

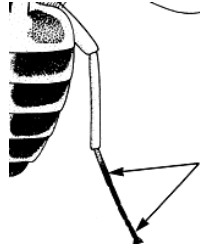


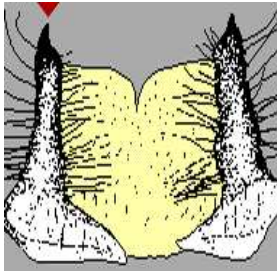


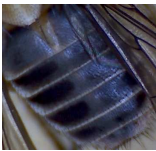

Utilisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction) pour la diagnose de trois espèces de glossines

DAYO Guiguigbaza-Kossigan, RAYAISSE Jean-Baptiste, ILBOUDO Hamidou, SALOU Ernest, KONKOBO Maurice, YONI Wilfrid, RAVEL Sophie, SOLANO Philippe

Les glossines sont les principaux vecteurs des trypanosomoses tant animales (TAA) qu'humaines (THA). Elles sont réparties en 3 groupes qui sont 1) le groupe *palpalis*, 2) le groupe *morsitans* et 3 le groupe *fusca*, vivant chacun dans un biotope plus ou moins distinct. Si l'identification entre espèces de groupes différents est aisée, ce n'est pas le cas pour les espèces d'un même groupe qui partagent plusieurs caractères en commun. Aussi, avons nous pensé que l'utilisation de l'outil moléculaire pourrait aider à une meilleure diagnose.

Pour le cas présent, nous l'appliquons à 3 espèces du groupe *Palpalis* que sont *Glossina palpalis palpalis*, *Glossina palpalis gambiensis* et *Glossina tachinoides*.

Caractères morphologiques et biotopes des trois espèces

Espèces	Caractères communs	Zones agroécologiques	Caractères différentiels	Photos
<i>Glossina palpalis gambiensis</i> (Gpg)		L'habitat de cette sous espèce riveraine est la galerie forestière des savanes sèches et humides à végétation dense et ouverte au milieu pour présenter une ligne de vol. Elle fréquente également les sources et les bois sacrés humide.	 Teinte générale de l'abdomen sombre et bordure pale des tergites très étroite	
<i>Glossina tachinoides</i> (Gt)	Coloration du tibia et des articles tarsaux des pattes postérieures de couleur sombre. 	C'est la plus petite des glossines. Très ubiquiste, elle peut vivre aussi en zone pré forestière qu'en zone sahélo-soudanienne. Surtout riveraine, on la trouve également dans les buissons des zones inondables, et les galeries forestières plus ou moins ouverte.	 Teinte générale de l'abdomen moins foncée, bordure pale des tergites plus claire et large	Gonopode du mâle à cou large et à grosse tête lobée 
<i>Glossina palpalis palpalis</i> (Gpp)	Cerques du mâle se terminent en griffes aigues et reliés par une membrane connective	<i>Glossina palpalis palpalis</i> peuple les secteurs du domaine guinéen caractérisés par la présence de la forêt dense et humide. Elle fréquente également les galeries forestières des savanes humides. Sa présence est également constatée dans les zones forestières anthropisées (plantations, périphéries des villages et campements)	 Teinte générale de l'abdomen sombre et bordure pale des tergites très étroite	 Gonopode du mâle à long cou mince et à petite tête

Extraction de l'ADN chez les glossines

Elle se fait à partir de trois pattes de mouches dans 200 µl d'une solution de chelex 100 à 5%. Les échantillons sont incubés à 56°C pendant 1 heure puis à 94°C pendant 30 minutes puis sont centrifugés pendant 3 minutes à 13000rpm Les solutions obtenues doivent être stockées au congélateur à -20°C.

Séquences des primers (ITS1):

DiagFor: 5'- TGGACTTCGGATTAAGTACAACA-3'

DiagRev: 5'- TCATTATGCGCTATTAAGGTAAGC-3'

Tailles attendues des produits PCR

- *Glossina palpalis gambiensis*: 168 paires de bases
- *Glossina palpalis palpalis*: 241 paires de base (320 paires de base dans certaines populations de la République Démocratique du Congo et de la Guinée Equatoriale).
- *Glossina tachinoides*: 221 paires de base

Protocole de réalisation de la PCR

Les échantillons sont amplifiés dans un volume réactionnel de 25 µl comprenant 22,5 µl de mix et 2,5 µl de surnageant d'ADN extrait avec la solution 5% de chelex 100.

