

INTRODUCTION	5
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I.1. Généralités sur les vecteurs.....	6
I.1.1. le complexe <i>Anopheles gambiae</i>	7
I.1.2. le groupe <i>Anopheles funestus</i>	9
I.2. Génétique des populations.....	10
I.2.1 Model de Hardy Weinberg.....	11
I.2.2 Les insectes, model d'étude en génétique des populations.....	11
I.2.3. Inversions chromosomiques, adaptation à l'environnement et spéciation.....	12
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	14
II.1. Site d'étude.....	14
II.2. Méthode d'échantillonnage.....	14
II.2.1. Identification des Moustiques.....	15
II.2.2. Dépistage des Moustiques infectés par ELISA –CSP.....	15
II.2.2.1. Principe.....	15
II.2.2.2. Mode opératoire.....	16
II.2.3. Identification des membres du complexe <i>Anopheles gambiae</i> par PCR.....	17
II.2.3.1. Principe.....	17
II.3.2. Mode opératoire.....	17
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION	20
III.1. Résultats globaux.....	20
III.2. Résultats de la PCR.....	20
III.3. Cycle d'agressivité.....	21
III.4. Densité et Dynamique de transmission.....	21

III.4.1. Densités anophéliennes moyennes.....	21
III.4.2. Dynamique de transmission.....	22
III.5. Le taux d'infestation.....	23
III.6. Model de Hardy Weinberg.....	23
III.7. DISCUSSION.....	25
CONCLUSION.....	27
BIBLIOGRAPHIE.....	28

INTRODUCTION

Le paludisme reste l'un des principaux fléaux qui touche l'Afrique. Près de 130 ans après la découverte du parasite par Laveran, 100 ans après la découverte du cycle par Ross, le paludisme continue de tuer près d'un millions de personnes par an en Afrique (Rapport OMS 2009). L'impossibilité de supprimer le paludisme dans la plupart des zones d'endémie, particulièrement en Afrique, tient à de très nombreux facteurs, entre autres à la résistance des *Plasmodium* aux antipaludéens, à la résistance des vecteurs aux insecticides et aux systèmes de santé défaillants dans de nombreux pays du Sud. Le contrôle du paludisme uniquement par les vecteurs n'a permis de supprimer la maladie qu'en de très rares régions africaines, toutes en zone de paludisme instable. Les principales raisons, en plus de la résistance des vecteurs aux insecticides, sont l'impossibilité de maintenir la lutte anti-vectorielle sur de longues périodes et le fait qu'une réduction des vecteurs n'est pas toujours suivie, à moyen terme, d'une réduction sensible de la maladie. En attendant un vaccin, la recherche pour le contrôle de la maladie passe par une approche intégrée, incluant la lutte anti-vectorielle. Pour que cette lutte anti-vectorielle soit efficace, il convient de bien la cibler sur les « bons » vecteurs.

Presque partout en Afrique, la transmission est très hétérogène et les travaux un peu partout ont montré la complexité du système. Souvent plusieurs vecteurs interviennent dans une même zone. Certains de ces vecteurs sont des complexes d'espèces, dont les différents membres ont des capacités et des compétences vectorielles très variables.

Dans ce mémoire, nous allons étudier la dynamique de la transmission des vecteurs du paludisme présents à Dielmo. Pour cela nous avons réalisé des captures de moustiques sur homme et grâce à la biologie moléculaire, les différentes espèces impliquées dans cette dynamique ont pu être identifiées. L'analyse de certains paramètres entomologiques nous permettra de déterminer le rôle de chacune de ces espèces dans la transmission du paludisme.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les vecteurs

Un vecteur n'est pas une simple seringue récupérant un agent pathogène chez un vertébré pour l'injecter à un autre. C'est un point de passage obligatoire pour la diffusion de l'agent pathogène qui va soit « simplement » s'y multiplier (virus) ou y assurer une partie de son cycle (parasites). Les moustiques constituent la plus grande famille de vecteurs d'agents pathogènes du paludisme. Les moustiques ont une vie aquatique au stade larvaire puis aérienne au stade adulte (figure 1).



Figure1 : Les anophèles de la région afro-tropicale, (Source : J. Brunhes et Coll., logiciel ORSTOM Ed., 1998)

Pour réaliser leur cycle de transmission, les *Plasmodium* doivent être transmis d'un homme porteur à un autre homme après le déroulement du cycle sporogonique chez des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Cependant, toutes les espèces du genre *Anopheles* ne transmettent pas le *Plasmodium* : sur 400 espèces environ, une soixantaine est vectrice et vingt d'entre elles sont responsables de l'essentiel de la transmission (8). Le rôle de vecteur d'une espèce ou d'une population de moustiques dépend d'une part de la compatibilité génétique entre le vecteur et le parasite (compétence vectorielle) et d'autre part des caractéristiques biologiques de la population anophélienne (capacité vectorielle).

La transmission des *Plasmodium* et la biologie des principaux vecteurs en Afrique sont connues dans leurs grandes lignes depuis plus de 50 ans (25). La description puis

l'identification des espèces vectrices se faisait alors sur des critères morphologiques. Les sous-divisions intitulées sous espèces, formes, races, variétés, etc. étaient signalées sur la base de critères géographiques, comportementaux, de niveau de transmission palustre ou de petites différences morphologiques à un stade de développement donné de l'anophèle. Dès le début du vingtième siècle on s'est aperçu que ce que l'on classait dans une seule espèce, sur des critères morphologiques, pouvait regrouper plusieurs taxons, isolés génétiquement. C'est ce qu'on appelle un complexe d'espèces jumelles. Chez les anophèles les deux exemples les plus connus sont le complexe *Anopheles gambiae* et le groupe *Anopheles funestus* (26).

I.1.1. Le complexe *Anopheles gambiae*

Anopheles gambiae (figure 2) est un complexe de sept espèces: *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*, deux des vecteurs majeurs de *Plasmodium* en Afrique, ainsi que *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* A et *An. quadriannulatus* B.



Figure 2 : Femelle d'*Anopheles gambiae* gorgée

An. melas, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* et *An. quadriannulatus* B, ont un rôle nul ou faible dans l'épidémiologie de la transmission du paludisme. Leur distribution est localisée. En revanche *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent Africain, *An. gambiae* étant plutôt adapté aux zones de forêt et de savane humide alors qu'*An. arabiensis* peuple les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara (4). La zone de recouvrement de ces deux espèces est cependant très importante et on les trouve souvent en sympatrie. De plus, elles apparaissent extrêmement bien adaptées à l'homme et son environnement, d'une part en termes de préférences

trophiques, puisqu'elles présentent toutes les deux un très fort taux d'anthropophilie; d'autre part, c'est auprès de l'homme qu'elles trouvent les gîtes larvaires (5, 20) qui sont des collections d'eau stagnantes, temporaires, peu profondes, ensoleillées et faiblement chargées en matières organiques (figure 3).



