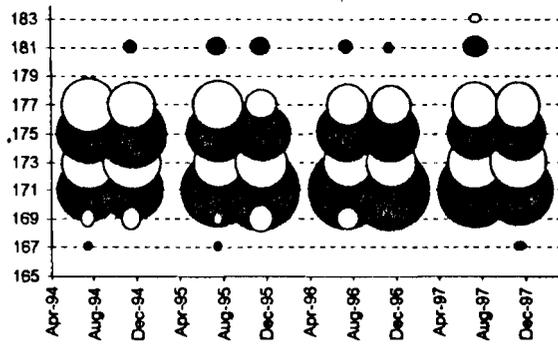
Locus 7*



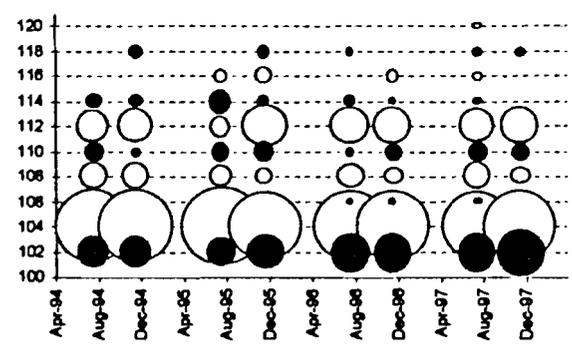
Locus 24D



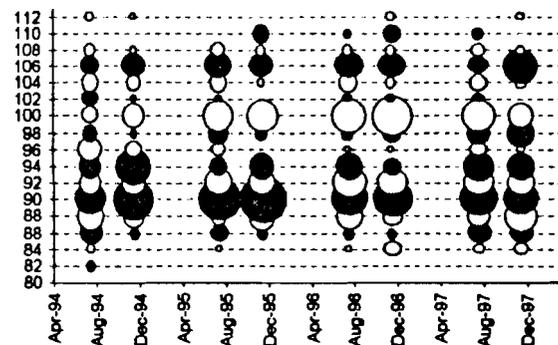
LOCUS 147



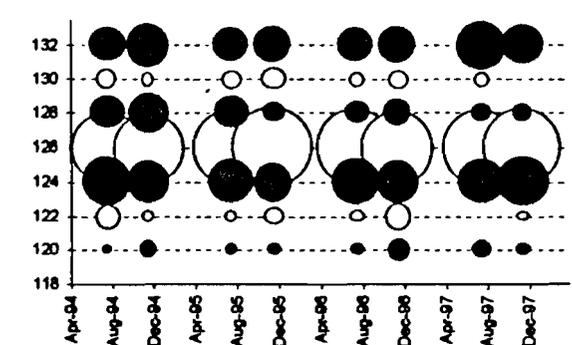
LOCUS 141



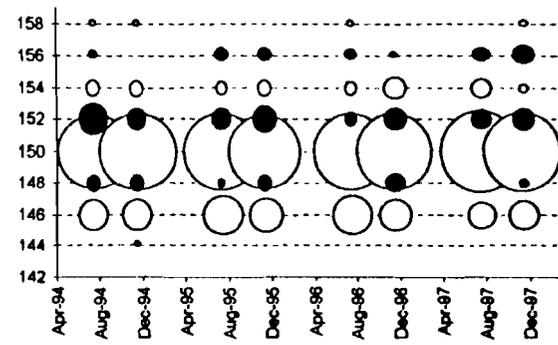
Locus 26*



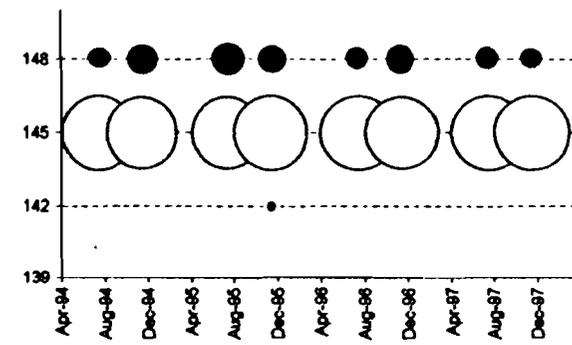
LOCUS 803



LOCUS 45C



LOCUS 29C



4-2-5 : Structure génétique d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* à Dielmo et Ndiop

En 1995 et 1996, les deux villages de Dielmo (transmission continue) et de Ndiop (transmission saisonnière), distants de 5 km, ont été étroitement suivis du point de vue entomologique. D'importantes différences ont été observées en terme de transmission (cf chapitre 2). L'objectif de la présente opération de recherche était de comparer la structuration génétique des populations d'*Anopheles gambiae* et d'*Anopheles arabiensis* de ces deux villages, en fonction de la répartition en sous populations selon les critères suivants :

- localisation géographique
- période de l'année
- comportement trophique
- infestation par des *Plasmodium*

Les loci étudiés étaient : 24D, 141, 7,26, 49, 803, 45C, 29C et 147. Ces loci se sont révélés très polymorphes chez *An. gambiae* et/ou chez *An. arabiensis* avec un nombre d'allèles variant de 2 (locus 29C) à 11 (loci 49 et 7) chez *An. gambiae*, et de 2 (locus 29C) à 15 (locus 26) chez *An. arabiensis*.

1) Variabilité spatiale.

Pour l'étude de la variabilité spatiale, le nombre d'individus testés au cours de deux saisons des pluies à Dielmo et à Ndiop est résumé dans le tableau suivant:

Année	<i>An. gambiae</i>		<i>An. arabiensis</i>	
	Dielmo	Ndiop	Dielmo	Ndiop
1995	52	50	50	50
1996	52	48	48	33

Aucune différenciation significative n'a été noté entre les populations de Dielmo et de Ndiop, malgré la présence de rares allèles « privés » spécifiques d'une localité.

Des faciès de transmission très différents, et la forte diminution des populations de vecteurs à Ndiop en saison sèche, ne suffit pas à isoler génétiquement les populations entre elles. Il est très probable que des migrants peuvent se déplacer entre ces villages (comme le suggèrent les Nm). Cette hypothèse est soutenue indirectement par le fait que de rares *An. funestus* ont pu être capturés à Ndiop alors que les gîtes sont éloignés de ce village, et sont situés par exemple à Dielmo.

En conclusion, même si en saison sèche la population d'anophèles est réduite (Dielmo) voire sub-éteinte (Ndiop), l'action que pourrait avoir la dérive génétique serait vite réduite ou

supprimée par une migration continue de moustiques qui aurait tendance à ramener les populations aux conditions de Hardy-Weinberg. Notre étude n'a donc pas mis en évidence de structuration sur une échelle de 5 Km. Des résultats similaires ont été obtenus par Lehmann *et al.*, 1997 et Donnelly *et al.*, 1999 qui n'ont pas trouvé de différences sur des distances de 25 Km (*An. gambiae*) et 20 Km (*An. arabiensis*) respectivement.

Indices de différenciation des population d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* entre Dielmo et Ndiop

Année	Population	Fst	Rst	Nm
1995	<i>An. gambiae</i> Dielmo X <i>An. gambiae</i> Ndiop	0,013	0,05573	19
1996	<i>An. gambiae</i> Dielmo X <i>An. gambiae</i> Ndiop	0,025	0,01959	13
1995	<i>An. arabiensis</i> Dielmo X <i>An. arabiensis</i> Ndiop	0,019	0,00135	13
1996	<i>An. arabiensis</i> Dielmo X <i>An. arabiensis</i> Ndiop	0,037	0,04955	7

Nm calculé à partir de la Fst de Wright 1978.

2) Variabilité temporelle

Dans chacun des villages, la structure génétique des populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* était très homogènes, au cours de deux année consécutives. Le nombre moyen d'allèles, et l'hétérozygotie moyenne, n'ont pas présentés de différences significatives (cf tableau). Cependant les populations d'*An. arabiensis* de Dielmo dont les effectifs sont plus grands en saison sèche, ont présentées une plus grande stabilité, contrairement aux populations d'*An. gambiae* de Dielmo et Ndiop et d'*An. arabiensis* de Ndiop qui ont des effectifs faibles à nuls en saison sèche. Dans ces dernières, le nombre de loci déviant par rapport aux conditions de Hardy-Weinberg est plus élevé, pouvant suggérer un effet de la dérive génétique plus marqué au niveau de ces populations.