Les composants du mix utilisé pour la PCR sont consignés dans le tableau I et l'amplification est faite selon le programme présenté dans le tableau II.

Tableau I : Concentration des différents réactifs pour PCR

Réactifs	Volume (pour un échantillon)
Eau bidistillée	17µl
Tampon 10X	2,5µl
Nucléotides (dNTP 10mM)	0,5µl
Amorce (DiagF à 10pmol/microl)	1µl
Amorce (DiagR à 10pmol/microl)	1µl
Taq polymérase (5U/ul)	0,1µl
Total Master mix	22,5µl
ADN	2,5µl
Volume réactionnel	25µl

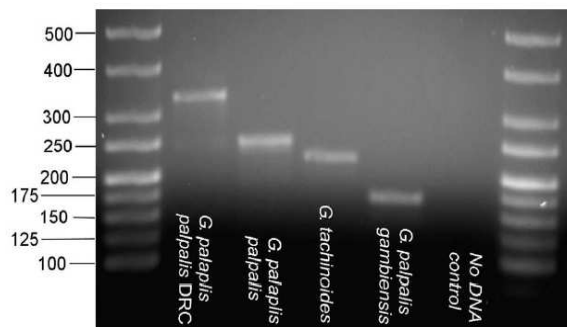
Tableau II : Programme d'amplification PCR

Nombre de cycles	Réaction	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	3 mn
1	Dénaturation	95°C	30 s
	Hybridation	56°C	30 s
	Elongation	72°C	1 mn
29	Elongation finale	72°C	5 mn
0	Conservation des amplicons	+4°C	infini

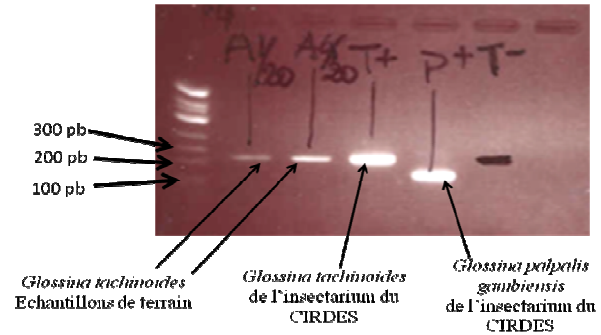
Electrophorèse sur gel d'agarose

10µl d'ADN des produits PCR obtenus sont migrés sur un gel d'agarose 2 % en présence de BET dans une cuve à électrophorèse horizontale contenant du TBE 1X. Puis le gel est visualisé sous la lumière ultra-violette.

Résultats de la PCR Diagnose



Dyer et al., 2008



Essais de vérification des espèces de glossines collectées sur le terrain
Laboratoire de génotypage du CIRDES

Conclusion

La mise en place de stratégies de lutte efficaces contre les glossines nécessite une bonne identification des espèces existant au niveau des différentes zones agroécologiques. Les outils moléculaires notamment la PCR présentée ici vient compléter l'identification des glossines faites sur le terrain sur la base des informations agroécologiques et morphologiques.

Pour en savoir plus,...

Dayo G-K.; Zerbo M. 2012. Extraction de l'ADN des *Glossina palpalis gambiensis* ; Méthodes de traitement au chelex : Piégeage des inhibiteurs PCR par la solution de chelex.; Mode opératoire (document interne), CIRDES Bobo-Dioulasso

Dyer N.A., Lawton S.P., Ravel S., Choi K.S., Lehane M.J., Robinson A.S., Okedi L.M., Hall M.J.R., Solano P., Donnelly M.J. (2008) Molecular phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on mitochondrial (COI, 16S, ND2) and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the *palpalis* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 227-239.

Il s'agit d'une fiche technique destinée aux services vétérinaires, aux décideurs politiques, aux chercheurs, aux étudiants et aux organisations professionnelles des éleveurs.



Centre international de recherche-développement sur l'élevage en zone subhumide

Contact

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

Site web: www.cirdes.org

Email: dgcirdes@fasonet.bf ou charlesdayo@yahoo.fr