Figure 3 : Gîte probable de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* (source Ndiath)

Le démantèlement de ce complexe d'espèces s'est fait initialement par l'étude des croisements entre populations-espèces à biologie et/ou répartition différente, la plupart des croisements donnant des mâles F1 stériles (22, 36). Puis l'étude du polymorphisme des chromosomes polytènes par la technique cytogénétique a révélé l'existence d'inversions chromosomiques diagnostiques, permettant de caractériser les différents membres du complexe (6). On dispose aujourd'hui d'un test PCR (Polymerase Chain Reaction) spécifique d'espèce, basé sur le polymorphisme observé au niveau des ADN ribosomaux (rDNA). Cet outil moléculaire permet d'identifier rapidement les spécimens collectés sur le terrain à n'importe quel stade de leur développement (31).

Le potentiel adaptatif d'*An. gambiae s.s.* à des environnements très différents est en grande partie lié à la présence d'inversions chromosomiques polymorphes observées notamment sur le chromosome 2. Cinq "formes chromosomiques", ont ainsi été définies en Afrique de l'Ouest: les formes **Forêt**, **Savane**, **Bamako**, **Bissau** et **Mopti** (7, 33) qui se répartissent principalement en fonction du degré d'aridité du milieu. Ainsi, la forme **Forêt**, caractérisée par l'arrangement standard (pas d'inversion) sur les deux bras du chromosome 2, peuple les environnements de forêt et de savane les plus humides, les formes **Savane** ou **Mopti** se retrouvant quant à elles dans des environnements plus secs, voire très arides. Depuis

la fin des années 90, plusieurs équipes de recherche ont appliqué une approche moléculaire à cette problématique de spéciation chez *An. gambiae*. Ainsi l'étude des fragments intergéniques des rDNA, a permis de définir des sites RFLP différenciant Mopti d'une part et Savane-Bamako d'autre part. Il a alors été possible de synthétiser des amorces pour une PCR spécifique permettant de révéler deux profils différents qu'on a appelés M et S (15, 16). Si au Mali, au Burkina-Faso et en Côte d'Ivoire tous les spécimens Mopti appartiennent à la forme M alors que Savane et Bamako présentent toujours le profil S, ce n'est pas le cas dans les autres régions d'Afrique. Cependant quelles que soient les régions d'Afrique, il a été clairement démontré que les flux de gènes entre la forme M et la forme S sont très réduits, démontrant un phénomène de spéciation en cours (3, 15).

I.1.2. Le groupe *Anopheles funestus*

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. Le développement pré-imaginal est relativement long (20 à 30 jours) et se fait dans des gîtes d'eau profonde et claire, ombragés à caractère plus ou moins permanent avec une végétation émergente ou flottante, à faible salinité et peu riche en matières organiques (figure 4).



Figure 4 : Gîte préférentiel d'*An. funestus* (source D. Fontenille)

Ce sont généralement les marécages herbeux, les rizières enherbées, les bords des lacs, des ruisseaux et des rivières (1, 21) et exceptionnellement dans les réserves d'eau à usage domestique. La densité de la population imaginaire varie avec la pluviosité, avec un certain retard par rapport à *An.gambiae s.l* .Ce retard est dû à deux facteurs : d'une part, la création

des gîtes d'eaux profondes et d'autre part le développement pré-imaginal relativement long (20).

Dans le sahel, il a considérablement régressé, de plus de 100km vers le sud, au Sénégal et au Niger (17).

Au Sénégal, naguère présent dans l'ensemble du pays *An.funestus* a disparu de nombreuses localités en raison du déficit pluviométrique enregistré au cours des années 1980 (18, 35, 24). Dans les zones de coexistence avec *An.gambiae s.l*; l'apparition tardive d'*An.funestus* lui permet d'assurer la continuité de la transmission (34). Depuis quelques années on constate une réapparition d'*An.funestus* sur tout le long de la vallée du fleuve Sénégal (24). Tout comme *An.gambiae s.l*, *An.funestus* préfère piquer l'homme mais on observe parfois une déviation trophique en faveur du bétail, lorsque celui-ci est accessible en quantité (29).

I.2. Génétique des Populations

La génétique classique, est apparue comme une science de l'hérédité. Le croisement n'est possible en réalité que chez les espèces possédant une sexualité et nécessitant des individus de phénotypes différents. Cette méthodologie a été mise en place au début du XXème siècle par **Mendel** grâce à ses célèbres expériences sur les petits pois. Puis les scientifiques se sont intéressés à la distribution des gènes à l'échelle d'une population entière : la génétique des populations. Les progrès récents en biologie moléculaire ont permis de disposer d'informations génétiques au niveau des séquences d'ADN et ont apporté un regard nouveau sur les processus démographiques et évolutifs auxquels sont soumises les populations naturelles.

Elle repose sur la construction de modèles mathématiques qui visent à décrire la matière dont les fréquences des gènes évoluent. Cette discipline étudie la répartition de la variabilité génétique entre et au sein des populations d'une même espèce définies dans l'espace et dans le temps. Elle s'attache aussi à préciser les processus à l'origine de la variabilité génétique : la mutation, la recombinaison, la migration, la sélection, la dérive génétique etc...

Pour les généticiens, les populations sont considérées comme les unités principales à l'échelle desquelles interviennent les processus évolutifs. Cela implique que les individus d'une espèce ne se répartissent pas au hasard au sein de son aire de distribution mais selon une structure spatiale liée entre autre à l'hétérogénéité du milieu. Les discontinuités spatiales

et temporelles des habitats dans lesquelles évoluent les individus, se traduisent par une structuration géographique des populations. Deux composantes interviennent dans la structure géographique : la structure démographique et la structure génétique. La structure démographique rend compte des processus (par exemple, la naissance, la longévité, l'immigration ou l'émigration) qui influent sur le nombre et la répartition des phénotypes. La structure génétique, quant à elle, se décrit comme la répartition de la variation génétique résultant d'événements de migration, de processus de sélection, de mutation et de dérive génétique.

I.2.1. Modèle de Hardy Weinberg

Le premier modèle décrivant la composition génotypique d'une population naturelle a été conçu indépendamment par **G.H. Hardy** et **W. Weinberg** en **1908**. Ce modèle de référence en génétique des populations émet que dans une population panmictique d'effectif élevé et qui n'est soumise à aucune force évolutive, la fréquence des génotypes et des allèles reste stable d'une génération à l'autre. Tout écart par rapport à cet équilibre peut être analysé en fonction des modèles théoriques élaborés et des facteurs influençant l'évolution de la population analysée. Parmi ces facteurs on peut citer :

- le mode de reproduction,
- la migration et la dérive génétique,
- la mutation et la sélection.