	Nombre moyen d'allèles	Hétérozygotie moyenne
<i>An. gambiae</i> de Dielmo	6,625 et 5,875	0,689 et 0,651
<i>An. arabiensis</i> de Dielmo	6,75 et 7,75	0,580 et 0,625
<i>An. gambiae</i> de Ndiop	7,83 et 7,33	0,647 et 0,650
<i>An. arabiensis</i> de Ndiop	6,33 et 5,83	0,584 et 0,547

3) Structuration génétique en relation avec le comportement trophique

Les sous-populations de moustiques endophiles ont été également comparés selon l'origine de leur repas de sang, sur homme ou sur bœuf, à Dielmo et à Ndiop.

A Ndiop les trop faibles effectifs d'individus gorgés sur homme ou sur bœuf, aussi bien chez *An. gambiae* que chez *An. arabiensis*, n'ont pas permis de tirer de conclusion. A Dielmo, que ce soit chez *An. gambiae* ou chez *An. arabiensis*, les « populations » de femelles gorgées sur bœuf (53) n'ont pas montrées de structuration génétique significativement différente de celles gorgées sur homme (50).

Les marqueurs utilisés n'ont donc pas permis de mettre en évidence une relation entre le comportement et certains allèles ou génotypes, contrairement à d'autres travaux effectués chez *An. gambiae* (Coosemans *et al.* 1999).

4) Structuration génétique en relation avec l'état d'infestation

Malgré un nombre faible de femelles testées, aucune différence significative de structure génétique n'a été observée entre les sous-populations porteuses de *Plasmodium* et celles non infestées. En conclusion, les résultats de cette étude semblent montrer qu'au sein de chaque espèce *An. gambiae* et *An. arabiensis*, les individus peuvent s'infester de façon équivalente.

Conclusion

Même si les populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* connaissent des variations importantes d'effectifs en saison sèche, leur structuration génétique est restée stable, dans un même village et entre deux villages proches. Il y a au moins deux explications à cette observation : la migration de proche en proche permet de réduire les effets d'une éventuelle dérive génétique qui suivrait un goulet d'étranglement (bottle neck), et des femelles, difficiles à capturer, se maintiennent probablement en saison sèche, comme cela a été observée à Barkedji (paragraphe 4.2.4).

Nos résultats montrent que les populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* sont en équilibre de Hardy Weiberg, probablement dans toute la zone géographique du Saloum incluant Dielmo et Ndiop, et qu'il n'y a pas de populations individualisées selon le comportement ou la capacité vectorielle. Ceci démontre indirectement que ces populations vectorielles sont relativement opportunistes quand au choix de l'hôte. En d'autre terme cette étude suggère fortement qu'il n'y a pas de population anthropophile ou zoophile, ni de populations bons vecteurs et d'autres mauvais vecteurs.

Références citées

- Coosemans M., Smits A. & Roelants P., 1998 - Intraspecific isozyme polymorphism of *Anopheles gambiae* in relation to environment, behavior, and malaria transmission in southwestern Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(1): 70-74.
- Donnelly M.J., Cuamba N., Charlwood J.D., Collins F.H. & Townson H., 1999 - Population structure in the malaria vector, *Anopheles arabiensis* Patton, in East Africa. *Heredity*, 83: 408-417.
- 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. *Molecular Ecology*, 6: 243-253.
- Wright S., 1978 - Evolution and genetics of populations, Volume 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.

5- Polymorphisme génétique d'*Anopheles funestus*

(Coordination: Laurence Lochouart, participation de Ibrahima Dia, thésard)

Les espèces du groupe *An. funestus* sont mal connues. On sait depuis les années 1930 que ce groupe se compose de plusieurs espèces proches qui ne peuvent être différenciées que par de très discrets caractères sur les larves ou les adultes. *An. funestus*, *An. confusus* Evans & Leeson, *An. lesoni* Evans, *An. rivulorum* Leeson et *An. brucei* Service sont déterminables au stade larvaire, alors que les espèces du sous groupe *funestus* : *An. funestus*, *An. parensis* Gillies, *An. aruni* Sobti et *An. vaneedeni* Gillies & Coetzee (Gillies & De Meillon, 1968) peuvent être identifiés par de petites différences morphologique chez les adultes (Gillies & Coetzee, 1987). Leur biologie et leur capacité vectorielle sont très différentes. A l'exception d'*An. funestus*, ces espèces semblent essentiellement zoophiles. Des *Plasmodium* humains n'ont été trouvés que chez *An. funestus* qui est un excellent vecteurs, à capacité vectorielle élevée, et très rarement chez *An. rivulorum* en Tanzanie (Wilkes *et al.* 1996). *An. vaneedeni* a pu être infesté expérimentalement (De Meillon *et al.* 1977)

L'identification précise de l'espèce dans le groupe est d'une très grande importance pour la lutte anti-vectorielle. En effet certaines espèces du groupe, très difficile à différencier morphologiquement d'*An. funestus* s.s., sont essentiellement zoophiles, et ne jouent donc aucun rôle dans la transmission des *Plasmodium* à l'homme. Ainsi en Tanzanie et en Afrique du Sud, alors que des traitements par pulvérisations intra-domiciliaires avaient éliminé *An. funestus*, quelques spécimens persistaient. Selon la région il s'est avéré, par une étude minutieuse des individus persistant après traitement qu'il s'agissait d'*An. parensis*, *An. rivulorum* ou *An. vaneedeni* qui ne sont pas vecteurs (ou qui sont très mauvais vecteurs) de *Plasmodium*. En Afrique australe, Koekemoer *et al.* (1998 et 1999) ont pu différencier des espèces proches du groupe *An. funestus* en utilisant la PCR-RFLP (*An. funestus* contre *An. vaneedeni*) et la PCR-SSCP (*An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. rivulorum* et *An. lesoni*).

A l'intérieur même de l'espèce *An. funestus* il est important de savoir si toutes les populations (caractérisées par leur structure génétique) ont la même compétence et capacité vectorielle. *An. funestus* lui-même est très polymorphe, biologiquement et génétiquement, comme le montrent des études préliminaires de cytogénétique. (Boccolini *et al.* 1992, 1994).

5-1 : Sélection des marqueurs et des populations

marqueurs en cytogénétique: 6 inversions (a, b, s, t, u et z) sont analysables sur le bras chromosomique 2, 3 (a et b) sur le bras 3, et une (a) sur le bras 5 (figure 8)

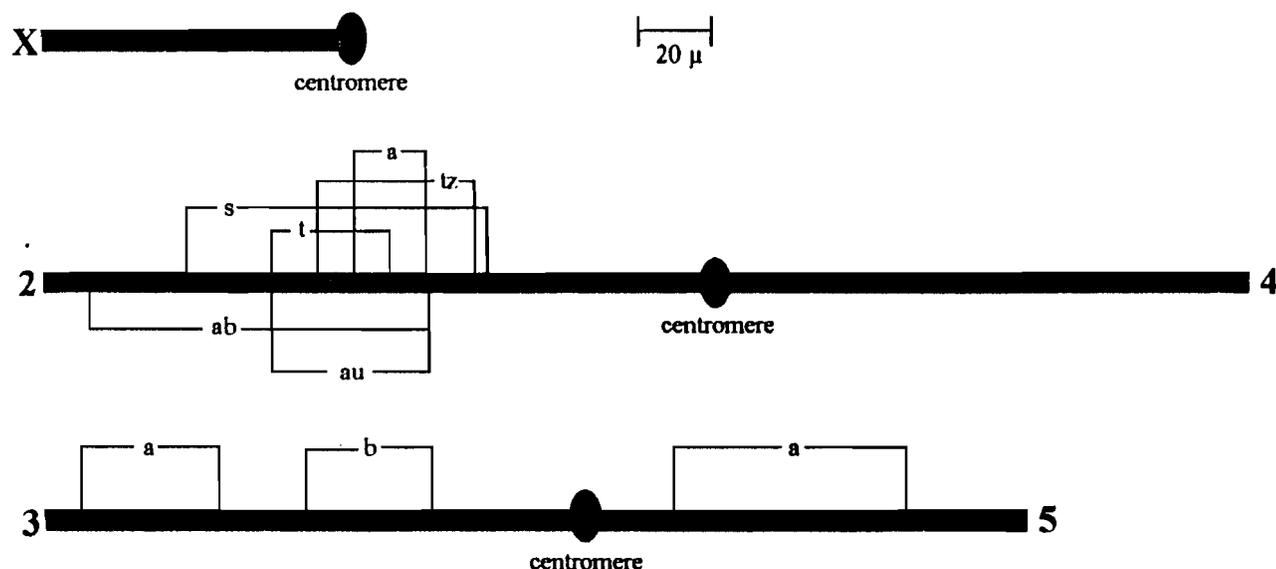


Figure 8

Sélection des populations :

