

**MINISTRE DE L'EDUCATION
NATIONALE, DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple - Un But - Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB)

Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie (FMOS)



U.S.T.T-B

Année universitaire 2019-2020



N°...../2020

TITRE

**TECHNIQUE MOLECULAIRE DE DETECTION DE WOLBACHIA (wAnga Mali)
CHEZ *Anopheles gambiae sensu lato* A L'ETAT SAUVAGE AU MALI**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 16/10/2020

Devant le jury de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie

Par ;

Monsieur Salif THIAM

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (DIPLOME D'ETAT).

JURY

Président : Pr Amagana DOLO
Membres : Dr Amadou KONE
Co-Directeur : Dr Nafomon SOGOBA
Directeur de thèse : Pr Seydou DOUMBIA

Sponsor : Ce travail, effectué au Malaria Research and Training Center (MRTC) de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), a bénéficié d'un



**DEDICACES ET
REMERCIEMENTS**

DEDICACES

A mes deux grand-mères

Je dédie ce travail à ces deux braves femmes Teïbatou Haïdara et Fanta Diabaté. Je reconnais de n'avoir jamais compris la source ni la raison de cette confiance qu'elles avaient en moi dès mon bas âge. Elles ne m'ont jamais forcé, frappé ou insulté car elles avaient sûrement déjà compris que l'eau était plus forte que le rocher, l'amour plus fort que la force. Merci pour cette manière particulière d'aimer et reposez en paix, vous l'avez mérité après avoir tout donné.

A mes parents Lahabib Thiam et Zeynabou Haïdara

Pour l'amour

Pour l'éducation

En témoignage de ma profonde gratitude

Je vous remercie d'avoir façonné la personne que je suis devenue

De m'avoir aimé envers et contre tout

Merci pour ces valeurs humaines si modestes pour moi mais qui impressionnent tout le monde partout où je passe. C'est dans vos cœurs que Dieu m'a placé et je m'y suis toujours senti protégé, chéri et aimé et c'est pour cela que j'y resterai pour toujours.

Chers parents merci de m'avoir appris à me battre sans haïr

Ce travail est le votre

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements vont

A Allah le tout puissant, l'Omniscient, Seigneur de l'univers et à son dernier prophète **Mohamed**

(Paix et salut sur lui)

A mon père

Mohamad Hafiz Thiam

Merci de m'avoir donné la vie d'y avoir pris soin

A ma mère

Maman Maïchatou Dante

Merci pour tous tes sacrifices

Ton amour

Ta patience

Pour toute l'affection maternelle dont tu fais preuve chaque jour

En témoignage de mon éternel reconnaissance.

A mes frères et sœurs :

Thierno Hadi, Atika, Teïba, Tata, Papa, Sherif, Fana, Fadima, BaMoundir, Maïcha, Mamie

Je suis conscient de la fierté et la confiance dont vous affichez à mon égard, je vous donnerai toujours le meilleur de moi

A ma Tante Hawa Dante

Merci pour votre hospitalité légendaire, chez vous je me suis senti à la maison

A ma tante Zaharaou Thiam et famille

En témoignage de mon amour et de ma profonde admiration Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

- A toute la famille Thiam et Dante

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que le Bon Dieu vous garde et vous procure santé et bonheur. Amina yarabi !

A ma femme Fatouma Dembélé

Merci ma très chère épouse, quand je t'ai rencontrée j'ai cessé de chercher. Je remercie le seigneur de t'avoir mise sur mon chemin. Merci pour l'amour inconditionnel dans le meilleur comme dans le pire. Je prendrai soin de ton cœur plus tendrement que le mien.

Je t'aime

A mon maître d'Anglais Abdourahamane Douma Touré

En témoignage de mon amour, de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Je vous dois mon amour et mes connaissances de la langue anglaise

Je vous dis merci.

A Docteur Birahim Yaguemar Gueye

Merci d'avoir été mon espoir, ma famille et mon guide, sans vous je ne serais jamais médecin. Les mots ne peuvent pas décrire ma gratitude à votre égard. Je dirai autant de fois que possible ta phrase préférée quand quelqu'un te demande un service « Il n'y a aucun problème ».

A mes encadreurs d'ICERMALI/GIS Nafomon Sogoba et Moussa Keita

Pour la qualité de l'encadrement

Pour la chance offerte

Pour votre patience

Pour l'initiation à la recherche

Je vous dis merci

InchAllah je ne vous décevrai pas

A Carolina Barillas Murry et toute son équipe au NIH :

Fabio Gomez, Alvaro, Tiago, Duty Lampougen, Addie, Gaspar Canepa

Pour votre hospitalité sans faille au NIH (Maryland)

En témoignage de ma profonde gratitude, je vous remercie tous

A Dr Mohamed Moumine Traore (Dr Momo)

Merci pour votre soutien inconditionnel. Vous êtes l'une des rares personnes qui rendent ce monde meilleur

A toute l'équipe d'entomologie d'ICER-Mali (MRTC)

Pr Check F Traoré, Pr Mahamadou Diakité, Dr Modibo Sangare, Dr Mamadou Coulibaly, Ibrahim Sissoko, Dr Ousmane Maïga, Dr Bane, Dr Bourama Traoré, Check A Coulibaly, Dr Kassogue, Dr Diakité, Dr Issa Traoré, Dr Sadik, Makan Camara, Salif Koné, Dr Guindo, Dr Amadou Koné (UCRC), Dr Djénéba Dabitaou (UCRC), Dr Yossi, Alayaye Maïga, Interne Koné, Interne Moussa Konaté, Interne Mohamed Maïga, Kadi Sanogo, Dr Sidi, Interne Wesley

Pour l'initiation à la recherche

Pour la qualité de l'encadrement

Pour votre accueil chaleureux et engagement sans faille

Je vous dis merci

Mention spéciale à mon **proviseur Zantigui Sidibé**

A tous mes ami(e)s

Dr Siaka Bagayogo, Nouhoum Check Traoré (Fifty), Dr Bouacar Cissé, Dr Ahmed M Konaté, Dr Zoumana Fomba, Abdoul K Sidibé, Aly Koureychi, Interne Seydina O Maguiraga, Interne Alpha Diallo, Dr Abdoulaye Diarra, Interne Baba Bah Mariam Koureychi, Mahamadou L.S, Sebou Kolo, Dr Hawa M Diallo, Soumaïla Haïdara, Dr Mahaoua Konaté, Mme Maïga Fatoumata Karambe, Oumar Adamako, Mohamed Ali Haïdara, Tonton Souleymane Thiam, Tonton Bouacar Ouattara et sa femme, Dr Jean Paul Somboro

Où que vous soyez, c'est avec un cœur plein de reconnaissance que je vous remercie pour ces moments de joie ainsi que de tristesse partager avec vous. Trouvez ici, le témoignage de tout mon amour pour votre soutien inconditionnel. Je vous souhaite une vie pleine de réussite, de succès, de santé et de bonheur. Yarabi !

A tous les membres de la cour Massa (Famille Badenya)

Notre « Doutigui » Dr Amadou Fofana, Dr Aimé Paul, Interne Bamiki, Dr Sow Saïdou, Dr Amadou Koné, Dr Dramane Coulibaly, Dr Binamara Diakité et sa femme Adiza, Dr Bouacar Dembele, Dr Irène Keita, Dr Doua Kante, Dr Sia, Dr Sokona, Dr Plea, Dr Fatim Doumbia, Dr Adama Coulibaly, Interne Seyba Macalou, Interne Diawoye Camara, Yaye, Salé Mahamat, Goguna, mon petit frère Cissé Ousmane, Yaya, Dr Fati, Interne Moussa Sankare, Mouctar Napo, Dr Seydou Fily, Dr Fatim Maïga, Interne Binafou Nimaga, Interne Mahamane Tangara, Dr Allassane Touré, Dr Bouba Diallo, Interne Simaga, Michelle Sielèché...

Merci pour ces moments inoubliables, dans la joie comme dans la tristesse. Merci pour le partage

Vous resterez une famille à jamais.

A Madou Koné et sa famille dans la cour Massa

Merci à cette famille infatigable de la cour Massa qui nous a donné à manger pendant tout le cursus sans jamais rien demander en retour. Que le tout puissant vous récompense.

A BaOumou

En vous j'ai trouvé une mère au Point G, merci pour tout.

A Notre Présidente Tariba Traore et tous les membres du Club d'anglais « INES-Mali »

Merci pour votre aide et abnégation dans l'apprentissage de la langue anglaise au Mali. Vous m'avez offert le cadre idéal pour améliorer mes connaissances en anglais.

Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude

A toute la 9^{ème} promotion du numerus clausus « Promotion Feu Pr Ibrahim Alwata

MAIGA »

Merci pour les moments passés ensemble et merci pour votre aide et soutien.

Grand merci

A tous mes cousins et à toutes mes cousines, A tous mes neveux et à toutes mes nièces, A mes

tantes

A mes oncles

A tous mes proches

À tous mes Maîtres de l'enseignement primaire, secondaire, et de l'université

À tous ceux qui ont participé à ma formation

Que Dieu vous bénisse



**HOMMAGES AUX
MEMBRES DU JURY**

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Amagana Dolo

- **Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH ;**
- **Directeur de l'Ecole Doctorale des Sciences et des Technologies du Mali (EDSTM) ;**
- **Coordinateur du Diplôme d'Études Spécialisées (DES) de biologie clinique à la FAPH**
- **Enseignant-Chercheur à la FAPH**

Honorable Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples et importantes occupations. Vos admirables qualités scientifiques, sociales et humaines et votre modestie font de vous un maître respecté et admiré de tous., votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître exemplaire et témoigne aussi de l'importance que vous attachez à la formation. Vos nombreuses tâches ne vous ont pas empêché d'apporter votre contribution à ce modeste travail.

Cher Maître, permettez-nous de vous exprimer notre humble et profonde gratitude.