De cet équilibre découle la distribution génotypique : $p^2 + q^2 + 2pq = 1$

Soit A et a, deux allèles de fréquence respectivement p et q. Avec :

p^2 : la fréquence d'un génotype homozygote AA pour deux allèles A/

q^2 : la fréquence d'un génotype homozygote aa pour deux allèles a/

$2pq$: la fréquence d'un génotype hétérozygote Aa pour un allèle A/ et un allèle a/

I.2.2. Les insectes, modèle d'étude en génétique des populations

Les applications de la génétique des populations à l'entomologie médicale sont multiples et fournissent de précieuses informations sur la compréhension du rôle joué par les arthropodes vecteurs dans l'épidémiologie des maladies et pour l'élaboration de stratégie de contrôle. L'étude de la structure des populations aide à la détermination du statut taxonomique d'un organisme pour ainsi mieux définir son rôle dans la transmission d'un agent pathogène. Elle permet également d'évaluer la variabilité génétique des espèces

vectrices et l'estimation de leurs capacités d'adaptation aux différentes pressions de sélection. Pour finir, ces études permettent l'estimation des flux génétiques permettant d'appréhender le degré d'isolement génétique des populations et la circulation de gènes d'intérêts comme des gènes de résistance aux insecticides ou encore des gènes contrôlant la compétence vectorielle.

I.2.3 Inversions chromosomiques, adaptation à l'environnement et spéciation : Exemple du complexe *Anopheles gambiae*

White & Magayuka en 1972, évoquent pour la première fois la possible relation entre l'adaptation à l'environnement et les inversions chromosomiques. Les associations de gènes favorables à un environnement particulier seraient protégées des recombinaisons à l'intérieur des inversions. Les inversions chromosomiques pourraient alors être sélectionnées par des conditions environnementales. Cette hypothèse a été largement utilisée pour expliquer le profil de la répartition des inversions chromosomiques chez *Anopheles gambiae* (6).

Pour tester cette hypothèse, **Fontenille et al., 2007**, ont réalisé une analyse comparative détaillée du polymorphisme et de la distribution des inversions paracentriques sur les populations de deux vecteurs du paludisme : *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. Ces deux espèces ont été collectées le long d'un transect latitudinal au Cameroun. Les résultats ont montré que la distribution spatiale des inversions chromosomiques homologues est significativement corrélée entre ces deux espèces. Ils ont conclu alors que ces deux espèces utilisent des mécanismes analogues, comme les inversions chromosomiques pour s'adapter aux différents environnements existants en Afrique.

De manière générale, une relation directe de cause à effet entre les inversions chromosomiques et la spéciation semble être plutôt exceptionnelle et requiert des conditions particulières. Les principales connaissances sur le lien entre inversions chromosomiques et spéciation sont présentées par **Navarro et al., 2003**. Les réarrangements chromosomiques peuvent être à l'origine de spéciation à cause des aberrations méiotiques qu'ils peuvent provoquer lors des recombinaisons et qui peuvent engendrer une baisse de la fertilité des hybrides.

Les causes écologiques de la spéciation ont par contre été bien documentées dans diverses espèces. L'hypothèse la plus largement reconnue expliquant la spéciation provoquée par des facteurs environnementaux est la « spéciation écologique », c'est à dire qu'une sélection divergente exercée par différents environnements ou par compétition sur les

ressources engendre des différences phénotypiques puis un isolement reproductif. L'isolement peut être pré-zygotique ou post-zygotique. L'isolement pré-zygotique peut s'exercer par une sélection sexuelle due à la divergence phénotypique, qui peut par exemple être la taille des individus. L'isolement post-zygotique peut être dû à des mécanismes écologiques par réduction de la valeur sélective des hybrides. Ce type d'isolement post-zygotique est « environnement dépendant ». Les conditions environnementales peuvent donc être à l'origine d'une spéciation par isolement pré ou post-zygotique. Quand l'isolement est post-zygotique, il peut varier dans le temps et dans l'espace en fonction des conditions écologiques.

En conclusion, il est assez probable que les inversions chromosomiques provoquent elles-mêmes une spéciation, elles peuvent par contre être sélectionnées par des conditions environnementales. Les conditions environnementales, elles peuvent être à l'origine de spéciation. Il peut donc exister une corrélation entre inversions chromosomiques et le lien étant indirect, cette corrélation peut ne pas être systématique, c'est ce qui a d'ailleurs été observé chez *An. gambiae*.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Site d'étude

Les études ont été réalisées dans le village de Dielmo de juillet à octobre 2009. Ce village compte un peu plus 300 habitants repartis dans 29 concessions. Les enfants de moins de 15 ans représentent 46,8% de la population. La population de Dielmo est en majorité d'ethnie sérère (78 %), les Mandingues représentent 13%, les wolofs 3% et les autres ethnies 6 %. C'est une population très stable plus de 2/3 des villageois y résident depuis la naissance. Le village est situé au bord d'une petite rivière d'eau douce et permanente aux rives marécageuses. Cette rivière offre aux villageois la possibilité de cultures maraîchères pendant la saison sèche et constitue ainsi un gîte permanent pour les larves d'anophèles.

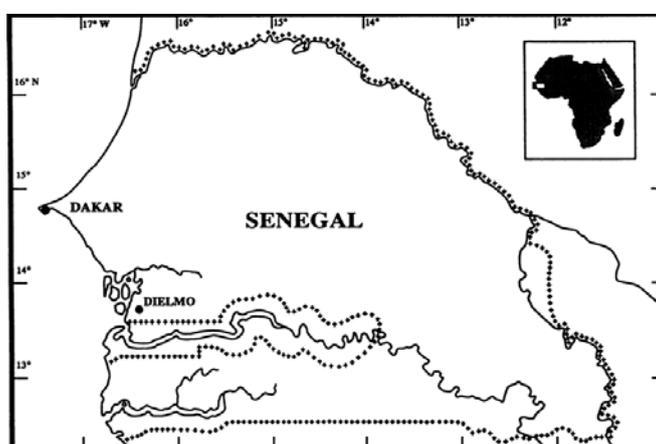


Figure 5 : Carte du Sénégal montrant la localisation du site d'étude

II.2. Méthode d'échantillonnage

L'échantillonnage des populations de moustiques a été effectué au moyen de captures nocturnes sur appâts humains. Les captures ont été effectuées par quatre équipes de deux captureurs, chacun travaillant et se reposant une heure sur deux de 19 heures à 07 heures du matin. Deux équipes opéraient à l'intérieur des habitations (chambres à coucher) et les deux autres à l'extérieur (cour ou véranda).

Le Captureur, assis et jambes nues, est muni d'une lampe torche qu'il allume dès qu'il perçoit le contact d'un moustique prêt à se gorger. C'est en ce moment qu'il surprend le moustique avec un tube à hémolyse qu'il bouche avec du coton avant de l'introduire dans le sachet correspondant à l'heure et au lieu de capture. A l'issue de chaque tranche horaire la récolte est acheminée au laboratoire (figure 6).