L'essentiel des études s'est fait comme prévu dans le village de Dielmo. Cinq autres villages ont été étudiés en suivant un transect Ouest-Est le long de la Gambie. Madina Djikoye situé à 12 km de Dielmo (13°38'N, 16°18'W), Kouvar (13°23'N, 13°37'W) et la zone de Sankagne (13°24'N, 13°45'W) en région dite soudannienne, plus arrosée que Dielmo, et Wassadou (13°21'N, 13°20'W) and la région de Kédougou (12°33'N, 12°11'W) en région dite soudano-guinéenne.

5-2 : Résultats

Les préférences trophiques, les taux d'infestation ainsi que les structures chromosomiques des différentes populations ont été étudiés.

L'anthropophilie d'*An. funestus* a varié selon le site de récolte (figure 9). A Dielmo l'anthropophilie était de 91 %, à Madina Djikoye de 82 %, à Koulare de 50 %, à Wassadou de 32 % et dans la région de Kédougou de 75%. Ces résultats confirment ceux de 1993 qui rapportaient un taux d'anthropophilie "anormalement" bas à Wassadou.

L'étude du niveau d'infestation a montré que l'indice circumsporozoïtique (ICSP) des populations de Dielmo est très variable selon les populations et l'année (tableau 5)

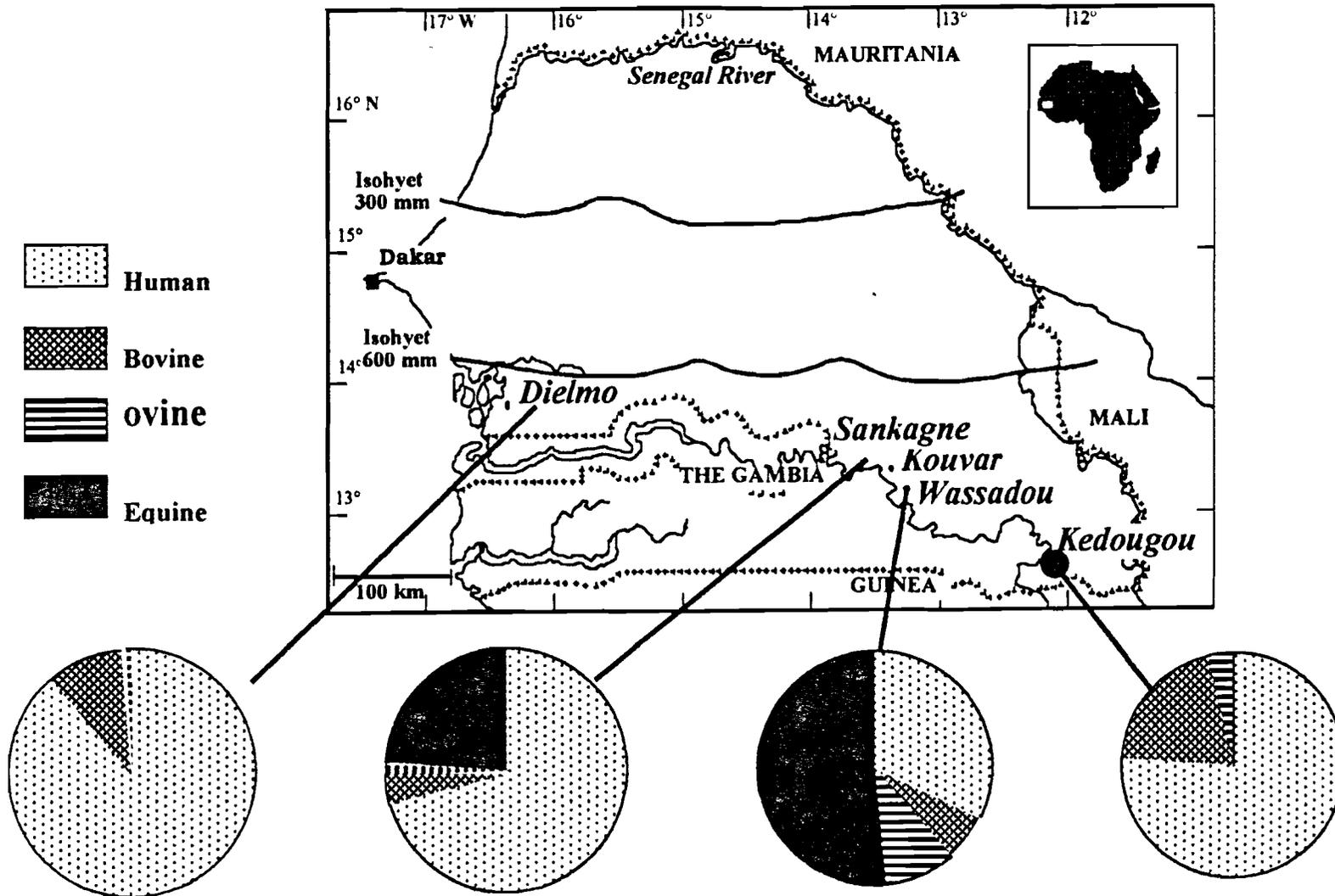
tableau 5 : taux d'infestation d'*An. funestus* au Sénégal selon l'année et la méthode de capture

Lieu et date	Nb de <i>An. funestus</i> testé	Pourcentage porteurs de CSP de <i>P. falciparum</i>	Pourcentage porteurs de CSP de <i>P. malariae</i>	Pourcentage porteurs de CSP de <i>P. ovale</i>
Captures sur hommes volontaires				
Dielmo 1993	363	2.20	0	0
Dielmo 1994	1329	1.35	0.10	0
Dielmo 1995	1886	3.61	0.08	0
Dielmo 1996	1860	4.19	0.11	0.11
Dielmo 1997 (4 mois)	704	5.82	0.05	0
Sankagne 1997	68	1.47	0	0
Kédougou 1996	58	6.89	0	0
Captures de la fraction endophile au repos				
Dielmo 1993	151	0	0	0
Dielmo 1994	373	3.49	0	0
Dielmo 1995	198	1.51	0	0
Dielmo 1996	1174	2.64	0	0
Dielmo 1997 (4 mois)	217	5.53	0	0
Sankagne 1997	408	4.41	0	0
Kédougou 1994	223	2.69	0	0
Kédougou 1995	372	6.45	0	0
Kédougou 1996	196	2.55	0	0

1) Les inversions observées au Sénégal

Au Sénégal, comme dans des études antérieures, aucune inversion n'a été observée sur le chromosome X et le bras 4. Les observations ont porté sur 611 femelles dont 422 ont pu être « lues » entièrement. Dix arrangements paracentriques ont été identifiés : 6 sur le chromosome 2 (a, s, t, ab, au, tz), 3 sur le chromosome 3 (a, b, ab) and 1 sur le chromosome 5 (a)

Figure 9



TROPHIC PREFERENCES OF *AN. FUNESTUS* IN SENEGAL

Table 6 : Geographical variability of chromosomal inversion frequencies in indoor resting samples of half-gravid females of *An. funestus* from various localities in Senegal.