A notre Maître et Juge

Dr Amadou KONE

- **Maître de conférences de biologie moléculaire à la Faculté des Science et Techniques (FST) ;**
- **Responsable de l'unité de biologie moléculaire au laboratoire du Centre Universitaire de la recherche clinique (UCRC) ;**
- **Président de la commission d'organisation de la fête des sciences.**

Nous avons admiré la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Nous avons apprécié votre disponibilité, vos immenses qualités humaines et surtout votre sens de l'écoute.

Votre courtoisie et votre rigueur scientifique font de vous un maître apprécié.

Nous garderons de vous l'image d'un homme si instruis mais si modeste.

Permettez-nous aujourd'hui de réitérer notre indéfectible attachement.

A notre Maître et Co-Directeur de thèse

Dr Nafomon SOGOBA

- **PhD en épidémiologie**
- **Responsable des unités Épidémiologie/GIS/RS et Acarologie du MRTC.**

Cher Maître,

La rigueur dans le travail, l'amour du travail bien fait et le sens élevé du devoir font de vous un maître extraordinaire. Ce travail est le fruit de votre volonté de parfaire, de votre disponibilité et surtout de votre savoir-faire. Vos qualités professionnelles, humaines, et surtout votre ouverture d'esprit font de vous un maître apprécié de tous. Les mots nous manquent pour vous remercier de tout ce que vous avez fait pour notre formation.

Acceptez ici notre profonde gratitude.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Seydou DOUMBIA

- **Professeur Titulaire en Épidémiologie à la FMOS**
- **Doyen de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) de USTTB**
- **Directeur du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC)**
- **Enseignant Chercheur à la FMOS**

Cher maître,

Vous êtes et demeurez une référence par votre expérience et par votre parcours professionnel.

Honorable Maître, ce travail est le fruit de votre volonté d'assurer une formation de qualité.

Professeur, nous vous envions et souhaiterons emboîter vos pas, bien que difficile. Vous nous avez impressionnés tout au long de ces années d'apprentissage : par la qualité de votre pédagogie, l'humilité, disponibilité dont vous faites preuve. C'est un grand honneur et une grande fierté pour nous d'être compté parmi vos élèves. Nous, vous prions cher maître, d'accepter nos sincères remerciements

Que le bon Dieu vous gratifie d'une longue et heureuse vie.



**SIGLES ET
ABREVIATIONS**

SIGLES ET ABREVIATIONS

Ae. = *Aedes*

An. = *Anopheles*

ADN = Acide désoxyribonucléique

ARN = Acide ribonucléique

ADNc = Acide désoxyribonucléique complémentaire

bp = bases paires

C = Celsius

Ct = Cycle Threshold (cycle seuil)

dATP = Désoxyadénosine triphosphate

dCTP = Désoxycytidine triphosphate

dGTP = Désoxyguanosine triphosphate

dTTP = Désoxythymidine triphosphate

DCV = Virus C de Drosophile (*Drosophila C Virus*)

DNTP = Désoxynucléotide triphosphate

DO = Densité Optique

EDTA = Acide éthylène -diamine tétra acétique

FMOS = Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

IC = Incompatibilité Cytoplasmique

ICER = International Center for Excellence in Research (Centre International pour l'Excellence en Recherche)

Km = Kilomètre

L1, L2, L3, L4 = Différents stades de développement larvaire

LMVR = Laboratory of Malaria Vector Research (Laboratoire de recherche sur les vecteurs du paludisme)

MgCl₂ = Chlorure de magnésium

MILDA = Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action

MRTC = Malaria Research and Training Center (Centre de formation et de recherche sur le paludisme)

N= Numéro

NIH = National Institutes of Health (Instituts Nationaux de Santé des Etats Unis)

ng= nano gramme

nm= nano mètre

ng/ul= nano gramme par microlitre

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

PCR = Polymerase Chain Reaction (Amplification en chaîne par polymérase)

PID = Pulvérisation Intradomiciliaire

qPCR = Quantitative Polymerase Chain Reaction (Amplification en chaîne par polymérase quantitative)

rRNA = Acide ribonucléique ribosomique

RT-PCR = Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Amplification en chaîne par polymérase avec transcriptase inverse)

S.L. = Sensu Lato (sens large)

Taq = *Thermus aquaticus*

TBE = **Tris Borate EDTA**

TCL = Tissues and Cell Lysis (destructeur de cellules et tissus)

TE = Tris- Acide éthylène -diamine tétra acétique

Tm = Température de fusion

µg = microgramme

µl = microlitre

µg/µl = microgramme/microlitre

USTTB = Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

UV = Ultraviolet

VS = Versus (contre)

Wsp = wolbachia specific (spécifique pour Wolbachia)



**LISTE DES FIGURES ET
DES TABLEAUX**

Liste des figures

Figure 1 : Schéma descriptif d'un moustique adulte femelle <i>Anopheles</i> .(23)	22
Figure 2 : Cycle biologique d'un <i>Anophelinae</i> (23)	24
Figure 3 : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i>	27
Figure 4 : Mode de transmission de <i>Wolbachia</i>	28
Figure 5 : Incompatibilité cytoplasmique	31
Figure 6 : Les différentes étapes de PCR	34
Figure 7 : Le processus d'amplification	35
Figure 8 : La carte éco-climatique du Mali avec site d'étude	38
Figure 9 : Exemple de la courbe d'amplification de qPCR	43
Figure 10 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN d' <i>An gambiae s.l.</i>	28
Figure 11 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de <i>Wolbachia</i> après amplification à 45 cycles avec 56°C comme température d'hybridation des amorces.	28
Figure 12 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de <i>Wolbachia</i> après amplification à 40 cycles avec 58° comme température d'hybridation	29
Figure 13 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de <i>Wolbachia</i> après amplification à 40 cycles et 60°C comme température d'hybridation des amorces.	29
Figure 14 : Utilisation des amorces modifiées avec Flap	30
Figure 15 : Échantillon d'Août 2019 Courbe d'amplification VS image du gel d'agarose	31
Figure 16 : Échantillon de Septembre 2019 Courbe d'amplification VS image du gel d'agarose	32
Figure 17 : Échantillon d'Octobre 2019 Courbe d'amplification vs image du gel d'agarose	32
Figure 18 : Mise en place des peignes du gel SOURCE: www.bing.com/images	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Amorces spécifiques pour la détection d' <i>Anopheles gambiae s.l.</i> et la bactérie <i>Wolbachia</i>	40
Tableau 2 : Détection de l'ADN du moustique <i>An. gambiae s.l.</i>	40
Tableau 3 : Détection de l'ADN de la bactérie <i>Wolbachia</i>	41
Tableau 4 : Programme d'amplification PCR classique de l'ADN d' <i>An. gambiae s.l.</i> par le gène S7 rRNA	41
Tableau 5 : Programme d'amplification de qPCR dans le thermocycleur	43
Tableau 6 : Comparaison de la quantité et de la qualité (pureté) de l'ADN (moustique + <i>wolbachia</i>) à partir des deux méthodes d'extraction en fonction de la densité optique	27
Tableau 7 : Taux d'identification des spécimens d' <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	30
Tableau 8 : Prévalence de la bactérie <i>Wolbachia</i>	31



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION.....	1
2	OBJECTIFS.....	4
2.1	Objectif principal.....	4
3	GENERALITES	20
3.1	Les anophèles	20
3.1.1	Taxonomie	20
3.1.2	Bio-écologie des anophèles.....	20
3.1.3	Les cycles du vecteur	24
3.1.4	Lutte antivectorielle	25
3.2	Le Parasite.....	25
3.2.1	Systématique	25
3.2.2	Cycle biologique du plasmodium.....	25
3.3	Les bactéries Wolbachia	27
3.3.1	Définition	27
3.3.2	Mode de Transmission	28
3.3.3	Description morphologique.....	28
3.3.4	Localisation.....	28
3.3.5	Phénotype associé à Wolbachia	29
3.3.6	Wolbachia au service de l'homme	31
3.4	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	32
3.4.1	Définition	32
3.4.2	Principe	32
3.4.3	Les composantes d'une amplification par PCR	32
3.4.4	Étapes de réalisation.....	33
3.4.5	Les variantes de la PCR	34
4	MATERIELS ET METHODES	37
4.1	Cadre d'étude.....	37
4.2	Période et type d'étude.....	37
4.3	Site d'étude.....	37
4.4	Collecte des échantillons	38
4.5	Traitement des échantillons	38
4.5.1	Extraction de l'ADN	39
4.5.2	L'amplification de l'ADN par la PCR	39
4.5.3	Réaction par polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)	42
4.6	Saisie et analyse des données	44

5 RESULTATS27

5.1 Comparaison des deux procédures d'extraction..... 27

5.2 Amplification de l'ADN du moustique *An. gambiae s.l.* par les amorces S7..... 27

5.3 Optimisation de l'identification de l'ADN de Wolbachia avec les amorces 16S rRNA (Wsp-V68)..... 28

5.4 Amplification de l'ADN de Wolbachia avec les amorces 16S rRNA + Flap 30

5.5 Détection du moustique d'*Anopheles gambiae s.l.* et de la bactérie Wolbachia par la qPCR 30

5.6 Les résultats de qPCR et leur représentation sous forme de bandes d'amplifications 31

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION33

7 CONCLUSION.....35

8 RECOMMANDATIONS.....36

9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES38

10 ANNEXES.....37



INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie infectieuse due à un parasite du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par une piqûre de moustique femelle infecté du genre *Anopheles*. Il représente un problème majeur de santé publique notamment pour les pays sub-sahariens dont le Mali. Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de cas de paludisme dans le monde s'élevait à 228 millions de cas en 2018, avec 405.000 décès, parmi lesquels, 67% chez les enfants de moins de 5 ans (1). Ces dernières décennies, grâce aux mesures de lutte déployées dans le monde, on a assisté à une réduction considérable de l'incidence du paludisme, voire son élimination dans certains pays (2). Ce recul de la maladie a été attribué au déploiement à large échelle des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) et à la pulvérisation intra domiciliaire (PID) à effet rémanent (3).