Trois séances de captures sur appâts humain totalisant 12 hommes / nuit / mois à raison de 4 hommes-nuits par séances ont été régulièrement organisées de juillet à octobre 2009.



Figure 6 : Capture nocturne sur appât humain (source Ndiath)

II.2.1. Identification des Moustiques

Tous les moustiques capturés sont identifiés à l'aide d'une clé de détermination (12). Une base de données où un numéro unique est attribué à chaque anophèle est constituée. Les moustiques sont conservés individuellement dans des tubes eppendorfs contenant un dessiccateur (silicagel) et acheminés au laboratoire de Dakar. Les têtes et les thorax de ces moustiques sont séparés du reste et placés individuellement dans de nouveaux tubes portant le même numéro. Le premier tube servira pour la détermination de l'antigène circumsporozoïtique par la méthode ELISA. Le deuxième tube servira pour la détermination précise de l'espèce et de la forme moléculaire en PCR.

II.2.2 Dépistage des moustiques infectés

II.2.2.1 Principe

Il s'agit de détecter l'antigène circumsporozoïtique (CSP) de *Plasmodium* humain chez les moustiques grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques d'espèce et de stade. La technique utilisée est celle de " l'ELISA sandwich " indirecte de **BURKOT et al., (1984)** modifiée par **WIRTZ et al., (1987)**. Elle consiste à coincer l'antigène circumsporozoïtique (CSP) entre un anticorps monoclonal de capture anti-CSP (fixé sur les parois de la plaque) et un autre anticorps monoclonal anti-CSP conjugué à la peroxydase (figure 7).

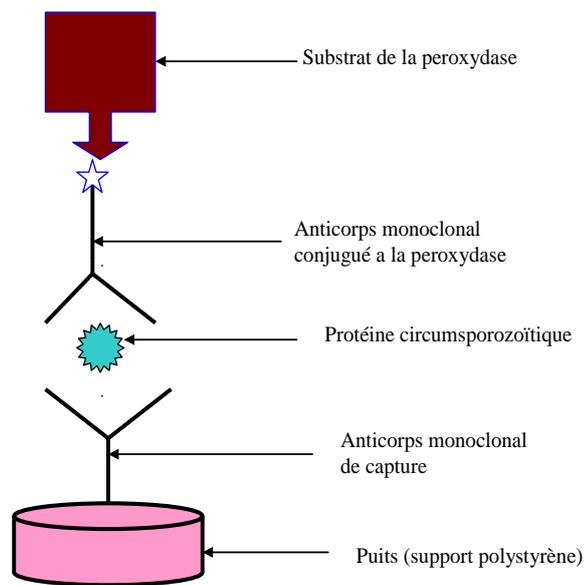


Figure 7 : Principe de l'ELISA sandwich

II.2.2.2. Mode opératoire

Les têtes-thorax sont mis dans de nouveaux tubes numérotés, on rajoute dans chaque tube 20µl d'une solution de NP (Nonidet) 40. Après incubation pendant 1h sur la paillasse ils sont broyés dans 2 fois 190µl de BB (Blocking Buffer).

Les plaques ELISA sont sensibilisées à la veille de la manipulation. On introduit dans chaque puits 50µl d'**ACm de CAPTURE**. Ces plaques sont laissées toute la nuit sur la paillasse.

Le matin, elles sont vidées sans être lavées. Dans chaque puits on y met 200µl de la solution de BB ensuite on le laisse pendant 1h sur la paillasse. Pendant ce temps on décongèle les broyats de moustiques. A la fin de l'heure les plaques sont à nouveau vidées de la solution de BB sans être lavées. On introduit dans chaque puits 50µl du broyat de moustique. Il faudra vérifier qu'on le met dans le bon puits pour éviter tout risque de contamination. Les plaques sont à nouveau laissées pendant 2h sur la paillasse. Environ 10 mn avant la fin de l'heure, on prépare les **ACm CONJUGUES**. On vide les plaques qu'on lave 2 fois avec la solution de PBS/ TWEEN 20. On met 50µl/puits d'**ACm CONJUGUES**. Les plaques sont laissées pendant 1h sur la paillasse. 5mn avant l'heure on prépare le **SUBSTRAT de la peroxydase**. A la fin de l'heure les plaques sont vidées puis lavées 4 fois au PBS/ TWEEN 20 et on introduit

100µl/puits de **SUBSTRAT**. Après 30mn dans l'obscurité on ajoute 50µl d'acide sulfurique dans chaque puits. Les plaques sont passées au lecteur ELISA à 450 et 620nm.

II.2.3. Identification des membres du complexe *Anopheles gambiae* par PCR

II.2.3.1. Principe

La PCR « **Polymerase Chain Reaction** » est une technique de réplication ciblée in vitro. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une série de réaction de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou « primers » en anglais définissent alors en la bornant, la séquence à amplifier. Imaginée par **K.Mullis en 1985**, la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), qui permet une automatisation de la technique.

II.2.3.2. Mode opératoire

II.2.3.2.1 Extraction de l'ADN au Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

- Broyer chaque échantillon dans 200µl de CTAB 2%,
- Placer au bain marie à 65° pendant 5 minutes
- Ajouter 200µl de chloroforme-Mélanger par inversion
- Centrifuger pendant 5 minutes à 12000 rmp à TA
- Prélever le surnageant et la mettre dans un autre tube portant le même numéro
- Ajouter 200µl d'isopropanol dans le tube contenant le surnageant-Bien mélangé par inversion
- Centrifuger 15 minutes à 12000 rmp à TA
- Vider l'isopropanol et bien égoutter
- Ajouter 200µl d'éthanol à 70°
- Centrifuger 5minutes à 12000 rmp
- Vider l'éthanol

- Sécher le culot 5 minutes maximum au speed-vac
- Reprendre avec 20µl d'eau pure et stérile
- Incuber à 55°C pendant 5 min pour resuspendre le culot. Mélanger. Stocker à -20°C.

II.2.3.2.2 Vérification de la présence de l'ADN

- Préparer un gel d'agarose à 1% avec du tampon TBE 1X
- Plonger le gel dans la cuve de migration du tampon TBE 1 X (veiller à ce que le tampon cuve bien le gel)
- Mélanger 10µl de solution de l'ADN avec du bleu de bromophénol et l'introduire dans les puits (un puits par échantillon)
- Le premier puits est réservé au marqueur de taille et les deux derniers aux témoins positifs et négatifs
- Refermer la cuve et vérifier les paramètres électriques
- Démarrer la migration (100Volts pendant 30 minutes).