Locality	Chromosomal arm 2								arm 3				arm 5			
	Sample size	+	a	s	t	ab	au	tz	Sample size	+	a	b	ab	Sample size	+	a
Dielmo	320	100	-	-	-	-	-	-	302	81.46	4.30	14.24	-	318	60.69	39.31
M.Djikoye	16	100	-	-	-	-	-	-	12	100	-	-	-	16	50	50
Sankagne	114	3.51	-	96.49	-	-	-	-	112	100	-	-	-	114	71.05	28.95
Kouvar	28	14.29	32.14	28.57	25	-	-	-	32	43.75	-	21.88	34.37	28	75	25
Wassadou	8	-	62.50	-	37.50	-	-	-	8	-	-	12.50	87.50	8	25	75
Kedougou	324	1.23	45.68	-	42.28	5.56	1.85	3.40	374	-	0.53	2.41	97.06	360	46.94	53.06
Total	810	42.96	20	14.57	18.15	2.22	0.74	1.36	840	45.24	1.78	7.62	45.36	844	56.16	43.84

sample size = number of chromatids

2) Variations géographiques

Il y a de très grandes variations géographiques selon les localités avec des différences très significatives. Les populations sont très structurées (Tableau 6).

A Dielmo et Madina Djikoye tous les 68 spécimens étudiés portaient l'arrangement standard sur le bras chromosomique 2. A Kouvar l'inversion 2s était la plus fréquente (28.57%). Elle était la seule présente à Sankagne (96.49%), alors qu'elle était totalement absente de Kédougou. Les inversions 2a et 2t dominaient dans la partie orientale du Sénégal. Ces variations de la fréquence des allèles étaient très significatives ($P < 0.0001$). Le tableau 6 montre que cette forte structuration génétique des populations se retrouve également sur le bras chromosomique 3, et dans une moindre mesure sur le bras 5.

3) Variations saisonnières et annuelles à Dielmo

En raison de l'absence d'inversion observées sur le bras chromosomique 2, l'analyse n'a pu se faire que sur les bras 3 et 5. Aucune différence significative n'a été observée, ni d'une année sur l'autre, ni entre la saison sèche et la saison des pluies, à l'exception de l'inversion 3b ($P < 0.01$). L'analyse des réarrangements caryotypiques montre que trois populations sont présentes au Sénégal. Ces populations avaient déjà été identifiées sur la base de différence de taux d'anthropophilie. (Lochouart *et al.* 1998).

Nos résultats montrent clairement que *An. funestus* est une espèce génétiquement très polymorphe, extrêmement structurée. Les inversions 2s, 2t et 2u avaient déjà été signalées du Mali et du Burkina Faso (Boccolini *et al.*, 1998). L'inversion 2z est une nouvelle inversion basée sur l'inversion 2t signalée, pour le moment, uniquement du Sénégal (Lochouart *et al.*, 1998). Les équilibres de Hardy-Weinberg, prenant toutes les populations ensemble ne sont pas respectés, alors qu'ils le sont pour chaque population prise individuellement (le cas de Kouvar, où les effectifs sont trop faibles pour conclure, mérite d'être approfondi). En l'absence de claire zone de sympatrie où l'équilibre de H-W ne serait pas respecté, il est pour le moment impossible de conclure à la présence de plusieurs espèces dans un « complexe *An. funestus* » au Sénégal.

6- Analyse de la diversité parasitaire à Ndiop et à Dielmo

(coordination Odile Mercereau-Puijalon. Joanna Zwetyenga, étudiante en thèse, Lassana Konaté et Francine Ntoumi, chercheurs post-doctoraux)

Au début de ce projet, aucune donnée sur le polymorphisme des parasites à Ndiop n'était disponible. Nous avons tout d'abord analysé des prélèvements sanguins effectués à Ndiop chez les mêmes individus à un mois d'intervalle, en septembre et octobre 1994, c.à d. à deux époques différentes de la même période de transmission. Nous avons ensuite procédé à la comparaison des populations parasitaires et des caractéristiques de l'infection dans les deux villages au même moment (octobre 1994). Dans un troisième temps, nous avons procédé à l'analyse des infections au cours du portage chronique en saison sèche à Ndiop et lors de la reprise de la transmission l'année suivante.

6-1 : études transversales au cours de la saison de transmission à Ndiop

(données publiées dans Zwetyenga *et al*, 1998)

Nous avons typé tous les échantillons disponibles, provenant du même groupe de donneurs, récoltés au cours des suivis longitudinaux systématiques effectués du 12 au 18 Septembre 1994 et du 10 au 15 Octobre 1994. Pour septembre 1994, nous avons typés 143 isolats et 125 isolats pour octobre 1994, dont 122 provenaient de villageois déjà prélevés en septembre 1994.

L'examen microscopique des gouttes épaisses réalisé à Dakar, indiquait 36% d'échantillons porteurs de *P. falciparum* pour le prélèvement du mois de septembre 94. Comme il est connu que la PCR est plus sensible que l'examen microscopique, nous avons, en collaboration avec G. Snounou, utilisé la mesure la plus sensible, une réaction de "nested PCR" utilisant des amorces spécifiques d'espèces de *Plasmodium* dérivées des gènes codant pour le RNA ribosomal. La PCR de détection d'espèce a montré une prévalence beaucoup plus élevée : *P. falciparum* est détecté dans 77 % des échantillons. Ce résultat signifie qu'il y a beaucoup de porteurs de parasites non détectés par la lecture des gouttes épaisses, c.à d. présentant de faibles parasitémies.

L'estimation de la prévalence parasitaire, en utilisant les résultats cumulés des PCR de typage sur les 3 loci est de 68% en septembre et de 78 % pour le mois d'octobre 1994, le taux d'échantillons positifs pour les divers marqueurs de typage est plus élevé qu'en septembre 1994. Le nombre supérieur de porteurs en octobre par rapport à septembre reflète le taux plus important de piqûres infectantes en octobre (1,68 piqûre infectante/personne/nuit) qu'en septembre (1,09 piqûre infectante/personne/nuit).

Toutes les familles alléliques décrites pour les gènes *msp-1* et *msp-2* (Miller *et al*, 1993; Fenton *et al*, 1991) ont été détectées à Ndiop. Un nombre important d'allèles a été observé, ainsi que l'indique le tableau suivant :

Nombre d'allèles distincts observés dans les études transversales de Septembre et Octobre 1994 à Ndiop.

Nbre d'allèles distincts	Septembre 1994	Octobre 1994	Total d'allèles distincts sur les 2 études
<i>msp-1</i> (bloc 2)	15	13	17
<i>msp-2</i>	33	27	43
<i>glurp</i>	9	9	9

La comparaison des isolats récoltés en septembre 1994 et octobre 1994 montre une stabilité des génotypes dans le village. La distribution individuelle des allèles de la famille K1 du locus *msp-1* fluctue de façon statistiquement significative ($p < 0,05$) alors qu'aucune fluctuation significative n'est observée pour les autres familles alléliques *msp-1* ou pour les autres loci. Ces résultats indiquent qu'en période de transmission la population parasitaire reste globalement stable, les parasites circulant d'un individu à l'autre pendant la transmission. De fait, la circulation des génotypes a été observée, puisque chez les 52 individus restés asymptomatiques pendant cette période et qui n'ont donc subi aucun traitement, les isolats de septembre contiennent des parasites de génotypes différents des isolats d'octobre.

