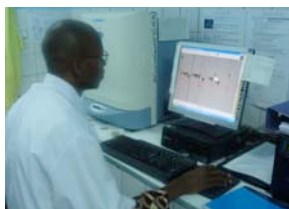




Recommandations techniques

**Conditions d'un bon génotypage des glossines *Glossina palpalis gambiensis* sur le séquenceur Li-Cor à l'aide de marqueurs microsatellites**

DAYO Guiguigbaza-Kossigan, ADAKAL Hassane, RAVEL Sophie, KONKOBO Maurice, SOLANO Philippe, BENGALY Zakaria

Intérêt du génotypage des glossines

Les glossines ou mouches tsé-tsé transmettent à l'homme et aux animaux les trypanosomes. Ces derniers sont les parasites qui causent les trypanosomoses africaines animales (TAA) ou Nagana chez les animaux, et la Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou Maladie du sommeil chez l'homme dans les zones humides et subhumides d'Afrique subsaharienne. Les conséquences délétères de ces parasitoses sont énormes à la fois sur la santé humaine et sur le développement économique, car elles induisent des pertes économiques importantes, par la morbidité, la mortalité et les pertes indirectes, auxquelles s'ajoute le coût financier de la lutte chimique. Les méthodes de lutte disponibles chez les animaux sont essentiellement basées sur la chimiothérapie et la chimioprophylaxie. Ces méthodes sont d'intérêt limité en raison du coût des trypanocides, des difficultés d'approvisionnement et de l'augmentation constante des résistances des trypanosomes aux principales molécules disponibles. Par ailleurs, la grande variabilité antigénique de ces parasites réduit, à l'heure actuelle, tout espoir d'obtenir un vaccin efficace sur le terrain dans un futur proche. Les opérations de lutte anti tsé-tsé sont le plus souvent localement efficaces en interrompant la transmission des TAA. La lutte antivectorielle se trouve souvent confrontée au problème de réinvasions des zones assainies. Avec l'avènement du projet panafricain d'éradication des glossines sur le continent africain (PATTEC : *Pan African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign*), l'accent est mis prioritairement sur des populations isolées de glossines. Pour identifier ces populations isolées (appelées communément les « îles biologiques »), l'outil génétique intervient pour mettre en évidence l'absence ou la présence de flux de gènes entre populations et aider ainsi à choisir les stratégies de lutte efficaces et leur mise en place. Le CIRDES (Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide) apporte un appui aux coordinations nationales PATTEC (au Burkina Faso, au Mali et au Ghana par exemple), et aux projets de lutte (Niayes au Sénégal), à travers la détermination des génotypes des glossines et notamment les glossines du groupe palpalis et tachinoïdes. Un protocole de génotypage de *G. palpalis gambiensis* à l'aide de marqueurs microsatellites a été mis au point par une équipe de recherche de l'IRD à Montpellier avec un transfert de technologie au CIRDES. Ce protocole a été validé en interne au CIRDES selon les exigences de la norme ISO 17025 dans le cadre la démarche qualité du Centre pour l'accréditation du laboratoire de génotypage. Basé sur ce protocole de *G. palpalis gambiensis*, le génotypage de *Glossina tachinoïdes* à l'aide de marqueurs microsatellites a été développé et est également réalisé en routine au CIRDES.

Recommandations techniques

Principe de la méthode

Cette méthode est basée sur l'analyse de marqueurs microsatellites (Figure 1). Les marqueurs microsatellites appartiennent pour la plupart à l'ADN dit «non-codant ». Les microsatellites sont des séquences de 2 à 4 nucléotides répétées en tandem. Le nombre de répétitions des motifs est très variable d'un individu à l'autre (polymorphisme) et détermine le grand polymorphisme de ces marqueurs. Ils sont très largement dispersés dans le génome.