De nos jours ces progrès sont menacés par entre autres : i) la baisse de ressources financières allouées à la lutte ; ii) l'apparition et la progression rapide de la résistance des vecteurs majeurs du paludisme aux insecticides couramment utilisés dans la lutte ; iii) des changements observés dans le comportement des moustiques dans la recherche d'hôtes humains et de repos à l'extérieur des habitations humaines attribuable aux méthodes de lutte à base d'insecticides. En effet, entre 2011 et 2016, des cas de résistance des vecteurs à au moins une des classes d'insecticide utilisée dans la lutte anti vectorielle ont été observés dans 61 pays endémiques du paludisme. Parmi ceux-ci, 50 pays ont rapporté une résistance à au moins plus de deux classes d'insecticides différents dont le Mali (4). En 2016, la prévalence de la résistance aux pyréthrinoïdes (la seule classe utilisée dans les MILDA) était en moyenne de l'ordre de 78,2% chez les vecteurs majeurs du paludisme dans cinq régions de l'OMS (5). Face à cette situation, il est plus que nécessaire de développer de nouvelles méthodes de lutte antivectorielle qui s'ajouteront à celles déjà existantes afin d'atteindre les objectifs d'élimination et/ou d'éradication du paludisme. Parmi les nouveaux outils en cours de développement on peut citer les appâts de sucre toxiques attractants (6) (Attractive toxic sugar baits), le forçage génétique (7) (gene drive), des agents de lutte biologique ayant peu d'effets sur les non-cibles (8), des pesticides nano-synthétisés chargés de composés microbiens et végétaux (9), l'utilisation de l'incompatibilité cytoplasmique causé par des bactéries endosymbiotique(10) (Wolbachia) etc.

Wolbachia est une bactérie vivant en symbiose dans le cytoplasme des cellules de plusieurs

arthropodes et nématodes (11). Certaines souches ont la capacité de bloquer la réplication virale au sein des moustiques(12). Par exemple, la présence des bactéries Wolbachia chez les moustiques *Aedes aegypti* a permis de bloquer leur infection par le virus de la dengue et certains flavivirus au laboratoire (12). Elles peuvent également manipuler l'appareil reproducteur de ses hôtes par divers mécanismes dont le plus connu est l'incompatibilité cytoplasmique permettant aux bactérie d'atteindre une forte prévalence dans la population naturelle (13). L'incompatibilité cytoplasmique consiste à la réduction partielle ou totale du nombre d'œufs viables après la fécondation d'une femelle non infectée par un mâle infecté par Wolbachia (incompatibilité unidirectionnelle) ou d'une femelle et d'un mâle infectés par des souches différentes de Wolbachia (incompatibilité bidirectionnelle). C'est par cette dernière que l'éradication du *Culex pipiens fatigans d'Okpo*, vecteur majeur de la filariose lymphatique en Asie du Sud-Est, fut possible (14). L'antibiothérapie par la doxycycline chez des personnes atteintes de filariose agirait sur Wolbachia entraînant une diminution ou l'arrêt total de la libération des microfilaires par le ver adulte (15). Certaines souches de Wolbachia réduiraient considérablement l'infection des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique Sub-Saharienne par les *Plasmodium* (16).

La détection de l'infection naturelle des populations d'*An. gambiae s.l.* sauvage par Wolbachia a été faite pour la première fois au Burkina Faso par la technique des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) (17). Par la suite, beaucoup d'autre études en Afrique ont rapporté des cas d'infection naturelle de Wolbachia chez les anophèles notamment le Mali(16)(17). En effet, Gomes et al. (2017) ont montré, après une analyse phylogénétique, l'existence d'une souche de Wolbachia au Mali (wAnga-Mali) différente de celle observée au Burkina Faso (wAnga Burkina). Des expériences d'infestation expérimentale au laboratoire ont montré que la présence de wAnga-Mali réduisait de manière significative le développement du *Plasmodium* au sein d'*Anopheles gambiae s.l.*(18).

Mais, la détection de l'ADN de Wolbachia chez *An. gambiae s.l.* par la biologie moléculaire est complexe. Elle utilise différentes techniques de PCR notamment : la PCR classique, la PCR nichée et la PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR). La PCR en temps réel est plus sensible, plus rapide et ne nécessite de gel d'agarose pour visualiser les résultats, mais elle est très onéreuse. La PCR nichée qui consiste à réaliser deux amplifications dont le produit (amplifié) de la première réaction est utilisé dans la deuxième requiert beaucoup plus de temps, de réactifs et augmente les risques de contamination comparé à la PCR classique. La PCR

classique est la plus simple et la moins onéreuse des trois techniques. Elle est alors la meilleure à être utilisée dans la surveillance de la prévalence de Wolbachia dans la population naturelle d'*An gambiae s.l.* en Afrique et particulièrement au Mali (18). Mais, la pratique a montré que le taux d'ADN de wAnga-Mali dans le produit d'extraction de l'ADN d'*An. gambiae s.l.* par la PCR classique est faible. Pour pouvoir utiliser cette technique dans la surveillance, il y a lieu d'optimiser la méthode d'extraction de l'ADN de manière à améliorer la sensibilité en augmentant le taux d'ADN de wAnga-Mali dans le produit d'extraction pour faciliter sa détection. L'objectif de cette étude est d'améliorer la méthode d'extraction de l'ADN d'*An gambiae s.l.* afin d'améliorer la sensibilité en augmentant la qualité et la quantité de l'ADN de Wolbachia dans le produit d'extraction de l'ADN d'*An gambiae s.l.* en agissant sur les différents paramètres du protocole classique d'extraction et d'amplification de l'ADN.



OBJECTIFS

2 OBJECTIFS

2.1 Objectif principal

Améliorer la qualité et la quantité du taux d'ADN de Wolbachia dans le produit d'extraction de l'ADN d'*An gambiae s.l.* pour augmenter sa sensibilité par la technique de la PCR classique dans les conditions de laboratoire du ICER-Mali.

2.2. Objectifs spécifiques :

- Améliorer la concentration de l'ADN de Wolbachia dans les produits d'extraction d'*An gambiae s.l.* en utilisant du phénol-chloroforme ou le kit du Masterpure
- Évaluer le rendement de l'amplification et de la visualisation des bandes d'ADN de Wolbachia après migration dans un gel d'agarose après PCR en utilisant les amorces 16S rRNA et 16S rRNA + Flap.
- Comparer les profils d'amplification de la qPCR et de la PCR classique



GENERALITES

3 GENERALITES

3.1 Les anophèles

3.1.1 Taxonomie

Les anophèles font partie du règne animal, de l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes ; ordre des Diptères ; famille des Culicidés ; Sous-famille des *Anophelinae* et du genre *Anopheles*. Le genre *Anopheles* compte à peu près 500 espèces (19) dont 41 connues comme des vecteurs possédant un impact majeur en santé publique (20). *An. gambiae s.l.* est le vecteur majeur du paludisme dans la région intertropicale africaine assurant ainsi majoritairement la transmission. Il est un complexe d'espèces. Le complexe est un ensemble d'espèces morphologiquement identiques mais génétiquement différentes avec des préférences écologiques distinctes (21). Le complexe d'*Anopheles gambiae* est composé de neuf espèces qui sont : *An. gambiae* (Giles 1902), *An. Merus* (Dönitz 1902), *An. melas* (Theobald 1903), *An. Arabiensis* (Patton 1905), *An. Quadriannulatus* (Theobald 1911), *An. bwambae* (White, 1985), *An. comorensis* (Bruhnes 1997), *An. amharicus* (Hunt et al 2013), *An. coluzzii* (Coetzee et Wikerson 2013),(22).

3.1.2 Bio-écologie des anophèles

Les anophèles passent par deux phases successives pendant leur développement : la phase aquatique et la phase aérienne. La phase aquatique ou pré-imaginale va de l'œuf à la nymphe. La phase aérienne ou imaginale correspond à la vie de l'adulte ou imago. Le type de gîte adapté à la reproduction peut varier d'une espèce à une autre. Les gîtes larvaires d'*An. gambiae s.l.*, sont composés de collections d'eau de petites tailles, peu profondes, exposées au soleil, dépourvues de végétation. Il s'agit notamment des empreintes de pas, de sabots ou de pneus , de trous de banco, , de marécages partiellement drainés, de rizières, des flaques d'eau suite à la décrue des cours d'eau etc.(23) Ses larves n'étant pas adaptées à l'action du courant, le développement de l'anophèle ne se fait que dans des eaux stagnantes. Seule l'anophèle femelle pique (utilise les protéines contenues dans le sang pour la maturation de ses œufs). Par conséquent, elle est la seule susceptible de transmettre le paludisme.

3.1.2.1 L'œuf

L'anophèle femelle pond 50 à 300 œufs par cycle gonotrophique munis de flotteurs latéraux et plusieurs enveloppes qui n'empêchent pas la dessiccation. Le temps d'éclosion peut varier en fonction de la température : 24 à 48 heures à 30 °C, mais peut atteindre 14 jours dans les régions tempérées(23).

3.1.2.2 Le stade larvaire

Les larves d'anophèles sont dépourvues de siphons respiratoires. Elles se mettent donc toujours parallèles à la surface de l'eau pour respirer, contrairement à celles des Culex qui mettent leurs siphons respiratoires à la surface de l'eau en y maintenant leur corps obliques. On distingue quatre stades de développement larvaire et trois mues successives. Les larves au premier stade (L1) sont de 1mm et le quatrième stade (L4) peut atteindre 6-8 mm à la fin de son développement avant de se transformer en nymphe. Les larves se nourrissent des micro-organismes d'animaux et de végétaux. La durée du stade larvaire est de 8 à 12 jours[26].

3.1.2.3 La nymphe

A la fin de son développement, la larve de stade 4 se transforme en une nymphe. La nymphe est une puppe mobile qui ne se nourrit pas. Elle se présente en forme de virgule et est constituée de deux parties : le céphalothorax et l'abdomen qui comporte huit segments. Le dernier segment possède une paire de palettes natatoires(23)

3.1.2.4 Le stade imago ou adulte

Sur le plan morphologique, l'anophèle adulte comprend trois (03) parties qui sont : la tête, le thorax et l'abdomen.