La complexité moyenne des infections des porteurs de parasites de Ndiop en Septembre et/ou octobre 1994 est de 1,55, c'est à dire bien moindre que ce qui a été observé à Dielmo en 1992 (3,4 allèles par isolat). Le niveau de complexité observé à Ndiop est du même ordre que ce qui a été décrit pour des zones de mésoendémie comme Kilifi au Kenya (Kyes *et al*, 1997) ou la Gambie (Conway *et al*, 1991). On n'observe pas de diminution de la complexité dans les infections cliniques. On détecte même une légère tendance vers une complexité accrue dans les accès palustres. Ceci est à rapprocher des observations faites par Kyes *et al* (1997) au Kenya, une zone d'endémie similaire à Ndiop et par Roper *et al* (1998) au Soudan dans une zone d'endémicité beaucoup plus faible.

Aucune influence de l'âge n'a été observée sur la distribution des allèles du locus *msp-1* ou des autres loci étudiés.

6-2 : Analyse comparée de la diversité parasitaire à Dielmo et à Ndiop

La comparaison des populations parasites de Dielmo 1992 et Ndiop 1994 souffrait du fait que ces études ont concerné des parasites collectés à 2 ans d'intervalle et étudiés avec des techniques de typage légèrement différentes. Afin de pouvoir comparer avec rigueur l'étendue de la diversité et les caractéristiques des infections dans les 2 villages, nous avons entrepris d'analyser les parasites prélevés pendant la même période à Dielmo et à Ndiop. Nous avons choisi de comparer les échantillons prélevés dans les deux villages pendant la même semaine d'Octobre 1994.

Une série de 144 prélèvements sanguins effectués à Dielmo (du 10 au 15 Octobre 1994) a été typée avec exactement la même approche technique que celle utilisée pour les études de Ndiop rapportées ci-dessus. Des échantillons des 2 villages ont été analysés en parallèle sur les mêmes gels d'agarose pour standardiser la nomenclature des allèles. Nous n'avons pas effectué le typage du gène *glurp*, car au vu de nos résultats présentés ci-dessus, ce gène ne présente pas un polymorphisme aussi important que *msp-1* et *msp-2* et le typage *glurp* n'apporte pas de renseignements supplémentaires par rapport aux loci *msp-1* et *msp-2*.

Le typage des parasites présents à Dielmo en octobre 1994 a confirmé pour l'essentiel les observations réalisées sur les prélèvements de Juillet/Août 1992. Nous avons détecté un polymorphisme parasitaire important, comme l'indique le tableau ci-dessous.

Nombre d'allèles *msp-1* et *msp-2* observés dans les études transversales de Dielmo en 1992 et Octobre 1994 et de Ndiop en Octobre 1994.

	N	Nbre PCR-positifs <i>msp-1</i>	Nbre total d'allèles <i>msp-1</i>	PCR-positifs <i>msp-2</i>	Nbre total d'allèles <i>msp-2</i>	Taux entomologique d'inoculation mensuel
Dielmo 92	77	67	17	60	22	9
Dielmo 94	144	144	33	135	47	25
Ndiop 94	125	81	13	43	27	8

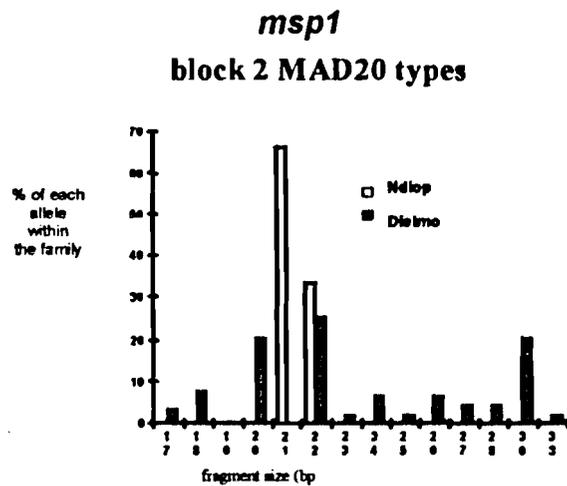
Lorsqu'on compare les isolats de Dielmo et Ndiop prélevés en 1994, on observe que le nombre d'allèles est supérieur à Dielmo. Nos résultats indiquent que le niveau de polymorphisme est plus élevé en zone de transmission plus intense. Mais il ne semble pas y avoir une relation directe entre le taux d'inoculation et l'étendue du polymorphisme. Le nombre d'allèles semble proportionnel au nombre de prélèvements, et surtout au nombre de prélèvements positifs en PCR (et typables). Bien que nous ayons pris la précaution d'analyser de façon systématique une fraction importante des habitants des 2 villages (de 35 à 50%), il est vraisemblable que nous

n'ayons pas réalisé un typage exhaustif des populations parasitaires de ces 2 villages présentes au moment des prélèvements.

Trois conclusions s'imposent de la comparaison des infections à Dielmo et à Ndiop:

1-Au cours de cette semaine d'octobre 1994, les populations parasitaires étaient très différentes:

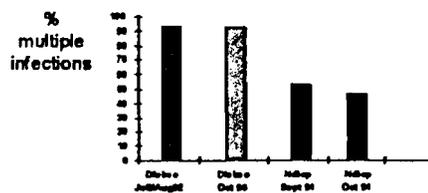
- a) les fréquences des familles alléliques des gènes *msp-1* et *msp-2* sont différentes à Dielmo et Ndiop
- b) la distribution des allèles individuels est différente, certains allèles majoritaires à Ndiop étant minoritaires à Dielmo .Un exemple est illustré ci dessous



Ceci signifie qu'au même moment, les parasites circulant dans deux villages situés à 5 kilomètres de distance sont différents. Cette observation d'une hétérogénéité géographique est en accord avec les travaux de Forsyth *et al* (1989).

2- La fréquence des infections multiples et la complexité moyenne des infections sont plus élevées à Dielmo qu'à Ndiop. Des niveaux de complexité comparables à ceux de 1992 ont été observés à Dielmo en Octobre 1994, environ 2 fois plus importants que ceux observés à la même époque à Ndiop. Notre conclusion précédente que le taux d'inoculation entomologique a une influence sur la complexité des infections asymptomatiques se trouve confortée par cette seconde analyse des populations parasitaires de Dielmo. La figure ci après illustre la stabilité de ce paramètre.

% multiple infections in asymptomatic Ndiop & Dielmo villagers (transmission season)



3- On observe une influence de l'âge sur la complexité des infections à Dielmo, mais non à Ndiop.

En conclusion, ces travaux suggèrent que dans les niveaux de transmission qui prévalent à Dielmo et à Ndiop, la transmission a un effet modéré sur l'étendue de la diversité parasitaire. On observe une micro-hétérogénéité géographique importante, indiquant que les populations parasitaires circulantes au même moment dans les 2 villages proches sont différentes. Cela appelle à une meilleure prise en compte de la diversité parasitaire pour les stratégies de lutte, en particulier, vaccinales. Il reste à vérifier que cette observation d'une hétérogénéité géographique se confirme sur une plus longue période et donc à typer à nouveau des échantillons prélevés au même moment dans ces 2 villages lors d'une ou plusieurs saisons de transmission différentes.

6-3 : Influence du portage de l'hémoglobine S sur les fréquences alléliques des souches hébergées

(Ntoumi *et al*, 1997; Konate *et al*, 1999)

Nous avons analysé des parasites infectant des individus présentant divers marqueurs génétiques connus pour protéger contre le paludisme (hémoglobinopathies, ou présence d'allèles HLA particuliers), afin de mieux cerner le rôle du polymorphisme parasitaire dans les interactions avec l'hôte.

Deux études ont été réalisées dans le village de Dielmo. La première concernant un groupe de 70 individus recrutés en juillet/août 1992. L'analyse des génotypes parasitaires dans les deux groupes (AA ou AS) a mis en évidence un biais important dans la distribution des quelques allèles. Certains allèles *msh-1* n'ont été observés que chez les sujets AA et d'autres allèles que chez les AS. Il y a un déficit marqué en allèles *msh-1* appartenant à la famille MAD20 chez les AS par rapport aux AA et une augmentation relative de la fréquence de certains allèles de la famille K1. Ces différences ont été déterminées comme hautement significatives dans une analyse

multivariée. Il n'y a aucune différence marquée dans la distribution des allèles *msp-2*. Ce marqueur constitue un excellent contrôle, puisque lui aussi code pour un antigène de la surface du mérozoïte, qui est hautement polymorphe. L'observation d'un biais de distribution allélique associé au type d'hémoglobine a été confirmée par Francine Ntoumi dans une cohorte d'enfants vivant en zone de mésoendémie au Gabon (Ntoumi et al, 1997).

