

Etude de la variabilité génétique de *Glossina palpalis gambiensis* par le polymorphisme de l'ADN microsatellite. Implications épidémiologiques *

Philippe Solano

Résumé de la thèse de Doctorat en parasitologie
soutenue le 21 novembre 1998
à l'Université de Montpellier II (205 pages)

Mots-clés : *Glossina palpalis gambiensis* - Génétique - Microsatellite - Diagnostic - Epidémiologie - Burkina Faso.

Les glossines ou mouches tsé-tsé (Diptera : Glossinidae) sont des insectes qui transmettent les trypanosomes (Kinetoplastida : Trypanosomatidae), responsables des trypanosomoses animales (ou nagana) et de la trypanosomose humaine (ou maladie du sommeil), en Afrique intertropicale. Ces maladies ont un impact considérable sur le développement économique de cette zone du monde (pertes en viande, en lait, en travail, géographie de l'élevage, utilisation de trypanocides).

Pour maîtriser cette contrainte, les méthodes de lutte doivent être efficaces et économiquement supportables, c'est-à-dire précisément ciblées. Ceci implique une connaissance approfondie de l'épidémiologie de la maladie, donc de la biologie et de l'écologie des glossines, des parasites, de leurs interactions, et des rapports existants entre ce système pathogène et son environnement.

Cependant, les connaissances sur les glossines montrent beaucoup de lacunes, certainement à cause du manque d'outils adaptés à l'étude de la variabilité génétique des vecteurs. L'objectif du travail effectué a été :

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

Le cas retenu a été celui de *Glossina palpalis gambiensis*, vecteur efficace des trypanosomoses humaines et animales en Afrique occidentale.

Contrairement à d'autres organismes mieux connus, il n'existait pas de banque informatisée de données sur les séquences ADN des glossines. Il a donc fallu, pour chercher des microsatellites, créer une banque génomique partielle, par une méthode classique utilisant un bactériophage M13 et des bactéries *E. coli* XL1. Cette méthodologie a été rendue possible par l'existence de l'élevage de glossines Cirad-Ird à Montpellier. Une séquence microsatellite est constituée de répétitions d'un court motif de nucléotides (par exemple, GT GT GT GT GT GT). Après obtention de ces séquences microsatellites (chacune constituant un locus), des amorces situées de part et d'autre du motif répété sont définies, de manière à ensuite amplifier celui-ci par réaction PCR. C'est la variation du nombre de répétitions de ce motif microsatellite qui détermine les changements de longueur des fragments d'ADN amplifiés (appelés allèles).

Après avoir effectué un test sur des individus d'insectarium, trois loci microsatellites polymorphes ont été obtenus. Sur le terrain, le prélèvement de deux à trois pattes par glossine capturée fournit l'ADN soumis à amplification.

D'après la taille des bandes observées (qui représentaient les allèles) après PCR à chacun des loci microsatellites, le génotype des individus analysés a été déduit.

Pour analyser les données, trois logiciels de génétique des populations ont été utilisés de manière complémentaire : Genepop (Raymond, Rousset, 1995) versions 1.2 et 3.1, FSTAT v.1.2 (Goudet, 1996), Genetix (Belkhir, Borsa, Goudet, Chiki, Bonhomme, 1996-1998).

Les principaux paramètres mesurés ont été :

- l'écart aux proportions attendues en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg ;
- le déséquilibre de liaison entre loci ;
- la différenciation entre les populations (*F* statistiques de Weir et Cockerham).

Glossines d'insectarium

Les deux premiers loci (*Gpg55.3* et *Gpg19.62*) étaient situés sur le chromosome X (une bande chez les mâles, XY ; une ou deux bandes chez les femelles, XX). Le troisième locus (*Gpg69.22*) semblait situé sur un autosome. Des expériences de transmission entre générations de ces allèles aux loci microsatellites ont été réalisées sur les individus d'insectarium. Elles ont permis de confirmer la transmission mendélienne des allèles, importante à vérifier avant d'entreprendre des études de génétique sur les populations naturelles.

Glossines « naturelles »

Au niveau macrogéographique, deux loci microsatellites ont montré des différences importantes entre les glossines du Sénégal et celles capturées au Burkina Faso. Ces différences génétiques impliquaient aussi la taille des ailes de ces mêmes glossines, étudiée par la morphométrie grâce à un logiciel de mesures semi-automatiques (Fly Picture Measurements ; Borne, Petiteau, de La Rocque, Geoffroy, Cuisance, en prep.).

A l'échelle de la zone agropastorale, deux terroirs ont été retenus : Samorogouan et Sideradougou, au Burkina Faso. A Samorogouan, des captures ont été réalisées en saison sèche et en saison des pluies. Les principaux résultats suggèrent que cette zone peut être considérée comme une unité panmictique au sein de laquelle les individus capturés se reproduisent au hasard entre eux. Les mouvements plus fréquents en saison des pluies semblent

* Ce travail est le fruit d'une collaboration entre des équipes du Cirad-emvt (programme Econap), de l'Ird (Lemv), et du Cirades Bobo-Dioulasso au Burkina Faso

homogénéiser les flux de gènes entre groupes d'individus. A Sidéradougou, deux campagnes de capture ont été réalisées, l'une en 1997, l'autre en 1998, le long du réseau principal du Koba, entre l'est (village de Yéguéré) et l'ouest (village de Nyarafo et bois sacré voisin). Au total, 360 *G. palpalis gambiensis* ont été analysées.