II.2.3.2.3 Conditions de la PCR

Réactifs	Pour 1tube	Pour 100 tubes
Tampon taq10 X	2,5	250
Mgcl2	1	100
dNTP1/10	2	200
R3	0,5	50
R5	0,5	50
Mop int	0,8	80
BS int 1/10	0,15	15
Enzyme	0,1	10
H2O	13,45	1345
ADN 1/15	4	40

Tableau 1 : Calcul des réactifs pour la PCR

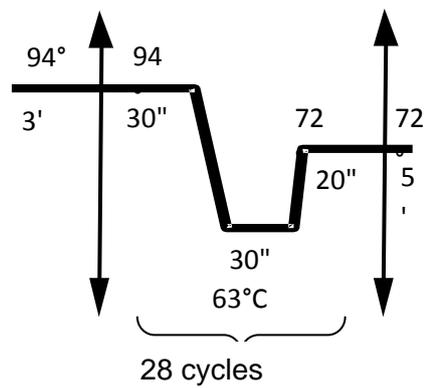


Figure 8 : Cycle de la PCR des formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae*

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats globaux

De juillet à octobre 2009, 12 séances de capture nocturne sur appât humain (44 hommes-nuits) ont été effectuées à Dielmo. Elles ont permis de faire la collecte de 6507 moustiques (Tableau 2).

Espèces	Nombre
<i>Aedes</i>	4330
<i>Anopheles gambiae</i>	1771
<i>Anopheles funestus</i>	14
<i>Anopheles pharaonsis</i>	06
<i>Anopheles rufipes</i>	10
<i>Anopheles zeimanni</i>	07
<i>Culex</i>	367
<i>Mansonai</i>	02
Total	6507

Tableau 2 : Résultats globaux des moustiques capturés à Dielmo : juillet-octobre 2009

III.2. Résultats après PCR

Les études de la biologie moléculaire des membres du complexe *An.gambiae* ont donné les résultats suivants (Tableau 3).

Espèces	Nombre
<i>An. arabiensis</i>	49
Forme moléculaire M d' <i>An.gambiae s.s.</i>	1127
Forme moléculaire S d' <i>An.gambiae s.s.</i>	516
Hétérozygotes MS	17
non identifiées	27
Total	1736

Tableau 3 : Résultats des moustiques identifiés après PCR

III.3. Cycle d'agressivité

L'agressivité commence très tôt pour toutes les espèces d'anophèles, bien avant que les gens aillent se coucher. Très faible entre 19h et 20h (0,02P/H/N), ce nombre a régulièrement augmenté au cours de la nuit pour atteindre un premier pic à 02h pour la forme moléculaire M et S. Le deuxième pic de la forme moléculaire M se situe aux environs de 05h du matin (figure 9).

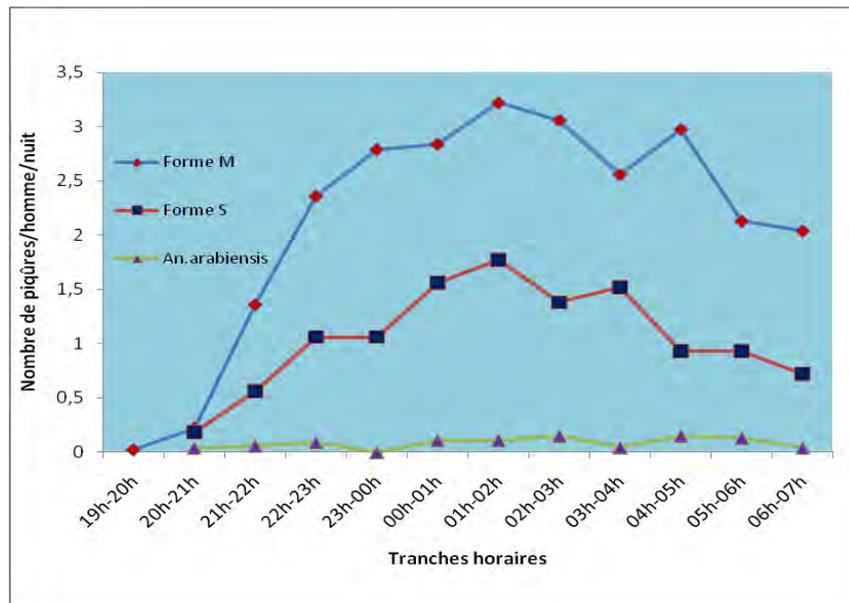


Figure 9 : Cycle horaire d'agressivité des anophèles à Dielmo : juillet-octobre 2009

III.4. Densités et dynamique de transmission

III.4.1. Densités anophéliennes moyennes

La densité anophélienne moyenne a été de 38,45P/H/N dont 1,11P/H/N pour *An. arabiensis*, 25,61P/H/N pour la forme moléculaire M et 11,72P/H/N pour la forme moléculaire S. La densité de la forme moléculaire M d'*An. gambiae* a augmenté régulièrement de juillet à septembre où elle atteint le maximum (18,38 P/H/N). Elle a ensuite subi une baisse très remarquable au mois d'octobre (1,36P/H/N). Contrairement à la densité de la forme M, la densité de la forme moléculaire S a débuté au mois de juillet et a augmenté légèrement au mois d'août suivi d'une baisse au mois d'octobre. La densité d'*An. arabiensis* est restée généralement faible pendant toute la durée de notre étude.

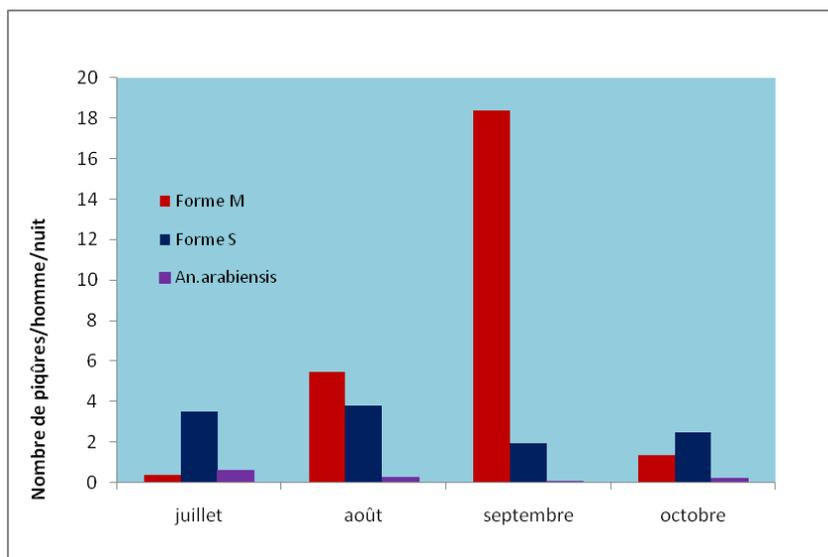


Figure 10 : Variations mensuelles de la densité anophélienne à Dielmo : juillet-octobre 2009

III.4.2. Dynamique de transmission

Dés les premières pluies (juillet), la forme moléculaire S commence à se mettre en place, mais au fur et à mesure que la pluviométrie augmente, la forme moléculaire M prédomine avec un pic au mois de septembre. Et en fin de saison des pluies (octobre), la forme moléculaire S reprend le relais.