Nous avons mis à profit l'analyse transversale d'octobre 1994 réalisée à Dielmo pour étudier la distribution des allèles *msp-1* et *msp-2* chez les habitants AA et AS. Cette seconde étude a aussi mis en évidence des biais de distribution, mais qui n'ont été significatifs que pour le gène *msp-2*. (Konaté *et al*, 1999).

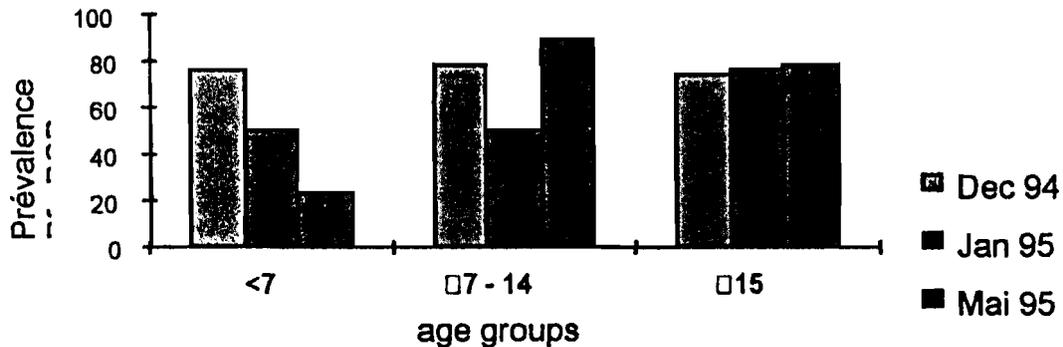
En conclusion, la notion qui se dégage est que de fait le portage du trait AS est associé à des biais de distribution des souches. Notre interprétation est que les globules rouges AS constitueraient un environnement inhospitalier pour certaines souches. Serait-ce là une des raisons pour lesquelles ces individus sont protégés? C'est une hypothèse qu'il nous semble important d'explorer. Nous avons tenté d'étayer ces résultats en analysant la distribution allélique chez les villageois de Ndiop porteurs ou non d'hémoglobine S. Malheureusement, la prévalence du trait AS à Ndiop, et l'étendue du polymorphisme allélique n'ont pas permis d'obtenir d'atteindre la signification statistique dans ces conditions.

6-4 :Etude de la dynamique des infections en période de non transmission à Ndiop (Zwetyenga *et al*, 1999).

Pendant 7 à 11 mois par an, selon les années, aucune transmission n'est détectée à Ndiop par les méthodes entomologiques habituellement utilisées. La saison sèche représente un "goulot d'étranglement" pour les parasites. En effet, la survie de l'espèce dépend alors, soit de moustiques infectés qui "hiberneraient", soit de l'établissement d'une infection chronique chez l'homme. Les mécanismes par lesquels les parasites maintiennent une infection de longue durée sont inconnus.

Pour analyser et interpréter la dynamique des infections en saison sèche, il est nécessaire de connaître précisément les paramètres entomologiques ainsi que l'utilisation des médicaments par les porteurs de parasites. La surveillance entomologique, parasitologique et clinique réalisée à Ndiop permet d'étudier le portage à long terme chez des porteurs asymptomatiques. Nous avons étudié 3 prélèvements transversaux (Décembre 1994, Janvier 1995 et Mai 1995), effectués chez les mêmes individus que ceux étudiés en Septembre et Octobre 1994. La transmission a cessé d'être détectée en Novembre 1994. Les prélèvements étudiés ont donc été effectués 1, 2 et 6 mois après l'arrêt de la transmission. L'analyse des données montre que chez les individus non traités la prévalence reste stable au cours de cette période. Environ 60% des villageois sont porteurs d'une infection détectable par PCR au mois de Mai.

-- La première observation intéressante est que la prévalence chute de façon particulière dans la classe d'âge des 0-7 ans pendant la saison sèche, ainsi qu'il est montré sur le graphe ci dessous.



La plupart des enfants de moins de 7 ans ne présentent pas de parasites détectables au mois de Mai 1995, contrairement à ce que l'on observe chez les plus âgés. Ceci suggère que les enfants de moins de 7 ans auraient un mécanisme de clairance des parasites plus efficace que celui des sujets plus âgés lors d'un portage de longue durée sans nouvelle réinfection. Par contre, on observe chez les enfants plus âgés et chez les adultes un portage chronique. L'immunité anti-parasitaire acquise chez les adultes en zone d'endémie est donc non stérilisante. Nos données suggèrent que chez les jeunes enfants, l'immunité serait d'un autre type que la prémunition dont bénéficient les adultes.

-- La seconde observation importante concerne l'évolution de la population parasitaire en saison sèche. Nous avons observé des fluctuations importantes dans les populations parasitaires individuelles. Le suivi des 45 villageois non traités pour lesquels nous disposons de prélèvements sanguins pour chacune des 3 études transversales indique des fluctuations importantes des populations parasitaires circulantes en périphérie. La comparaison des génotypes parasitaires des isolats récoltés en Mai avec ceux de Janvier ou Décembre prélevés chez le même porteur, indique que 100% des isolats sont différents soit par le type d'allèle présent, soit par le nombre d'allèles présents. Cependant, dans 53% des cas, on observe une persistance d'au moins un allèle. Ces données suggèrent que de fait, certains clones établissent une infection chronique sur lesquelles se superposent des fluctuations plus ou moins importantes d'autres génotypes. Les données entomologiques indiquent qu'aucun anophèle n'a été capturé dans ce village pendant cette période. Pas plus la transmission par les vecteurs, que les mouvements des villageois hors du village, ne peuvent expliquer des fluctuations d'une telle amplitude. Nous interprétons ces

données comme reflétant l'évolution des infections individuelles au cours du portage asymptomatique de longue durée.

6-5 : Comparaison des populations parasitaires présentes à Ndiop lors de deux saisons de transmission consécutives

Nous avons réalisé le génotypage de parasites provenant de 90 villageois prélevés du 9 au 15 Septembre 1995 et nous avons comparé ces données avec celles de septembre 1994 (cf. ci-dessus). Le nombre d'allèles *msh-1* et *msh-2* détectés est du même ordre pour les deux années. Mais les fréquences alléliques en Septembre 1995 sont différentes de celles observées non seulement lors de la saison de transmission précédente, mais aussi de celles détectées pendant la saison sèche. Ceci suggère que la population parasitaire varie considérablement d'une année à l'autre (résultats non publiés)

7- Diversité génétique des *Plasmodium* chez les moustiques

Comme expliqué précédemment, cette partie de l'étude n'a pas pu être réalisée pour des raisons méthodologiques. Nous n'avons pas réussi à mettre au point de façon fiable des protocoles permettant d'analyser le polymorphisme parasitaire chez les moustiques.

FORMATION DE JEUNES CHERCHEURS

Ce programme a été très « productif » sur cet aspect, en particulier en terme de formation d'étudiants de 3^{ème} cycle, mais également pour la formation et le recyclage de personnel technique sénégalais.

- Ibrahima Dia à réalisé sa thèse de 3^{ème} cycle de l'Université Cheikh Anta Diop sur le polymorphisme biologique, comportemental et génétique d'*An. funestus* au Sénégal.
- Mathurin Diatta à réalisé sa thèse de 3^{ème} cycle de l'Université Cheikh Anta Diop sur le polymorphisme comportemental et génétique d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* au Sénégal.
- Frédéric Simard à réalisé sa thèse de Sciences de l'Université de Nancy sur le polymorphisme génétique, et l'utilisation des marqueurs microsatellites, d'*An. arabiensis* au Sénégal.
- Joanna Zwetyenga, à réalisée une partie de sa thèse de Sciences de l'Université de Lille, France, en 1998, sur le polymorphisme génétique des *Plasmodium* dans le village de Ndiop.
- Lassana Konate assistant à l'Université Cheikh Anta Diop, et Francine Ntoumi, chercheur post-doctoral au CIRMF de Franceville au Gabon, ont réalisé un stage de longue durée à l'Institut Pasteur de Paris sur le typage moléculaire des *Plasmodium* au Sénégal.