3.1.2.4.1 La tête

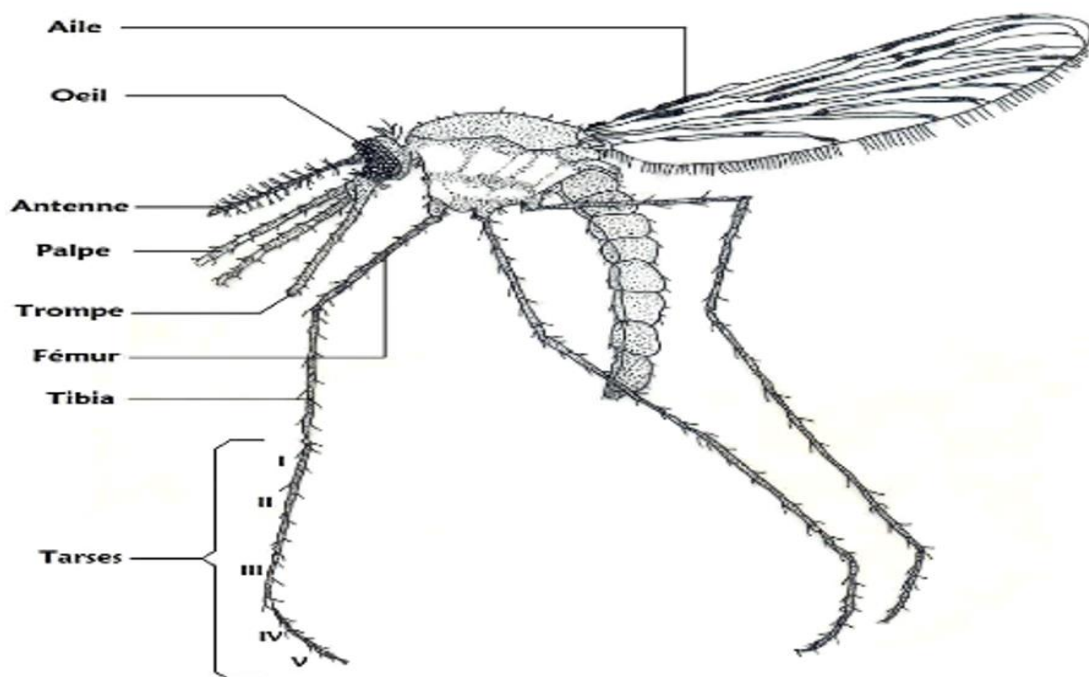
Elle porte deux gros yeux, une paire d'antennes, quinze (15) articles à soies multiples et longues chez le mâle, rares et courtes chez la femelle, de nombreux chémorécepteurs olfactifs servant pour le repérage et la localisation de l'hôte pour le repas de sang. Sous les antennes sont fixées une paire de palpes composés de cinq (05) parties.

3.1.2.4.2 Le thorax

Il est composé de trois (03) segments (prothorax, mésothorax, métathorax) portant chacun une paire de pattes. Le premier segment est réduit tandis que le deuxième est très développé et renferme de puissants muscles ; il porte une paire d'ailes, contrairement au premier. Le troisième segment porte une paire d'haltères qui est l'homologue d'une paire d'ailes postérieures atrophiées, et joue un rôle d'équilibration lors du vol. Les ailes portent de multiples écailles claires et sombres. Le thorax porte également six (06) longues pattes et graciles, constituées de neuf (09) articles.

3.1.2.4.3 L'abdomen

L'abdomen est composé de dix (10) segments dont les derniers sont télescopés à l'intérieur du huitième pour constituer les organes reproducteurs. Chaque segment est composé d'une plaque chitineuse dorsale et d'une plaque ventrale, reliées par une membrane permettant la dilatation de l'abdomen lors de la prise d'un repas de sang et lors du développement des ovaires.



Source : <https://books.openedition.org/irdeditions/10389>

FIGURE 1 : SCHEMA DESCRIPTIF D'UN MOUSTIQUE ADULTE FEMELLE ANOPHELES .(23)

3.1.2.5 Accouplement et fécondation

Une seule copulation suffit à l'anophèle femelle pour la fécondation de ses œufs. Après la formation des essaims (essaimage) par les mâles au crépuscule et le petit matin, les femelles y sont attirées selon les espèces. L'accouplement se fait à l'extérieur comme à l'intérieur des maisons (24). Les spermatozoïdes sont ensuite emmagasinés dans le spermathèque de la femelle d'où elle les extrait peu à peu pour féconder ses œufs (monogamie). Après l'insémination, la femelle part donc à la recherche d'un repas sanguin pour la maturation des œufs. Mais il faut noter qu'une femelle vierge peut aussi prendre un repas de sang.

3.1.2.6 Choix de l'hôte et alimentation

Les habitudes alimentaires et de repos des vecteurs jouent un rôle important dans les programmes de lutte anti vectorielle. La plupart des anophèles femelles prennent leur repas de sang au crépuscule, même si certaines le préfèrent aussi à des heures plus avancées. Certaines espèces préfèrent piquer à l'intérieur des maisons (endophages) et d'autres à l'extérieur (exophages). Le choix trophique varie également selon les espèces. Certaines femelles préfèrent prendre leur repas de sang sur l'homme (anthropophiles), tandis que d'autres le préfèrent sur les animaux (zoophiles). Les anthropophiles sont les plus dangereuses car assurent la transmission de la maladie d'homme à homme. Il faut aussi noter que seuls les femelles prennent un repas de sang et que les mâles et femelles se nourrissent tous de jus sucré.

3.1.2.7 Longévité

La durée de vie d'un anophèle adulte mâle varie d'une semaine à dix jours et de deux à quatre semaines pour la femelle en zone tropicale. Cette longévité peut être augmentée dans les régions tempérées par le fait du phénomène de diapause hivernale (25). La plus longue durée de vie dans la nature d'un anophèle a été observé chez *Anopheles coluzzii* et était de 7 mois(26). La durée moyenne de vie des anophèles est un facteur important dans la transmission vectorielle de la maladie [23].

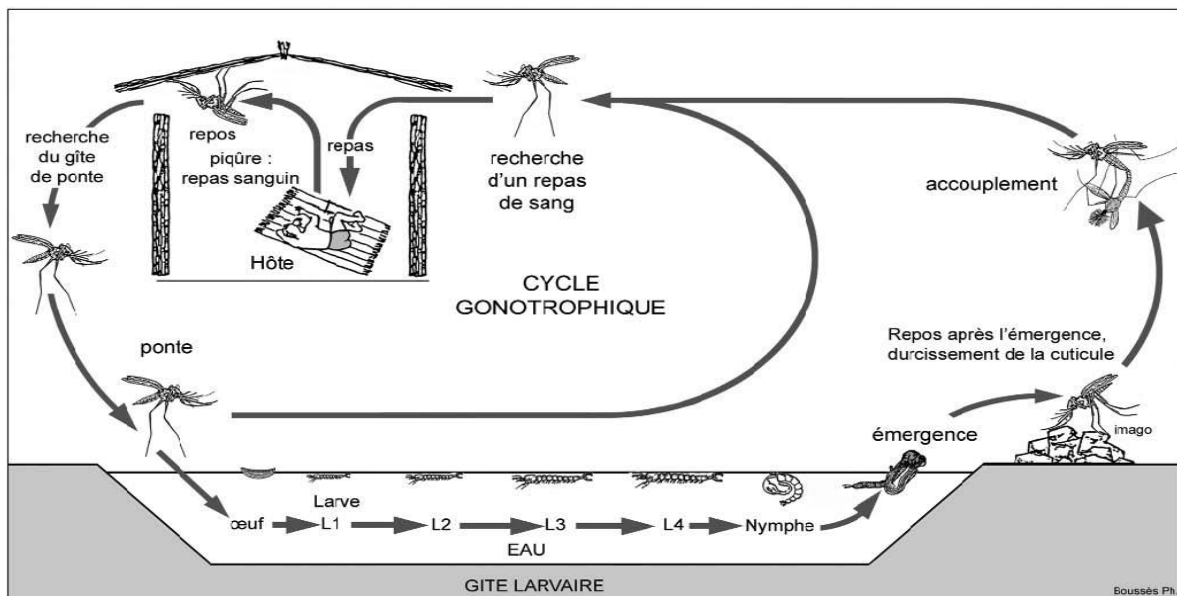
3.1.3 Les cycles du vecteur

3.1.3.1 Cycle biologique

Le cycle de vie des anophèles se passe en quatre stades : le stade zygotique, le stade larvaire, le stade pupaire et, enfin, le stade imaginal (adulte) (Figure 2). Les trois 1^{ers} stades se déroulent en milieu aquatique et durent, en tout, entre 7 jours et 5 semaines selon l'espèce et, surtout, la température ambiante. Le stade adulte se déroule en milieu aérien et dure environ une semaine pour le mâle et jusqu'à deux mois pour la femelle.

3.1.3.2 Cycle trophogonique ou gonotrophique

Le cycle gonotrophique (ou, pour certains auteurs, trophogonique) est la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez le moustique entre deux repas de sang successifs. Il dure généralement deux à trois jours. Le cycle débute par la piqûre d'un hôte vertébré par le moustique femelle, suivi de la digestion du sang, la maturation des ovocytes et se termine par la ponte.



(Source : <https://books.openedition.org/irdeditions/10389>)

FIGURE 2 : CYCLE BIOLOGIQUE D'UN ANOPHELINAE(23)

3.1.4 Lutte antivectorielle

De nos jours, il existe plusieurs moyens de lutte contre l'anophèle femelle et cela depuis son stade larvaire (destruction larvaire, poissons larvivores, bactéries larvicides...) jusqu'à l'âge adulte (pulvérisation intra domiciliaire, moustiquaires imprégnées d'insecticides, les répulsifs...). Mais face au problème grandissant de la résistance aux insecticides compromettant la plupart de ces moyens de lutte, il y a la nécessité de développer de nouvelles techniques de lutte antivectorielle.

3.2 Le Parasite

3.2.1 Systématique

Les parasites du genre *Plasmodium* constituent des protozoaires qui appartiennent à la famille des plasmodidae, classe sporozoaires et au Phylum des apicomplexa. Il existe plusieurs caractéristiques épidémiologiques, biologiques et cliniques distinctes chez ces plasmodiums humains(25). Nous distinguons cinq espèces plasmodiales pouvant causer le paludisme : le *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*.