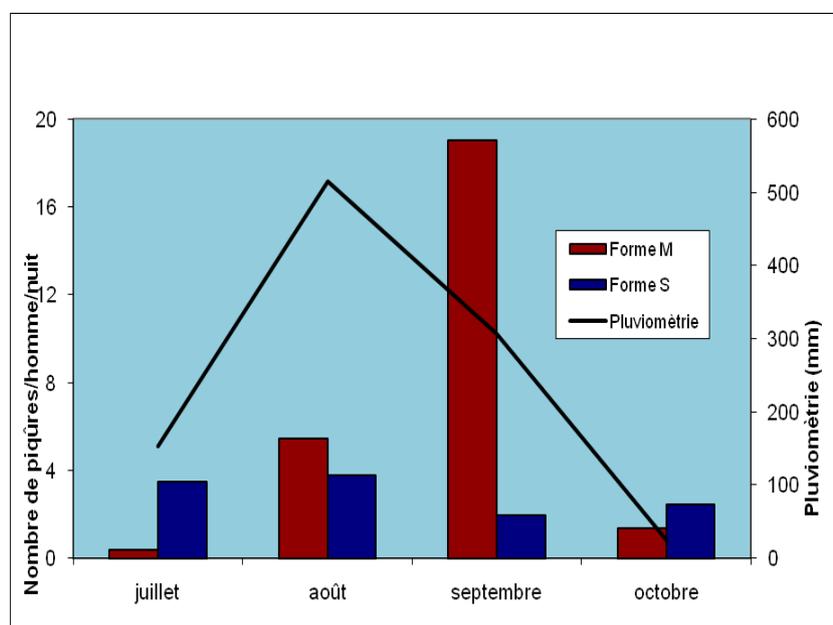


Figure 11 : Variations mensuelles de la densité anophélienne en fonction de la pluviométrie : juillet à octobre 2009

III.5. Le taux d'infestation

Au total, les têtes et thorax des 1830 anophèles femelles ont été testés en ELISA-CSP pour la recherche de l'antigène circumsporozoïtique. Celui-ci a été retrouvé chez 3 femelles, soit un indice circumsporozoïtique moyen (ICSP) de 0,16%. Ce taux a été de 0%, 0,26% et 0% respectivement pour *An. arabiensis*, Les formes moléculaires M et S (Tableau 4).

Espèces	Testés	Positifs	ICSP
<i>An. arabiensis</i>	49	0	0%
Forme moléculaire M	1127	3	0.26%
Forme moléculaire S	516	0	0%
Total	1692	3	0.17%

Tableau 4 : Capture sur Homme ; ELISA-CSP : juillet-octobre 2009

III.6. Model de Hardy Weinberg

A Dielmo les deux populations M et S d'*An. gambiae* vivent en sympatrie. Le nombre total d'individus observé est de 1659 répartis comme suit :

- Nombre d'individus de forme moléculaire M est de 1127, soit une fréquence de 67,93%
- Nombre d'individus de forme moléculaire S est de 516, soit une fréquence de 31,10%
- Nombre d'individus hétérozygotes MS est de 16 soit une fréquence de 0,96%

Les fréquences alléliques observées sont :

Pour la forme moléculaire M(p) : $[(1127*2) + 16 / (1659*2)] = 0,68$

Pour la forme moléculaire S(q) : $[(516*2) + 16 / (1659*2)] = 0,31$

Si l'équilibre de Hardy Weinberg est respecté, on peut calculer la fréquence et le nombre d'individus attendus.

Pour la forme moléculaire M la fréquence attendue est de $p^2=0,46$

Pour la forme moléculaire S, la fréquence attendue est de $q^2=0,09$ et la fréquence MS attendue est de $2pq$, soit 0,42 (699 hétérozygotes MS) : un déficit d'hétérozygotes MS a été notée. On

s'attendait à 699 individus hétérozygotes, et on a obtenu 16. Le nombre d'hybrides MS est largement inférieur à ce qu'on devrait avoir si les croisements étaient panmictiques.

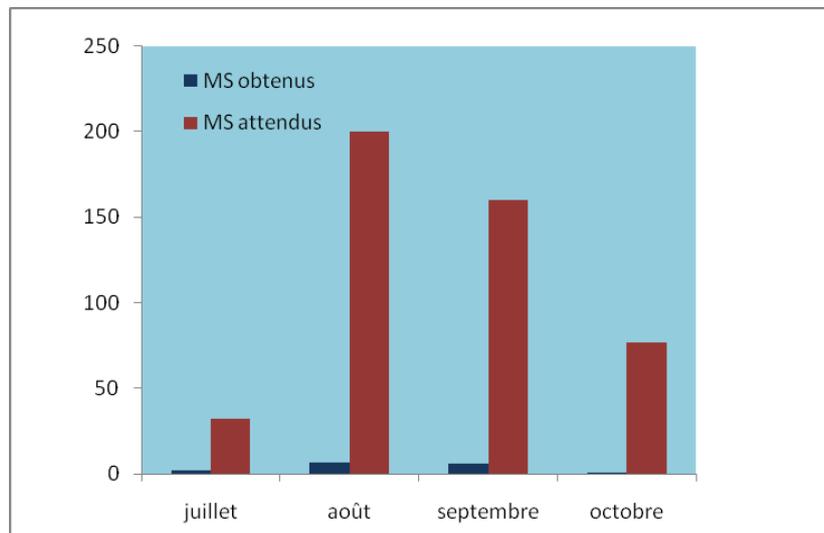


Figure 12 : Variations mensuelles du nombre d'hybrides attendu et obtenu à Dielmo :
juillet-octobre 2009

III.7. DISCUSSION

L'étude de la dynamique de transmission a permis de montrer la présence à Dielmo des 2 formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* (*Anopheles gambiae*) et 5 autres espèces anophéliennes (*An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. pharaonsis*, *An. ziemanni* et *An. rufipes*) parmi les 20 espèces anophéliennes répertoriées au Sénégal (12, 13, 23, 27, 32). Le climat (précipitations, température, humidité relative) est un des facteurs qui agit directement sur le bon développement larvaire des anophèles et il change nettement tout au long de l'année. Ainsi, toute variation climatique se traduit généralement par une modification des gîtes larvaires qui affecte directement la population anophélienne.

Anopheles gambiae a été l'espèce la plus fréquemment rencontrée, en effet pendant cette période de la saison des pluies, on observe la mise en place de gîtes d'eau peu profonde et bien ensoleillés qui sont favorables au développement des larves d'*Anopheles gambiae* (28).

Anopheles funestus a été faiblement capturée au cours de notre période d'étude. Son développement larvaire nécessite des gîtes d'eau profonde, claire, permanents ombragés par la végétation (herbes, végétation flottante) et ce type de gîte est assuré par la rivière. Mais pendant la saison des pluies cette rivière est lessivée par les eaux de pluies entraînant avec elle les larves d'*Anopheles funestus*. (28, 34).