CONCLUSION

Ce programme de recherche a permis de définitivement démontrer la très grande hétérogénéité de la transmission palustre au Sénégal, même sur de petites surfaces géographiques. Cette hétérogénéité se retrouve à trois niveaux :

- 1- Dans le faciès même de la transmission : des variations très élevées de l'intensité de la transmission ont été observées entre deux villages distants de seulement 5 km, et dans chaque village, en fonction des saisons et des années.
- 2- Chez les vecteurs : 3 espèces vectrices ont été identifiées. Leur abondance, leur proportion relative, leur rôle dans la transmission varient au cours du temps et entre les villages. Chez chaque espèce le polymorphisme comportemental et génétique, étudié par plusieurs méthodes complémentaires, est très élevé. La structuration génétique d'*An. funestus* est plus forte que celles d'*An. arabiensis* et *An. gambiae*. Ceci est très probablement dû à la nature des gîtes larvaires très localisés de cette espèce, ce qui limite les flux géniques.
- 3- Chez les parasites : le polymorphisme génétique de *P. falciparum* est très élevé. Des variations très importantes du nombre d'allèles (jusqu'à près de 50 allèles différents), et de la fréquences de ces allèles ont été observées en fonction de la localité, de la saison, de l'année. De même la complexité moyenne des infections chez les porteurs de parasite dépend du village, de l'époque par rapport à la saison de transmission, du portage en hémoglobine S, et, selon les villages, de l'âge.

Cette fabuleuse hétérogénéité du paludisme, même à un niveau micro-géographique doit absolument être prise en compte pour toute étude clinique ou immunologique, ainsi que pour toute tentative de contrôle de la maladie, que ce soit par la lutte anti-vectorielle, par l'utilisation d'anti paludéen ou par un hypothétique futur vaccin.

L'étude de la diversité génétique des *Plasmodium* chez les moustiques n'a pas pu être traitée comme prévu. Malgré le stage d'un des chercheurs de l'étude (Lassana Konate) à l'Institut Pasteur de Paris pour mettre au point les protocoles, il n'a pas été possible de mettre en évidence, de façon suffisamment répétitive, l'ADN de *Plasmodium* dans les têtes-thorax des anophèles déjà broyé pour le tests Elisa. L'éventuelle relation entre certains génotypes plasmodiaux et certaines espèces ou populations d'anophèles reste donc encore à documenter. C'est, de notre point de vue, le seul échec du programme.

Enfin, ce programme a eu un très fort potentiel formateur, en particulier pour des étudiants de 3^{ème} cycle de pays du Sud.

REFERENCES EN RELATION AVEC CE PROJET

- Besansky, N.J., Lehmann T., Fahey G.T., Fontenille D., Braack L.E., Hawley W.A. et Collins F.H. (1997). Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. *Genetics*, **147**: 1817-1828.
- Contamin H., Fandeur T., Bonnefoy S., Skouri F. Ntoumi F., Mercereau-Puijalon O. PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum* J. Clin. Microbiol. **33**, 944-951, 1995.
- Contamin, H., Fandeur T., Rogier C., Bonnefoy S., Konate L., Trape J.F. and Mercereau-Puijalon O. Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg*, **54**, 632-643, 1996
- Daubersies P., Sallenave-Sales S., Magne S., Trape J.F., Rogier C., Contamin H., Fandeur T., Mercereau-Puijalon O., Druilhe P. Rapid turn-over of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am J Trop Med Hyg* **54**, 18-26, 1996.
- Dia, I., Lochouarn L., Boccolini D., Costantini C. et Fontenille D. (2000). Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *anopheles funestus* in Senegal. *parasite*: in press.
- Dia, I., Lochouarn L., Diatta M., Sokhna C.S. et Fontenille D. (2000). Préférences trophiques des femelles endophiles d'*Anopheles funestus* au Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot* Accepté
- Diatta, M., Spiegel A., Lochouarn L. et Fontenille D. (1998). Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **92**: 270-272.
- Fontenille, D. et Lochouarn L. (1999). The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia, "The Malaria Challenge After One Hundred Years Of Malariology", Malariology Centenary Conference*, 41: 267-271. (Article commandé)
- Fontenille, D., Diatta M., Konate L., Lochouarn L., Lemasson J.J., Diagne N., Molez J.F., Rogier C., Trape J.F. et Faye O. (1995). Intérêt de l'utilisation des outils de biologie moléculaire dans l'étude de la transmission du paludisme: l'exemple des programmes conduits au Sénégal. *Med Trop (Mars)*, **55**: 52-55.
- Fontenille, D., Lochouarn L., Diagne N., Sokhna C., Lemasson J.J., Diatta M., Konate L., Faye F., Rogier C. et Trape J.F. (1997). High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*, **56**: 247-253.
- Fontenille, D., Lochouarn L., Diatta M., Sokhna C., Dia I., Diagne N., Lemasson J.J., Ba K., Tall A., Rogier C. et Trape J.F. (1997). Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **91**: 647-652.
- Konaté, L., Zwetyenga J., Rogier C., Bischoff E., Fontenille D., Tall A., Spiegel A., Trape J.F. et Mercereau-Puijalon O. (1999). Variation of *Plasmodium falciparum* MSP-1 block 2 and MSP-2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **93**: 21-28.

- Lehmann, T., Hawley W.A., Kamau L., Fontenille D., Simard F. et Collins F.H. (1996). Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and west Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, **77**: 192-200.
- Lemasson, J.J., Fontenille D., Lochouarn L., Dia I., Simard F., Ba K., Diop A., Diatta M. et Molez J.F. (1997). Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J Med Entomol*, **34**: 396-403.
- Lochouarn, L., Dia I., Boccollini D., Coluzzi M. et Fontenille D. (1998). Bionomical and cytogenetic of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **92**: 607-612.
- Lochouarn, L., Dia I., Coluzzi M., Faye O., Robert V., Simard F., Lemasson J.J. et Fontenille D. (1996). Les vecteurs du paludisme au sénégal : une systématique en évolution. *Dakar Med*, spécial congrès 1996: 55-58.
- Manguin, S., Fontenille D., Chandre F., Lochouarn L., Mouchet J., Kengne P. et Guillet P. (1999). Génétique des populations anophéliennes. *Bull Soc Pathol Exot*, **92**: 229-235.
- Mercereau-Puijalon O. Analyse moléculaire des infections par *Plasmodium falciparum* chez l'homme. *Transfus. Clin. Biol*, **6**, 44-56, 1999.
- Mercereau-Puijalon O. Le polymorphisme de *Plasmodium falciparum* et ses conséquences biologiques. *Eurobiologiste*. 2000. XXXIV, 246 1-6.
- Mercereau-Puijalon O. Revisiting host/parasite interactions: molecular analysis of parasites collected during longitudinal and cross sectional surveys in humans. *Parasite Immunol*. **18**, 173-180. 1996
- Mukabayire, O., Bocolini D., Lochouarn L., Fontenille D. et Besansky N.J. (1999). Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol*, **8**: 289-297.
- Ntoumi F., Contamin H., Rogier C., Bonnefoy S., Trape J.F. Mercereau-Puijalon O. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* MSA-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **52**, 81-88, 1995
- Ntoumi F., Rogier C., Dieye A., Trape J.-F. Millet P. and Mercereau-Puijalon O. Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* strains due to sickle cell trait Subm. Science.
- Robert F., Ntoumi F., Angel G., Diatta B., Rogier C., Fandeur T., Sarthou J.L. and Mercereau-Puijalon O. Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Sénégal. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg*. **90**, 704-711, 1996
- Simard, F., Diatta M., Lemasson J.J., Lehmann T., Collins F.H. et Fontenille D. (1996). Flux géniques chez *Anopheles gambiae*, vecteur du paludisme. Implication dans la transmission. *Dakar Med*, spécial congrès 1996: 51-55.
- Simard, F., Fontenille D., Lehmann T., Girod R., Brutus L., Gopaul R., Dournon C. et Collins F.H. (1999). High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and eastern outer islands. *Am J Trop Med Hyg*, **60**: 1000-1009.