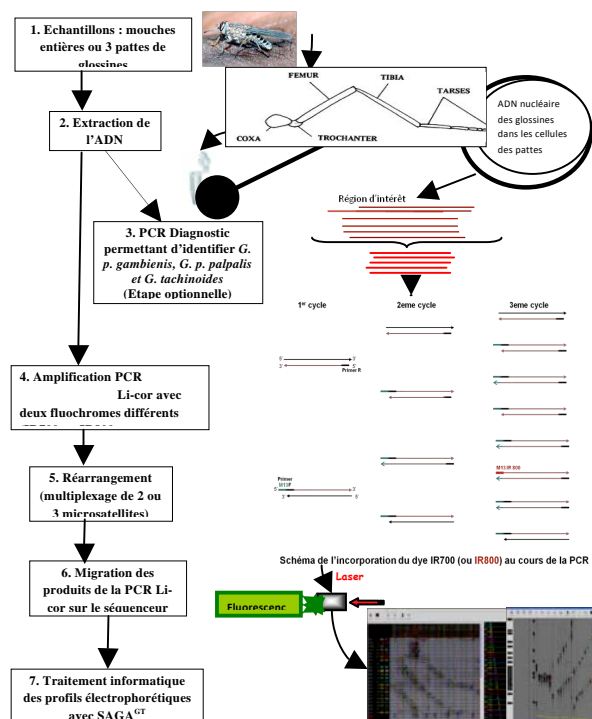
La méthode utilisée au CIRDES pour le génotypage de *G. palpalis gambiensis* est basée sur le panel de marqueurs microsatellites développés par l'Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD INTERTRYP. Huit (8) microsatellites polymorphes sont utilisés à savoir: 55.3, A10, pGp13, pGp24, C102, B104, B110 et GpCAG133.

Pour chaque mouche *G. palpalis gambiensis*, trois (3) pattes sont broyées dans 200 µl de Chelex 5% (résine). Après une incubation à 56° C pendant 1 h, l'ADN est dénaturé à 94°C pendant 30 min. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12000 tours/min pendant 3 min et conservés à une température <-18°C pour les analyses ultérieures. Les réactions

d'amplification par PCR (Polymerase Chain reaction) sont effectuées dans un thermocycleur dans un volume réactionnel de 20µl, en utilisant 10 microlitres de surnageant de l'étape d'extraction dilué au 1/5è et 10µl de Mix (mélange des tampons, Taq polymérase, MgCl₂, dNTP, amorces). Après amplification par PCR (PCR Li-Cor), il est possible de mélanger deux marqueurs microsatellites amplifiés avec deux fluorochromes différents (IRDye 700 ou 800), les produits PCR sont réarrangés pour faire des Réa (mélange de 2 marqueurs microsatellites dont un amplifié



Séquenceur Li-Cor relié à un ordinateur pour le traitement des profils d'électrophorèse (Photo : G-K DAYO)



avec le Dye 700 et l'autre avec le Dye 800) puis migrés sur le Séquenceur Li-Cor 4300 (LI-COR, Lincoln, NE) sur un gel d'acrylamide 6,5%. Ce séquenceur contient un laser qui excite à 2 longueurs d'ondes différentes (700 et 800nm), et des détecteurs distincts afin d'éliminer les erreurs dues au chevauchement des 2 fluorescences. L'analyse des profils de migration est effectuée grâce au logiciel SAGA^{GT}: Li-Cor®. Le logiciel SAGA^{GT} est un outil développé pour la lecture des profils microsatellites issus du séquenceur Li-Cor® chez les organismes diploïdes.

Figure 1 : Principe schématisé du génotypage des glossines sur le séquenceur Li-Cor à l'aide des marqueurs microsatellites

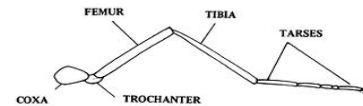
Recommandations techniques

Instructions pour avoir de bons prélèvements

La qualité des résultats issus du génotypage dépend de l'intégrité de la séquence de l'ADN cible dans la matrice. Ainsi, il importe de respecter les conditions ci-après lors du prélèvement des échantillons :

- ✓ **Types de prélèvement :** Mouches entières ou pattes de mouches ;

Figure 2 : Une glossine entière (en haut) et une patte isolée d'une glossine (en bas)



- ✓ **Quantité de prélèvement :** dans un tube de 1,5ml, mettre une et une seule mouche ou au moins 3 pattes d'une et une seule mouche ;

Nature de l'alcool : les échantillons de mouche (mouches entières ou pattes de mouches) doivent être stockés dans de l'éthanol 70% et conservés au réfrigérateur (entre +4°C et +8°C) lorsque leur traitement ne va pas se faire dans l'immédiat (délai de 1 à 3 jours). Les mouches ou pattes de mouches desséchées ne garantissent pas des résultats de qualité.