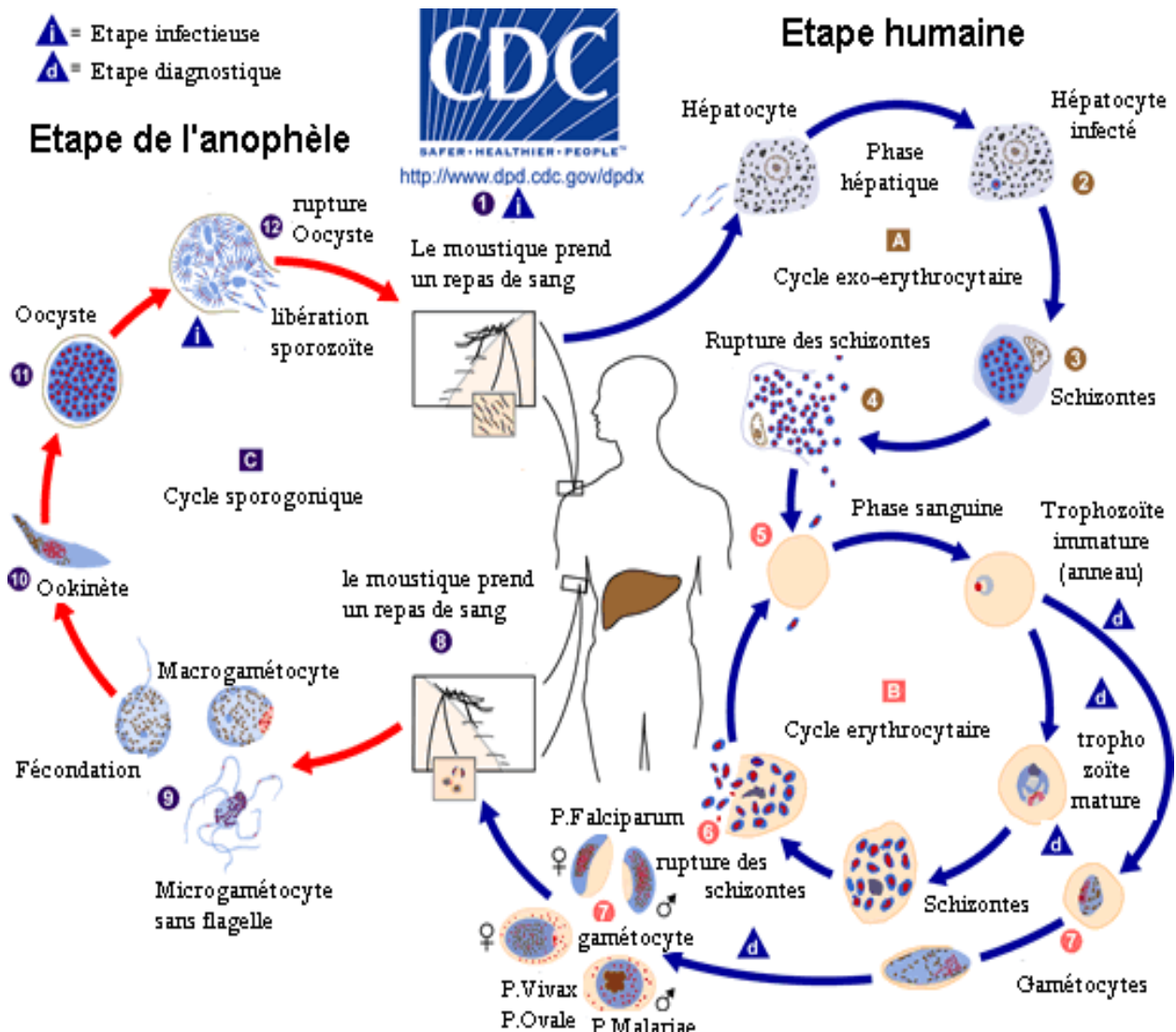
3.2.2 Cycle biologique du *plasmodium*

3.2.2.1 Chez l'anophèle femelle

C'est chez l'anophèle qu'a lieu le cycle sexué du *Plasmodium* encore appelé sporogonie. Ce cycle commence lorsque le moustique ingère des gamétocytes en prenant un repas de sang sur un porteur de gamétocytes de *Plasmodium*. Après l'exflagellation dans l'estomac du moustique, les gamètes mâles et femelles se fusionnent pour donner un zygote. Le zygote évolue en ookinète qui traverse la paroi stomacale et évolue en oocyste, qui, à maturation s'éclate et libère beaucoup de sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires après éclatement de l'oocyste. La durée du développement sporogonique des *Plasmodium* varie en fonction des conditions climatiques : entre 9 et 20 jours pour *P. falciparum* (entre, respectivement, 30°C et 20°C), un peu plus rapide pour *P. vivax* à températures équivalentes, plus long pour *P. malariae*.

3.2.2.2 Chez l'homme

Les sporozoïtes inoculés dans le sang lors d'un autre repas de sang, circulent pendant une trentaine de minutes avant de gagner les hépatocytes où ils vont se multiplier pour donner des mérozoïtes. Ces derniers sont déversés dans le sang et chaque mérozoïte pénètre dans un globule rouge, donne un trophozoïte qui grossit et se transforme en schizonte puis un corps en rosace qui s'éclate pour libérer d'autres mérozoïtes qui attaquent d'autres globules rouges. Ils se transforment de nouveau en trophozoïtes qui donnent des corps en rosace qui s'éclatent de nouveau pour donner d'autres mérozoïtes qui envahissent d'autres hématies, ainsi de suite. L'éclatement répétitif des corps en rosace correspond à l'accès fébrile. Après plusieurs cycles endo-érythrocytaires de ce type, certains trophozoïtes donnent des gamétocytes mâles et femelles qui seront ingérés par l'anophèle femelle lors d'une autre piqûre.



Source : Centre national des maladies infectieuses (CDC, www.dpd.cdc.gov/dpdx) Atlanta Georgie

FIGURE 3 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU PLASMODIUM

3.3 Les bactéries Wolbachia

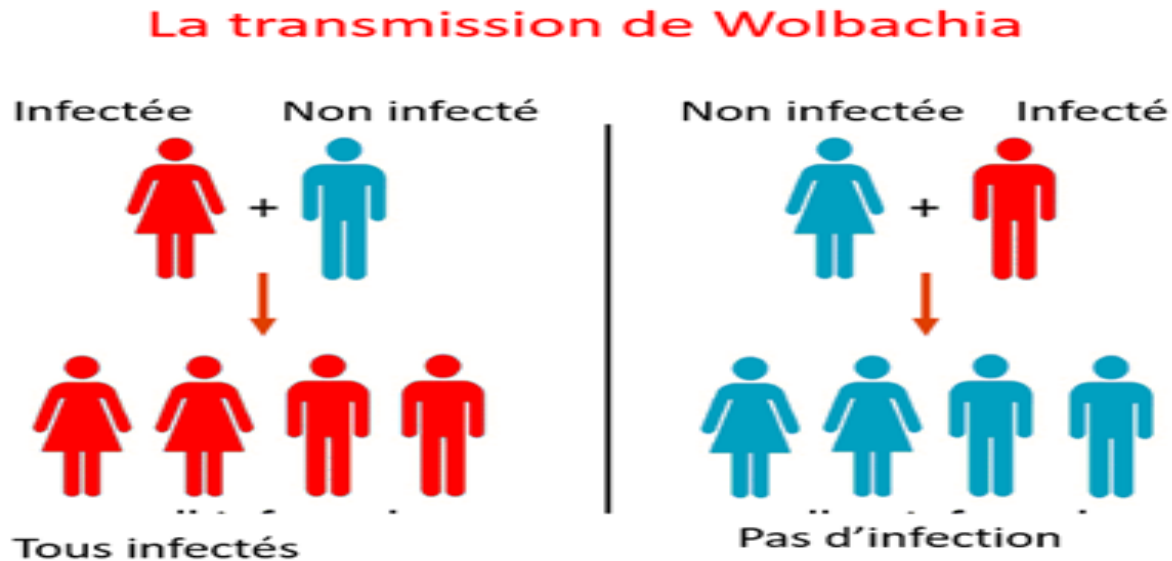
3.3.1 Définition

Les Wolbachia constituent un genre de bactéries qui infecte essentiellement les arthropodes, ainsi que certaines espèces de nématodes. Révélé pour la première fois en 1924 au niveau de l'appareil reproducteur des moustiques *Culex pipiens* par Hertig et Wolbach (27), l'intérêt pour le Wolbachia a considérablement augmenté dans les années 1980. Sa large répartition en fait un des symbiotes les plus répandus dans la biosphère. L'amplification du gène rRNA 16S a permis

d'identifier les différentes souches de Wolbachia qui se répartissent en sept (07) catégories appelées super groupes (super groupes A à H) (27). Les super groupes A et B sont les plus rencontrés chez les arthropodes.

3.3.2 Mode de Transmission

Le mode de transmission de Wolbachia est vertical (des mères aux progénitures) à travers le cytoplasme des ovocytes. Les spermatozoïdes ne peuvent transmettre que le noyau, donc sont inaptes à transmettre la bactérie à leurs descendances. C'est pourquoi Wolbachia manipule l'appareil reproducteur de ses hôtes pour augmenter la valeur sélective des femelles qui sont les seules capables de les transmettre(28). Néanmoins des cas de transmissions horizontales ont été rapportés.



Source : marksecology.blogspot.com

FIGURE 4 : MODE DE TRANSMISSION DE WOLBACHIA

3.3.3 Description morphologique

Les Wolbachia sont des alphaprotéobactéries intracellulaires possédant les mêmes caractéristiques que les Rickettsies (formant des bâtonnets ou des formes arrondies).

3.3.4 Localisation

Les Wolbachia sont plus fréquemment rencontrées au niveau de l'appareil reproducteur et

spécialement dans les cellules germinales mais aussi au niveau du système nerveux et d'autres cellules de l'hôte en quantité infime.