Anopheles arabiensis a eu une densité relativement faible pendant toute la saison des pluies. Ceci est lié à l'absence de gîtes préférentiels qui sont constitués par les emprunts de pas de zébus (20, 23).

Le phénomène de remplacement progressif d'une espèce par une autre a été précédemment décrit à Dielmo (19, 34); à Kédougou (10, 27) au Cameroun (2); au Burkina Faso (30) et au Mali (11). Ce phénomène confirme les préférences écologiques (gîtes, pluviométrie, température,...) de chaque espèce anophélienne (28).

Lorsque les premières pluies se sont installées, on note une présence de la forme moléculaire S mais celle de la forme M est très faible. Mais la pluviométrie étant cumulative on observe une augmentation progressive des gîtes larvaires de la forme M jusqu'au mois de septembre où elle atteint son pic (27). Elle semblerait avoir une aire de répartition plus large et se développerait surtout sur les gîtes larvaires temporaires créés par les pluies abondantes. La forme S semble être plus résistante aux changements climatiques que la forme moléculaire

M, ce qui expliquerait la disparition rapide des formes M dès la baisse relative de la pluviométrie au mois septembre. (37)

Seule la forme moléculaire M a été trouvée porteuse de l'antigène CSP, ce qui laisse supposer qu'elle serait plus susceptible à l'infection par *Plasmodium falciparum* que la forme moléculaire S. Ce taux est relativement faible par rapport aux années précédentes (27, 34, 24). Ces résultats semblent traduire le net recul du paludisme dans cette localité.

Equilibre de Hardy Weinberg

Les niveaux d'hybridation existent entre les formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae*, un mécanisme par lequel les gènes adaptatifs peuvent s'échanger les uns des autres, y compris les gènes de résistance aux insecticides (14, 38). Les caractéristiques génétiques des formes moléculaires M et S et leur répartition géographique sont connues et ont été récemment passées en revue (9, 39). Mais, quelque soit la région, il a été clairement démontré que le transfert de gènes entre les formes M et S est très limité. Les travaux de **Wondji et al., 2002 ; 2005** au Cameroun, ceux de **Yawson et al., en 2007** au Ghana, de **Della Torre et al., 2005** au Mali et Burkina Faso montrent qu'aucun hybride MS n'a été trouvé.

Au cours de notre étude, on a eu 0,96% d'hybride MS, ce taux est très proche de ceux des travaux de **Della Torre et al., en 2001**, ils ont recensé 0.26% d'hybrides dans tout l'Afrique de l'Ouest. Ces auteurs ont pensé à une contamination plutôt qu'à un croisement entre les deux formes moléculaires M et S. Dans le domaine de l'échantillon de l'Afrique occidentale, le manque de différenciation entre les formes M et S reflète probablement l'introgession substantielle, et les obstacles écologiques semblent être de plus grande importance dans la restriction des gènes.

Par contre les études effectuées par **Ndiath et al., en 2003** avaient montré un taux de 3 % d'hétérozygotes. Par rapport à nos résultats on peut alors affirmer que le processus de spéciation entre les formes M et S est en cours.

CONCLUSION

La diversité des écosystèmes africains, et les changements qu'ils connaissent sous l'effet des activités humaines, font que les vecteurs du paludisme sont très variés, et en perpétuelle évolution. La systématique des vecteurs de *Plasmodium* reflète bien cette diversité, et alors que l'on croyait bien connaître les vecteurs majeurs, on s'aperçoit, par des observations de terrain approfondies, renforcées par des études de génétique et de biologie moléculaire, que la situation est plus complexe que prévue. Chez *Anopheles gambiae s.s.* des populations sont structurées, montrant des phénomènes de spéciation en cours. D'autres observations sont pour le moment plus difficiles à interpréter, reflétant probablement des adaptations locales de populations à divers environnements sans que des barrières génétiques aient encore pu se mettre en place, comme chez *Anopheles. funestus*. La connaissance des espèces et des populations est nécessaire si on veut rendre la lutte anti-vectorielle la plus efficace possible. Par ailleurs la compréhension de la génétique des populations, de la systématique et de la phylogénie des espèces vectrices, pourra permettre de retracer l'histoire naturelle et l'évolution des vecteurs du paludisme en Afrique.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABONNENC E - Culicides et autre Arthropodes vulnérants. Le parc national du Niokolo-koba. *Memoires IFAN*, 1956, **Fascicule I**, 183-196.
2. ANTONIO-NKONDJIO C, AWONO-AMBENE P, TOTO JC, MEUNIER JY, ZEBAZE-KEMLEU S, *et al.* - High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J Med Entomol*, 2002, **39**, 350-355.
3. CHANDRE F, MANGUIN S, BRENGUES C, DOSSOU YOVO J, DARRIET F, *et al.* - Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia*, 1999, **41**, 319-22.
4. COETZEE M, CRAIG M, & LE SUEUR D - Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today*, 2000, **16**, 74-7.
5. COLUZZI M - *Plasmodium falciparum* en Afrique subsaharienne. Spéciation récente des vecteurs, transmissibilité, évolution de la pathogénèse / contrôle de la maladie et capacité vectorielle. *Ann Inst Pasteur Actualités*, 2002, 81-99.
6. COLUZZI M, SABATINI A, & PETRARCA V - Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *An. gambiae* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, **73**, 483-497.
7. COLUZZI M, PETRARCA V, & DI DECO MA - Chromosomal inversion interdegradation an incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bull Zool*, 1985, **52**, 45-63.
8. DANIS M & MOUCHET J - Analyse d'ouvrage sure le paludisme. *Cahier Santé*, 1991, **1**, 252-253.
9. DELLA TORRE A, TU Z, & PETRARCA V - On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, **35**, 755-69.
10. DIA I, DIOP T, RAKOTOARIVONY I, KENGNE P, & FONTENILLE D - Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol*, 2003, **40**, 279-83.
11. DIABATE A, DABIRE RK, KIM EH, DALTON R, MILLOGO N, *et al.* - Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol*, 2005, **42**, 548-53.