A l'échelle de la zone de Sidéradougou, un premier niveau de structuration apparaît entre les glossines situées à l'est et à l'ouest du réseau (éloignées d'une quinzaine de kilomètres), structuration qui persiste chaque année de capture. Le *Fst* moyen mesuré a atteint une valeur de 0,039 et était très significatif ($p < 0,0001$), indiquant une différenciation génétique entre ces populations appartenant pourtant au même réseau hydrographique.

Le *Fst* obtenu équivaudrait, en termes de flux de gènes entre l'ouest et l'est, à un échange de 5 à 6 individus par génération.

Les résultats épidémiologiques obtenus distinguent également ces deux parties du réseau hydrographique : taux d'infection différents chez les glossines, diversité des trypanosomes reconnus par PCR.

Cependant, en plus de ce premier degré de structuration, de fortes valeurs du *Fis* (déficit en hétérozygotes) ont été observées à l'ouest de la zone, notamment près d'un bois sacré à proximité du village de Nyarafo.

Après avoir testé plusieurs hypothèses, techniques et biologiques, une analyse factorielle des correspondances a été réalisée sur les génotypes des glossines présentes dans le bois. Cette analyse a mis en évidence deux groupes princi-

paux d'individus qui ne présentaient chacun aucun déficit en hétérozygotes et qui étaient génétiquement très différents entre eux.

Ces données reflètent l'existence d'un effet *Wahlund* dans les glossines capturées : dans l'échantillon total étaient regroupés artificiellement deux groupes d'individus ne se reproduisant pas au hasard entre eux. Lorsque, une fois reconnus, ils étaient séparés, le déficit en hétérozygotes disparaissait.

L'utilisation du polymorphisme de l'ADN microsatellite a permis de déceler une structuration des populations chez *G. palpalis gambiensis*, à des échelles spatiales distinctes. A l'évidence, un nombre supérieur de loci serait appréciable, mais des conclusions préliminaires peuvent déjà être émises.

C'est à notre connaissance la première fois qu'une subdivision des populations de glossines a été mise en évidence au niveau intraspécifique à l'échelle d'un réseau hydrographique, sur quelques kilomètres. Dans la zone de Sidéradougou, cette subdivision a persisté lors des deux prospections, en 1997 et 1998. A cette structuration génétique, s'est superposée une structuration épidémiologique : différentes populations de vecteurs appartenant à la même sous-espèce ont semblé pouvoir jouer des rôles différents dans l'efficacité de la transmission de la trypanosome animale.

En sympatrie dans le bois de Nyarafo, un mélange de populations a été détecté. Parmi plusieurs hypothèses, ce mélange pourrait refléter la jonction, en ce point, de deux populations de *G. palpalis gambiensis* d'origine différente par leur appartenance à des bassins versants dis-

tincts. Au niveau de la falaise de Banfora, s'établit en effet un contact entre les eaux du bassin de la Comoé, qui coule ensuite plein sud vers la Côte d'Ivoire, et celui du Mouhoun (ex-Volta noire) auquel appartient le réseau du Koba sur lequel s'est déroulée l'étude.

A l'échelle de l'aire de répartition de cette glossine, les différences génétiques mises en évidence n'apparaissent ainsi pas simplement liées à la distance géographique. Il est probable que d'autres facteurs écologiques, comme l'appartenance au bassin versant, jouent un rôle dans la structuration des populations de ce vecteur.

Les implications de ce travail sur le contrôle des trypanosomoses en Afrique peuvent contribuer au choix des stratégies. Si le contrôle repose sur l'éradication des vecteurs (par lâchers de mâles stériles par exemple), ces études pourront permettre, d'une part, d'identifier les populations cibles en terme de compatibilité génétique avec les individus lâchés et, d'autre part, de préciser l'origine géographique des réinvasions éventuelles par les glossines de zones traitées. En revanche, si l'option choisie est le contrôle par l'abaissement des populations de vecteurs afin de maîtriser la contrainte, ces études trouvent leur intérêt dans la prévision spatiale fine du risque trypanosomien.

Les trois loci microsatellites isolés chez *Glossina palpalis gambiensis* amplifient également l'ADN de tous les taxons de glossines appartenant au même sous-genre (*Nemorhina*, ou groupe *palpalis*). Ce résultat suggère donc l'extension possible de ce type d'étude à d'autres glossines, dont l'importance médicale et vétérinaire est reconnue.

ERRATUM

Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 1998, 51 (4) : 304. Dans le résumé espagnol, 6^e ligne : *G. morsitans morsitans* (Mall).