3.3.5 Phénotype associé à Wolbachia

Wolbachia possède une grande variété d'interactions avec ses hôtes. Il a été démontré que la bactérie peut être mutualiste obligatoire de la punaise de lit, *Cimex lectularius* en fournissant à son hôte de la vitamine B pour assurer sa survie (29). Elle peut également être un mutualiste facultatif en apportant des bénéfices directs pour le fitness de ses hôtes. A titre d'exemple nous pouvons citer : l'augmentation de la fécondité [26, 28, 29], la longévité [30, 31] ou même la protection de ses hôtes contre les ennemis naturels, en l'occurrence des infections virales. Il a été prouvé que certaines souches de Wolbachia (*wMel* et *wMelCS*) empêchent la multiplication du *Drosophila C virus* (DCV) en conférant un phénotype protecteur à *Drosophila melanogaster* (35). Partant de cette capacité à s'interférer avec la réplication virale, la présence de certaines souches de Wolbachia diminuerait la compétence vectorielle de plusieurs espèces de moustiques (36). Cela s'étend bien à d'autres pathogènes comme *Plasmodium* dans le genre *Anopheles* où les femelles infectées par Wolbachia ont une quantité inférieure de sporozoïtes infectieux dans les glandes salivaires par rapport aux femelles non infectées (37). C'est grâce à cette même capacité que la bactérie a été utilisée pour limiter la transmission du virus de la Dengue chez le moustique *Aedes aegypti*.

La transmission maternelle de Wolbachia l'oblige à manipuler la reproduction de ses hôtes. Ces manipulations ont pour conséquence de biaiser la sex-ratio en faveur des femelles ou de favoriser les femelles infectées aux dépens des mâles non infectés. A ce jour, quatre grands types de manipulation sont connus : la féminisation phénotypique, la parthénogénèse thélytoque, le male-killing et l'incompatibilité cytoplasmique (IC) (28).

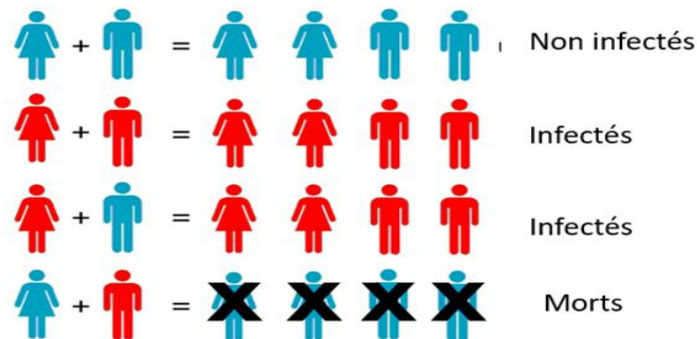
Dans la féminisation, les individus supposés mâles (génétiquement) fonctionnent comme des femelles. Elle a été observée chez des crustacés isopodes terrestres (38). Chez le cloporte *Armadillidium vulgare*, Wolbachia empêcherait le développement des glandes androgènes responsables de la différenciation des caractères primaires et secondaires chez les mâles (39). Chez les espèces haplo-diploïdes, les mâles sont engendrés par la reproduction asexuée et les femelles par la reproduction sexuée (parthénogénèse arrhénotoque). Certaines souches de Wolbachia ont la capacité de diploïdie des œufs non fécondés, assurant la production de femelles

par parthénogénèse thélytoque sans fécondation(40). Pour ces deux types de manipulation, parthénogénèse thélytoque et féminisation, les mâles (individus non transmetteurs), sont transformés en individus capables de transmettre la bactérie en augmentant la transmission de la bactérie dans la population naturelle. Wolbachia peut également entraîner la mort des embryons mâles (male-killing). Ce phénomène réduit considérablement la compétition frère-sœur et diminue les risques de consanguinité. Une surrégulation des gènes responsables de l'apoptose et de cassure de l'ADN au niveau du chromosome X (uniquement observé chez le mâle) serait la cause de ce phénomène (41). Enfin, l'incompatibilité cytoplasmique (IC) est le phénotype manipulateur de la reproduction de Wolbachia le plus connu. C'est sur ce dernier que plusieurs projets de lutte anti vectorielle reposent.

3.3.5.1 L'incompatibilité cytoplasmique (IC)

L'IC est la mort totale ou partielle des œufs issus de croisements des individus infectés par la bactérie Wolbachia. En 1971, pour la première fois Wolbachia a été désignée comme l'agent responsable de l'IC chez le moustique(42). Elle peut être unidirectionnelle quand elle survient suite au croisement entre un mâle infecté et une femelle non infectée par la bactérie, ou bidirectionnelle quand le mâle et la femelle sont infectés par différentes souches de Wolbachia. Chez les espèces diploïdes, la mort embryonnaire est considérablement élevée pouvant atteindre 100% chez *Culex pipiens* (43). Le croisement entre une femelle infectée et un mâle non infecté ainsi que le croisement entre deux individus infectés par Wolbachia étant compatibles, les femelles infectées sont considérablement favorisées par rapport aux femelles non infectées car ne peuvent pas donner des descendant viables avec les deux types de mâles tandis que les femelles non infectées ne pourront avoir des descendants viables qu'avec les mâles non infectés. L'IC procure par conséquent un avantage sélectif aux femelles infectées qui peuvent envahir les populations initialement non infectées(10). En cas d'incompatibilité bidirectionnelle, la souche la plus fréquente éliminerait la plus rare et envahirait la population hôte (44).

Incompatibilité cytoplasmique



Les mâles infectés sont incompatibles avec les femelles non infectées

Source : igtrcn.org

FIGURE 5 : INCOMPATIBILITE CYTOPLASMIQUE

3.3.6 Wolbachia au service de l'homme

Depuis 1960, les scientifiques ont envisagé d'utiliser Wolbachia comme moyen de lutte anti vectorielle grâce à ses effets sur ses hôtes. Deux stratégies distinctes ont été adoptées, toutes se basant partiellement ou complètement sur l'utilisation de l'IC. Ces stratégies sont : (i) remplacer les populations d'hôtes résidentes par les individus dont la compétence vectorielle est affectée par présence de la bactérie Wolbachia, (ii) diminuer la taille des populations de l'espèce cible par la stérilisation.

3.3.6.1 Remplacement des populations

Cette stratégie a été étudiée seulement chez les moustiques vecteurs de pathogènes pour l'homme, en l'occurrence le moustique *Aedes aegypti*. L'idée de cette approche est de remplacer les populations de l'espèce ciblée par une lignée de laboratoire qui possède des traits intéressants donnés par Wolbachia pour la lutte antivectorielle. L'objectif est d'utiliser le pouvoir invasif de Wolbachia donné par l'incompatibilité cytoplasmique afin que la nouvelle population remplace la résidente. Le principe étant d'introduire dans l'espèce cible une souche de Wolbachia induisant de l'IC puis de relâcher des mâles et femelles infectés par cette nouvelle souche pour qu'ils envahissent la population. La souche introduite pourrait par conséquent diminuer la compétence vectorielle de l'espèce cible.

3.3.6.2 Suppression des populations

Cette méthode repose sur des lâchers fréquents et inondant des moustiques mâles, infectés par une souche de *Wolbachia* qui induit l'IC lors de croisements avec les femelles de la population cible dont le but est également de diminuer les densités de populations.

3.4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

3.4.1 Définition

L'amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou **réaction de polymérisation en chaîne (PCR)** est l'abréviation anglaise) est une méthode de biologie moléculaire par laquelle une séquence connue d'ADN ou d'ARN est multipliée en grand nombre de copies identiques (à la séquence connue) par plusieurs duplications en utilisant des amorces spécifiques.

3.4.2 Principe

C'est une technique fondée sur la répétition de cycles de transition de température dans un thermocycleur sous l'action de la Taq polymérase (un ADN polymérase utilisé pour l'amplification de l'ADN) avec des amorces spécifiques qui flanquent la portion à multiplier et des nucléotides. La Taq polymérase est extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, un microorganisme thermophile vivant près de sources chaudes. Cette bactérie à gram négatif a été mise en évidence par Thomas Brock en 1966 dans une source d'eau chaude près du parc Yellowstone. A la fin de la réaction, une quantité importante et exploitable de copie d'une séquence d'ADN choisie est obtenue.

3.4.3 Les composants d'une amplification par PCR

Le milieu réactionnel doit contenir :

- Les amorces : de petites séquences d'oligonucléotides mono brins constitués de 18 à 22 pb (paire de base) sens et anti-sens complémentaires aux deux extrémités de la séquence à amplifier ;
- Des désoxyribonucléotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP, dTTP qui servent de substrat pour former le nouveau brin dans la réaction ;
- La Taq polymérase, l'enzyme thermostable assurant la formation du nouveau brin à

travers les amorces ;

- Un milieu optimal contenant du $MgCl_2$ pour permettre à la Taq polymérase d'agir.

A ce mélange est ajouté l'ADN extrait pour l'amplification.

3.4.4 Étapes de réalisation

Chaque cycle comporte trois (03) phases qui sont : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation

3.4.4.1 Dénaturation

Durant de 0 à 1 minute, cette étape consiste à séparer les deux brins d'ADN en brisant les liaisons hydrogènes sous l'effet de la température ($95^{\circ}C$), les liaisons hydrogène séparant les nucléotides sont incapables de se maintenir à une température supérieure à $80^{\circ}C$.

3.4.4.2 Hybridation

La réduction de température permet aux liaisons d'hydrogène de se remettre en place. Cependant, c'est au cours de cette phase que les amorces (sens et anti-sens) se lient à l'ADN matrice sous l'effet d'une température thermodynamiquement acceptable (56 à $64^{\circ}C$ selon l'amorce).