12. DIAGNE N, FONTENILLE D, KONATE L, FAYE O, LAMIZANA MT, *et al.* - [Anopheles of Senegal. An annotated and illustrated list]. *Bull Soc Pathol Exot*, 1994, **87**, 267-77.
13. DIAGNE NA-*Le paludisme à Dielmo (Sénégal). Etude de la transmission et observations parasitologiques et cliniques chez les femmes enceintes.* Université Cheikh Anta Diop, Dakar, 1992.
14. FANELLO C, SANTOLAMAZZA F, & DELLA TORRE A - Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol*, 2002, **16**, 461-4.
15. FAVIA G, LANFRANCOTTI A, SPANOS L, SIDEN-KIAMOS I, & LOUIS C - Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 2001, **10**, 19-23.
16. FAVIA G, DELLA TORRE A, BAGAYOKO M, LANFRANCOTTI A, SAGNON NF, *et al.* - Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol. Biol.*, 1997, **6**, 377-383.
17. FAYE FBK-*Plasmodium ovale à Dielmo (Sénégal). Etude parasito-clinique et observations entomologiques.* Université Cheikh Anta Diop, Dakar, 1995.
18. FAYE O, FONTENILLE D, HERVE JP, DIACK PA, DIALLO S, & MOUCHET J - Le paludisme dans la région sahérianne du Sénégal. 1. Mesure de la transmission entomologique. *Ann Soc Belg Med Trop*, 1993, **73**, 21-30.
19. FONTENILLE D, LOCHOUARN L, DIAGNE N, SOKHNA C, LEMASSON JJ, *et al.* - High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997, **56**, 247-53.
20. GILLIES MT & DE MEILLON B - The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian geographical region). *Pub. of the Sth. Afr. Inst. Med. Res.*, 1968, **54**, 343.
21. HAMON J, ADAM JP, & GRJEBINE A - Observations sur la répartition et le comportement des anophèles de l'Afrique équatoriale française du Cameroun et de l'Afrique occidentale. *Bulletin of the World Health Organization*, 1956, **15**, 549-591.
22. HUNT RH, COETZEE M, & FETTENE M - The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, **92**, 231-5.
23. KONATE L-*Epidémiologie du paludisme dans un village de savanne soudanienne: Dielmo, Sénégal.* UCAD, Dakar, 1991.
24. KONATE L, DIOP A, SY N, FAYE MN, DIENG Y, *et al.* - Comeback of *Anopheles funestus* in Sahelian Senegal. *Lancet*, 2001, **358**, 336.

25. MACDONALD G - The epidemiology and control of malaria. *Oxford University Press, London, 1957, 252.*
26. MOUCHET J, CARNEVALE P, COOSEMANS M, JULVEZ J, MANGUIN S, *et al.* - Biodiversité du paludisme dans le monde. *John Libbey Eurotext, 2004, 67-73.*
27. NDIATH MO-*Dynamique de transmission de Plasmodium par les formes moléculaires M et S d'An.gambiae et susceptibilité comparée à l'infection par P.falciparum.*UCAD, Dakar,2003.
28. ROBERT V - Les vecteurs du paludisme. *Etudes entomologiques, 2001, 3.*
29. ROBERT V & CARNEVALE P - Les vecteurs des paludismes en Afrique subsaharienne. *Etudes médicales, 1984, 2, 79-90.*
30. ROBERT V, CARNEVALE P, OUÉDRAOGO V, PETRARCA V, & COLUZZI M - Transmission du paludisme humain dans un village de savane du Sud-Ouest du Burkina Faso. *Ann. Soc. belge Med. Trop., 1988, 68, 107-121.*
31. SCOTT JA, BROGDON W, & COLLINS FH - Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg, 1993, 49, 520-9.*
32. SOKHNA CS-*Transmission du paludisme à Dielmo (Sénégal) et relation entre le délai de réinfection après chimiothérapie et différents paramètres épidémiologiques.* Université Cheikh Anta Diop,Dakar,1994.
33. TOURE YT, PETRARCA V, TRAORE SF, COULIBALY A, MAIGA HM, *et al.* - The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia, 1998, 40, 477-511.*
34. TRAPE J, ROGIER C, KONATE L, DIAGNE N, BOUGANALI H, *et al.* - The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1994, 51(2), 123-37.*
35. VERCRUYSSSE J & JANCLOES M - Etude entomologiques du paludisme humain dans la zone urbaine de Pikine (Sénégal). *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Med. Parasitol., 1981, 9, 165-178.*
36. WHITE GB - *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1974, 68, 278-301.*
37. YARO AS, DAO A, AMADOU A, CRAWFORD JE, TRAORE SF, *et al.* - Reproductive output of female *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): comparison of molecular forms. *J Med Entomol, 2007, 43, 833-839.*

38. YAWSON AE, MCCALL PJ, WILSON MD, & DONNELLY MJ - Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med Vet Entomol*, 2004, **18**, 372-377.
39. YAWSON AE, WEETMAN D, WILSON MD, & DONNELLY MJ - Ecological zones rather than molecular forms predict genetic differentiation in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. in Ghana. *Genetics*, 2007, **175**, 751-61.

Titre : Les formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae* à Dielmo : dynamique et transmission

Nom du candidat : Seynabou Sougoufara

Nature du mémoire : Master en GENETIQUE DES POPULATIONS

Jury : Président: **M. Pape Mbacké Sembène**, Maitre de Conférences, FST, UCAD

Membres: **M. Cheikh Sokhna**, Docteur, IRD, Hann

M. Lassana Konaté, Maitre-assistant, FST, UCAD

M. Malick Fall, Maitre-assistant, FST, UCAD

Résumé.

Ce mémoire présente les résultats d'une étude réalisée de juillet à octobre 2009 sur les moustiques vecteurs du paludisme à Dielmo. Les moustiques ont été capturés sur appâts humains. Les vecteurs principaux responsables du paludisme sont *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. *Anopheles gambiae* a été l'espèce la plus fréquemment capturée. Les travaux de biologie moléculaire nous ont permis de montrer qu'*Anopheles gambiae* présente la forme moléculaire M, la forme moléculaire S et *Anopheles arabiensis*. L'évolution de leurs densités est liée à l'existence de leurs gîtes larvaires préférentiels et aux conditions météorologiques. Seule la forme M a été infectée avec un indice circumsporozoïte de 0,26%, ce qui indique qu'il est le vecteur responsable du paludisme à Dielmo. Les fréquences alléliques des formes moléculaires M et S calculées grâce au principe d'Hardy Weinberg montrent que le flux de gènes entre ces deux formes est très limité avec un taux d'hybride MS de 0,96%. Ce taux relativement faible prouve que le processus de spéciation entre les formes M et S est en cours.

Mots clés : paludisme, vecteurs, transmission, flux de gènes, spéciation, Dielmo

Abstract

This memory presents the results of a study carried out from July to October 2009 on the mosquitos vectors of paludism with Dielmo. The mosquitos were captured on human soft foods. The principal vectors responsible for paludism are *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Anopheles gambiae* was the species the most frequently captured. Work of molecular biology enabled show us that *Anopheles gambiae* presents the molecular form M, the molecular form S and *Anopheles arabiensis*. The evolution of their densities is related on the existence of their preferential larval lodgings and to the weather conditions. Only the form M was infected with an index circumsporozoïtic of 0, 26%, which indicates that it is the vector responsible for paludism with Dielmo. The allelic frequencies of the molecular forms M and S calculated to the principle of Hardy Weinberg show that the gene flow between these two forms is very limited with a rate of hybrid MS of 0,96%. This relatively low rate proves that the process of speciation between the forms M and S is in progress.

Key words: paludism, vectors, transmission, flow of genes, speciation, Dielmo