- Simard, F., Lehmann T., Lemasson J.J., Diatta M. et Fontenille D. (2000). Persistence of *Anopheles arabiensis* during the severe dry-season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. *Molec. Entomol.* in press
- Sokhna, C.S., Diagne N., Lochouarn L., Rogier C., Trape J.F., Spiegel A. et Fontenille D. (1998). Evaluation comparée par ELISA et par dissection de l'infection plasmodiale des anophèles : conséquence sur l'estimation de la transmission du paludisme en 1995 à Ndiop, Sénégal. *Parasite*, **5**: 273-279.
- Zwetyenga, J., Rogier C., Spiegel A., Fontenille D., Trape J.F. et Mercereau-Puijalon O. (1999). A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **93**: 375-380.
- Zwetyenga, J., Rogier C., Tall A., Fontenille D., Snounou G., Trape J.F. et Mercereau-Puijalon O. (1998). No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **59**: 726-735.

COMMUNICATIONS

- Carnevale, P. et Fontenille D. (1996) Genetic diversity especially of *Anopheles* sp. Current situation, new trends and input of new tools for vector control, *Congres de la Society of Vector Ecology, Xth European meeting, septembre 1996*, Strasbourg, France.
- Dia, I., Lochouarn L., Boccolini D., Coluzzi M. et Fontenille D. (1998) Hétérogénéité génétique des populations d'*Anopheles funestus* au Sénégal, *10eme journées Dakaroises de Parasitologie, février 1998*, Dakar, Sénégal.
- Dia, I., Lochouarn L., Boccolini D., Coluzzi M. et Fontenille D. (1999) Cytogenetic heterogeneity of *Anopheles funestus* in Senegal (poster), *MIM African malaria conference*, Durban, Afrique du Sud, 14-19 mars 1999.
- Diatta, M., Spiegel A., Lochouarn L. et Fontenille D. (1998) Taux d'anthropophilie similaires chez *Anopheles gambiae* et *An. arabiensis* au Sénégal, *10eme journées Dakaroises de Parasitologie, février 1998*, Dakar, Sénégal.
- Fontenille, D. (1996) Is the african malaria vector *Anopheles funestus* actually a cryptic species complex ?, *International workshop on molecular epidemiology and evolutionary genetics of pathogenic microorganisms, juin 1996*, Atlanta, USA.
- Fontenille, D. (1998) The complexity of the malaria vectorial systems in Africa, *The malaria challenge after one hundred years of malariology, novembre 1998*, Rome, Italie.
- Fontenille, D., Faye O., Lemasson J.J., Lochouarn L., Simard F., Diatta M., Konate L. et Trape J.F. (1995) The *Anopheles gambiae* complex in senegal. A very heterogeneous transmission of malaria, *44th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, novembre 1995*, San Antonio, Texas, USA.
- Fontenille, D., Lochouarn L. et Guillet P. (1999) Genetic heterogeneity of african malaria vectors. Communication orale sur invitation, *MIM African malaria conference*, Durban, Afrique du Sud.
- Fontenille, D., Lochouarn L., Konate L., Dia I., Lemasson J.J., Diatta M., Boccolini D., Coluzzi M. et Faye O. (1996) Malaria vector complexes in Senegal : *Anopheles funestus* and *An. gambiae* s.l., *Congres de la Society of Vector Ecology, Xth European meeting, septembre 1996*, Strasbourg, France.

- Lehmann, T., Hawley W.A., Besansky N.J., Fontenille D., Simard F., Fahey T.G., Kamau L. et Collins F.H. (1996) Geographic structure of *Anopheles gambiae* (savanna form) in Africa based on microsatellite, allozyme and mitochondrial loci, *45th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, décembre 1996*, Baltimore, USA.
- Lehmann, T., Hawley W.A., Besansky N.J., Fontenille D., Simard F., Kamau L. et Collins F.H. (1997) Population genetic structure of the principal malaria vector in Africa, *Anopheles gambiae* (savanna form)., *2nd International workshop on Molecular epidemiology and evolutionary genetics of pathogenic microorganisms, mai 1997*, Montpellier, France.
- Lochouart, L., Dia I., Boccolini D., Coluzzi M. et Fontenille D. (1997) Large heterogeneity of *Anopheles funestus* in Senegal, *Congrès de la Société Entomologique d'Afrique du Sud (ESSA) et de l'Association Africaine des Entomologistes (AAIS) "Insects in African Economy and Environment"*, juillet 1997, Stellenbosch, Afrique du Sud.
- Lochouart, L., Dia I., Boccolini D., Coluzzi M. et Fontenille D. (1997) *Anopheles funestus* in Senegal, one species or sibling species ? (Poster), *46th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, novembre 1997*, Orlando, USA.
- Lochouart, L., Dia I., Boccolini D., Coluzzi M. et Fontenille D. (1999) Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal (poster), *MIM African malaria conference*, Durban, Afrique du Sud, 14-19 mars 1999.
- Puijalon, O. :- British Society for Parasitology Edinburgh 1998
- Puijalon, O. :- Colloque de la Transfusion Sanguine , Paris, Octobre 1998, conférencière invitée
- Puijalon, O. :- Colloque Institut Pasteur/Fondation Cenci Bolognetti, Rome Juin 99, conférencière invitée
- Puijalon, O. :- Fourth International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, Dakar, Sénégal, Juin 99; conférencière invitée
- Puijalon, O. :- Meeting CEE, typage PCR, Lisbonne (Novembre 97)
- Puijalon, O. :- MIM African Malaria Conference, Durban, Afrique du Sud, Mars 99 ; conférencière invitée
- Puijalon, O. :- Second Global Meeting on Parasitic Diseases, Hyderabad, Inde : Conférence Aout 1997
- Puijalon, O. :- Université Tubingen - Concerted Action on Mathematical Modelling of malaria infections (février 98)
- Puijalon, O. :- Université Tubingen, Séminaire, (Décembre 97)
- Puijalon, O. : Workshop (Assessment of the impact of Plasmodium falciparum diversity on efficacy of RTS,S malaria vaccine in The Gambia), Rockville, USA, Mai 97, Séminaire
- Simard, F., Diatta M., Lemasson J.J., Lehmann T., Collins F.H. et Fontenille D. (1996) Flux géniques chez *Anopheles gambiae* s.l., vecteur du paludisme. Implication dans la transmission, *Quarantenaire de la Société Médicale d'Afrique noire de Langue française, janvier 1996*, Dakar, Sénégal.
- Simard, F., Fontenille D., Lehmann T., Lemasson J.J., Diop A. et Collins F.H. (1996) Population genetics of the *Anopheles gambiae* complex in Senegal: preliminary results at 7 microsatellite loci, *Congrès de la Society of Vector Ecology, Xth European meeting, septembre 1996*, Strasbourg, France.
- Simard, F., Lemasson J., Diatta M. et Fontenille D. (1999) *Anopheles arabiensis* population genetics based on microsatellite markers., *IV International meeting on molecular*

epidemiology and evolutionary genetics on infectious diseases (Meegid IV), Dakar, Sénégal.

Simard, F., Lemasson J., Diatta M., Lehmann T. et Fontenille D. (1999) Geographic variability and temporal stability of microsatellite allelic composition in *Anopheles arabiensis*, *48th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Washington, DC, USA.

Simard, S., Lehmann T., Collins F. et Fontenille D. (1998) Variabilité génétique chez *Anopheles arabiensis*, *10eme journées Dakaroises de Parasitologie, février 1998*, Dakar, Sénégal.