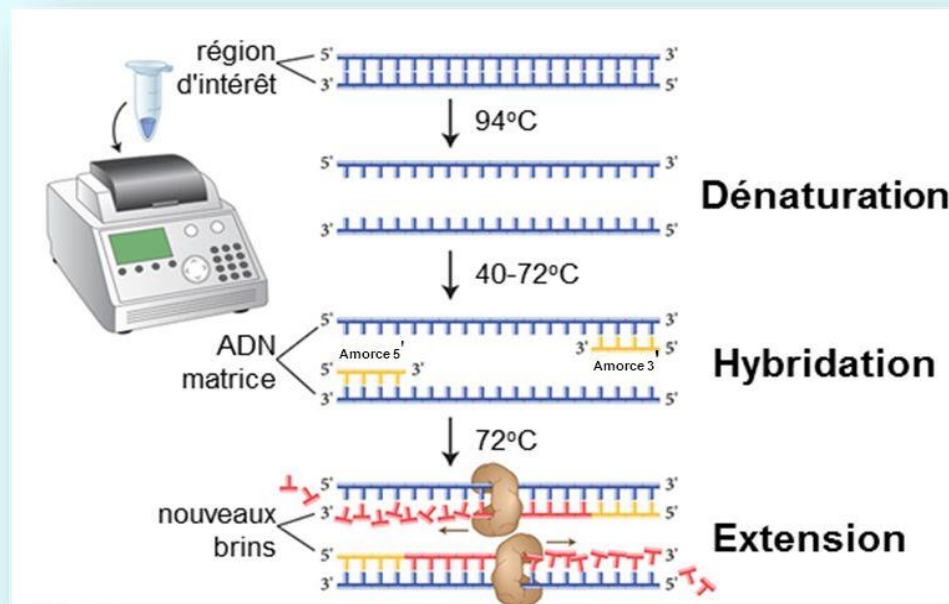
La température d'hybridation :

- Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'amplification est sélective et moins nous avons la chance d'avoir des produits non spécifiques. Elle est parfois choisie en fonction de la température de fusion (T_m) encore appelée température de demi-dénaturation.
- La Température de fusion (T_m) : est la température à laquelle la moitié de la séquence à amplifier est dénaturée.

3.4.4.3 Élongation ou extension

C'est la phase pendant laquelle les polymérases synthétisent de nouveau brin complémentaire à la séquence matrice à partir des amorces et en utilisant des dNTPs présents dans la réaction à une température optimale (très souvent $72^{\circ}C$).

PCR - étapes du cycle



Source : slideplayer.fr

FIGURE 6 : LES DIFFERENTES ETAPES DE PCR

3.4.5 Les variantes de la PCR

3.4.5.1 Nested PCR ou PCR nichée

Elle consiste à faire deux réactions successives pour amplifier spécifiquement une séquence, le produit de la première PCR est utilisé dans la deuxième pour augmenter la sensibilité et la spécificité. A noter que les amorces utilisées dans la deuxième réaction sont plus spécifiques que celles utilisées dans la première.

3.4.5.2 La PCR asymétrique

C'est l'utilisation d'une plus faible quantité d'une des amorces au cours d'une réaction de PCR. La PCR asymétrique assure le séquençage direct des fragments amplifiés. Pendant les 20 à 25 premiers cycles, l'ADN double brin est formé et celui du simple brin est généré pendant les 5 à 10 derniers cycles après l'épuisement de l'amorce de faible quantité.

3.4.5.3 La PCR multiplexe

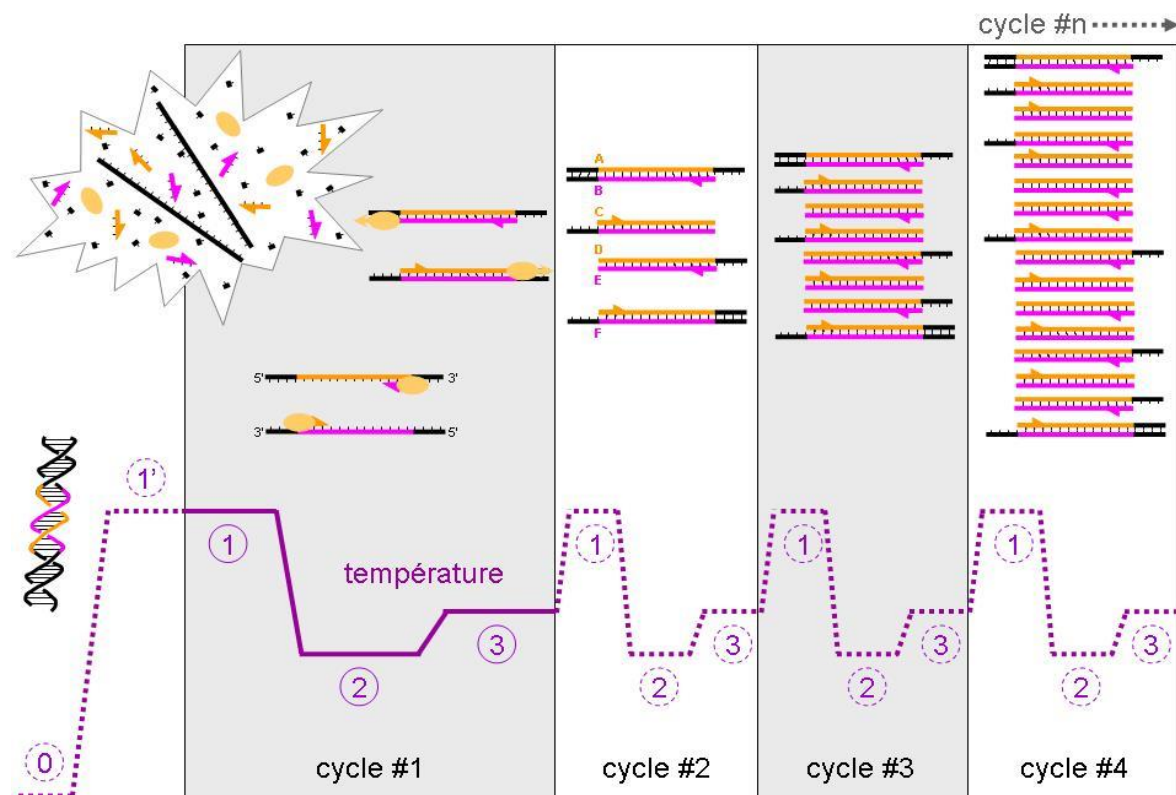
Il consiste à amplifier plus d'un amplicon à la fois par utilisation de plusieurs paires d'amorces dans une même réaction, chacune d'elles spécifiques pour une region cible.

3.4.5.4 La PCR quantitative (qPCR) ou real time PCR

Contrairement à la PCR classique dont le résultat n'est connu qu'à la fin de la réaction (sur un gel d'agarose par exemple), la qPCR nous permet de quantifier l'ADN polymérisé après chaque cycle (temps réel) par un marqueur fluorescent dont le « Syber-Green ».

3.4.5.5 La RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcriptase) est une technique qui accomplit une transcriptase inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle permet la synthèse du brin complémentaire d'un ARN par des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante. Par conséquent, cet ADN nouvellement formé (ADNc) sera amplifié par PCR.



Source : fr.wikipedia.org

FIGURE 7 : LE PROCESSUS D'AMPLIFICATION

MATERIELS ET METHODES

4 MATERIELS ET METHODES

4.1 Cadre d'étude

Cette étude se situe dans le cadre de la collaboration entre l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) et les Instituts Nationaux de la Santé des États Unis d'Amérique (NIH). Il s'agit particulièrement d'une étude du Laboratoire de Recherche sur les Vecteurs du Paludisme (LMVR) au Mali portant sur les interactions entre les vecteurs du paludisme et des parasites.

4.2 Période et type d'étude

Il s'agissait d'une étude expérimentale sur la détection de *Wolbachia* chez *An. gambiae s.l.* adulte sauvage par la technique de la PCR qui s'est déroulée de septembre 2018 à décembre 2019.

4.3 Site d'étude

Les échantillons utilisés lors de ce travail ont été collectés à Kenieroba (8,33°W et 12,11°N), situé sur l'axe Bamako-Kangaba et à 71 km au Sud-Ouest de Bamako, dans la commune rurale de Bancoumana, cercle de Kati, Région de Koulikoro. Kenieroba est limité à l'Est par Sambada, à l'Ouest par Madina, au Nord par Ticko et au Sud par Gueleba. Une plaine d'environ 1,5 km, inondable en saison des pluies et utilisée pour la culture pluviale du riz et le maraîchage, sépare le village de Kenieroba du fleuve Niger.

Selon Namory KEITA, un notable du village, Kenieroba a été créé vers le 13^{ème} siècle par Maré Famoussa Keïta fils de Finadougou Koman qui est un des fils de Soundiata Keïta, fondateur de l'Empire du Mandé. Le village est composé de trois quartiers qui sont : Barada (le plus ancien), Sambada, et Bougoufié.

Kenieroba comptait 2593 habitants en 2014 (recensement MRTC/FMPOS). Les types d'habitats fréquemment rencontrés sont : les cases quadrangulaires (ou rectangulaires) recouvertes de tôle les cases rondes au toit en paille et ainsi que quelques maisons entièrement bâties en ciment. La population est majoritairement musulmane et essentiellement composée de malinkés. Mais on y rencontre également d'autres ethnies comme les soninkés, les bambaras, les peulhs et les soussous. L'agriculture, la pêche l'élevage et l'artisanat sont les principales activités économiques. Le choix de Kenieroba (un des sites d'étude du MRTC depuis 2006) se justifie par

son accessibilité en toute saison, mais aussi des études préliminaires menées dans cette localité ont montré une prévalence élevée de la bactérie Wolbachia dans la population d'*An. gambiae s.l.* en 2017(18).