- ✓ **Identification des échantillons:** tous les tubes et boîtes contenant les prélèvements doivent être identifiés. Par ailleurs, envoyer les prélèvements au laboratoire accompagnés d'une liste des prélèvements sous format papier et/ou format électronique ;
- ✓ **Conditions d'acheminement :** les échantillons dans l'éthanol 70% peuvent être acheminés sans problème au laboratoire dans les conditions ambiantes;
- ✓ **Tubes à utiliser :** Tout dépend des analyses que l'on envisage de réaliser avec les données du génotypage. De préférence utiliser des tubes Eppendorf 1,5ml pour des échantillons de glossine individuels ou des tubes Falcon propres (et stérile de préférence) lorsqu'il faut regrouper plusieurs échantillons (par exemple toutes les glossines d'un même piège). Dans tous les cas, ne mettre qu'un seul échantillon dans un tube.



Figure 3 : Tubes contenant des pattes de glossines dans l'éthanol 70%



Traitement de données issues du génotypage

Ce traitement consiste à effectuer les différentes analyses de génétique des populations en fonction des objectifs de l'étude (voir par exemple de Meeus & Goudet, 2007). Le traitement des données fait appel à divers concepts théoriques et logiciels de génétique des populations. Pour des cas pratiques d'études de génétique des populations appliquées aux glossines, lire Bouyer et al. (2006), Ravel et al. (2007), Solano et al. (2010a et b).

Pour en savoir plus

Bouyer, J., Ravel, S., Vial, L., Thévenon, S., Dujardin, J.-P., de Meeus, T., Guerrini, L., Sidibé, I., Solano, P., (2007). Population structuring of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) according to landscape fragmentation in the Mouhoun river, Burkina Faso. *J. Med. Entomol.* 44(5): 788-795.

De Meeus T., Goudet J. (2007). A step by step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple levels. *I.G.E.* 7, 731-735

Ravel S., T. de Meeus, J.P. Dujardin, D.G. Ze'ze', R.H. Gooding, I. Dusfour, B. Sane, G. Cuny, P. Solano (2007) The tsetse fly *Glossina palpalis palpalis* is composed of several genetically differentiated small populations in the sleeping sickness focus of Bonon, Côte d'Ivoire. *Infection, Genetics and Evolution* 7 : 116–125

Philippe Solano, Dramane Kaba, Sophie Ravel, Naomi A. Dyer, Baba Sall, Marc J. B. Vreysen, Momar T. Seck, Heather Darbyshir, Laetitia Gardes, Martin J. Donnelly, Thierry De Meeûs, Jeremy Bouyer (2010) Population Genetics as a Tool to Select Tsetse Control Strategies: Suppression or Eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the Niayes of Senegal. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(5):e692.

Philippe Solano, Sophie Ravel and Thierry de Meeûs (2010) How can tsetse population genetics contribute to African trypanosomiasis control? *Trends in Parasitology* doi:10.1016/j.pt.2010.02.006.

Cette fiche technique est destinée aux programmes de lutte contre les trypanosomoses et leurs vecteurs, aux institutions de recherche partenaires, aux chercheurs, aux techniciens de laboratoires, aux étudiants

Contact



Recommandations techniques

CIRDES

Unité de recherche sur les bases biologiques de la lutte intégrée (URBIO)

01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, BURKINA FASO

Téléphone: (226) 97 22 87

Fax : (226) 97 23 20

Email : cirdes@ird.bf

www.cirdes.org

Email : charlesdayo@yahoo.fr