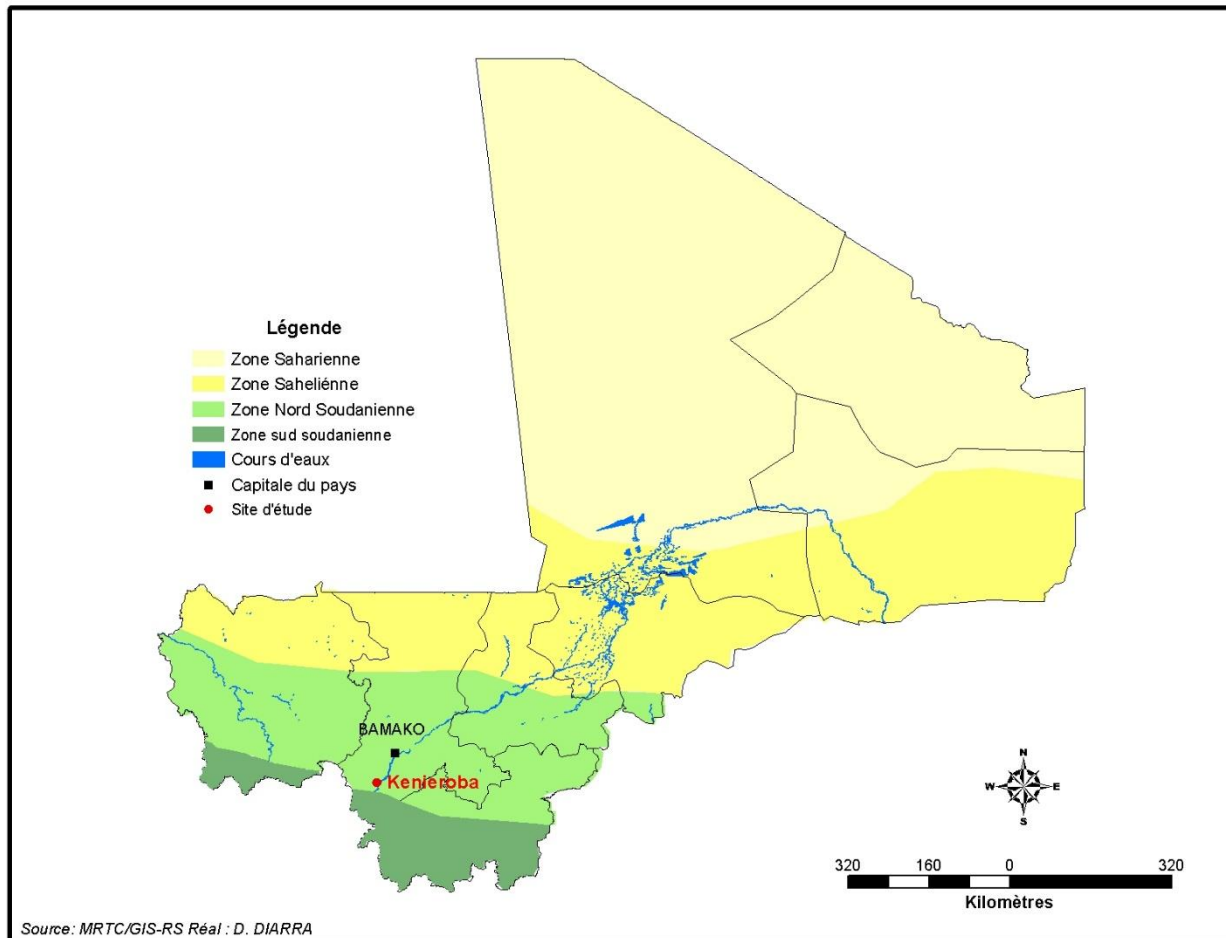


FIGURE 8 : LA CARTE ECO-CLIMATIQUE DU MALI AVEC SITE D'ETUDE

4.4 Collecte des échantillons

Les échantillons utilisés étaient des femelles d'*An. gambiae s.l.* collectées par aspersion d'insecticide (Spray catch) dans les habitations humaines. Les moustiques collectés étaient conservés individuellement dans des tubes 0.5 ml contenant du Silicagel.

4.5 Traitement des échantillons

Dans l'extraction, nous avons utilisé la « tête-thorax » des moustiques. Après l'extraction de l'ADN, nous avons utilisé deux techniques de la réaction de polymérisation en chaîne : la PCR classique, la PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR). La PCR classique est la technique

standard que nous avons utilisée pour valider l'extraction de l'ADN des moustiques. Elle a été également optimisée pour la détection de Wolbachia. La PCR en temps réel diffère de la première par le fait que la visualisation de ses résultats ne nécessite pas la préparation de gel d'agarose. Elle est plus sensible et plus rapide que la précédente, mais très onéreuse. Les principes, modes opératoires et matériels des deux techniques sont décrits en **annexe 2**.

4.5.1 Extraction de l'ADN

4.5.1.1 Mode opératoire

L'extraction simultanée de l'ADN du moustique et de celle de la bactérie Wolbachia est une étape essentielle pour la réussite de la PCR. A cet effet nous avons comparé deux méthodes d'extraction afin de déterminer celle qui fournit la meilleure qualité et quantité d'ADN de Wolbachia.

Les protocoles des deux techniques sont décrits en **annexe 1**

4.5.1.2 La comparaison des deux méthodes d'extraction en termes d'efficacité

Après l'extraction, la qualité et la quantité d'ADN extraite de chaque spécimen ont été mesurées par le spectrophotomètre à 260 nm. La qualité a été estimée en déterminant la densité optique (DO) et la quantité en déterminant la concentration de l'ADN. La densité optique requise pour un échantillon non contaminé est comprise entre 1,7 et 2,0. Toute valeur inférieure à 1,7 indique une éventuelle contamination par les protéines. La concentration d'ADN est directement affichée par le spectromètre en ng/μl.

4.5.2 L'amplification de l'ADN par la PCR

4.5.2.1 Les amorces utilisées dans la détection

Les amorces spécifiques pour activer la réplication ainsi que les séquences d'ADN d'*An gambiae* s.l. et de Wolbachia à répliquer sont présentés dans le tableau I ci-dessous.

TABLEAU 1 : AMORCES SPECIFIQUES POUR LA DETECTION D'ANOPHELES GAMBIAE S.L. ET LA BACTERIE WOLBACHIA

Amorces	Séquences	Cible	Température de fusion (Tm)
S7 sens	5'AGAACCAGCAGACCACCATC 3'	ADN d' <i>An gambiae s.l.</i>	62,4°C
S7 anti sens	5'GCTGCAAACCTTCGGCTATTC 3'		60,4°C
qPCR V68 sens	5'CATACCTATTCTGAAGGGATA G3'	ADN de Wolbachia	58,7°C
qPCR V68 anti sens	5'TTGCGGGACTTAACCCAACA 3'		60.4°C

4.5.2.2 Composition du milieu réactionnel

TABLEAU 2 : DETECTION DE L'ADN DU MOUSTIQUE AN. GAMBIAE S.L.

Réactifs	Quantité en µl pour 1 échantillon	Quantité en µl pour X échantillon
Master Mix Green Taq (PCR classique)	10	10X
Master Mix SybrGreen (si qPCR)	10	10X
Eau ultra pure pour biologie moléculaire	8.4	8.4X
S7 sens	0.3	0.3X
S7 anti sens	0.3	0.3X
Total	19	19X

TABLEAU 3 : DETECTION DE L'ADN DE LA BACTERIE WOLBACHIA

Réactifs	Quantité pour 1 échantillon (µl)	Quantité en pour X échantillon (µl)
Master Mix Green Taq (PCR classique)	10	10X
Master Mix SybrGreen (qPCR)	10	10X
Eau ultra pure pour biologie moléculaire	8.4	8.4X
Wsp-V68 sens	0.3	0.3X
Wsp-V68 anti sens	0.3	0.3X
Total	19	19X

Les volumes et constituants du milieu réactionnel nécessaires pour assurer la réplication de l'ADN d'*An. gambiae s.l.* sont consignés dans le tableau II, et ceux pour Wolbachia dans le tableau III.

4.5.2.3 Identification par PCR classique

4.5.2.3.1 Identification de l'ADN d'*An. gambiae s.l.* par le gène S7 rRNA

TABLEAU 4 : PROGRAMME D'AMPLIFICATION PCR CLASSIQUE DE L'ADN D'AN. GAMBIAE S.L. PAR LE GENE S7 RRNA

Phase	Température	Temps	Nombre de cycle
Préchauffage	94°C	10 Minutes	1
Dénaturation	94°C	45 Secondes	30
Hybridation	60°C	45 Secondes	30
Élongation	72°C	1 minute	30
Élongation finale	72° C	10 Minutes	1

Après l'amplification le produit est visualisé sur un gel d'Agarose 2% à l'aide d'une machine à UV. La préparation et la visualisation du gel se trouve en **annexe 2**

4.5.2.3.2 Optimisation de la détection de l'ADN de Wolbachia par la PCR classique

Pour la détection de l'ADN de Wolbachia, nous avons utilisé des amorces spécifiques pour Wolbachia (Wsp V68_qPCR) qui amplifient un fragment du gène 16S de ARN ribosomique (16S rRNA) qui est un gène commun pour plusieurs cellules procaryotes. L'optimisation a concerné deux facteurs principaux à savoir : la température d'hybridation et le nombre de cycle d'amplification.

4.5.2.3.2.1 La température d'hybridation

La température optimale du gène à amplifier à partir des amorces a été recherchée. Elle est choisie en fonction de la température de fusion T_m (Température à laquelle la moitié du fragment d'ADN est sous forme de monobrin). Elle a constitué à faire varier la température jusqu'à obtenir une température optimale d'hybridation. Une hybridation aux températures de **56°C** puis **58°C** et **60°C** a été effectuée pour optimisation afin d'obtenir une meilleure hybridation de l'ADN du moustique et de Wolbachia.

4.5.2.3.2.2 Le nombre de cycle d'amplification

La recherche du nombre de cycle d'amplification optimale pour les différentes PCR a été effectuée en faisant varier le nombre de cycles d'amplification. A noter qu'un petit nombre de cycle n'entraîne pas l'amplification de l'ADN de Wolbachia et un nombre de cycle très élevé peut aboutir à l'amplification des produits non spécifiques. Le nombre de cycle d'amplification dans le protocole de départ était de 45 cycles. Ensuite nous l'avons fait varier en le réduisant progressivement jusqu'à 40 cycles afin d'obtenir une meilleure qualité des bandes recherchées.

4.5.3 Réaction par polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)

4.5.3.1 Uniformisation des concentrations d'ADN avant la PCR

Après l'extraction, la concentration en ADN des échantillons a été mesurée par le spectromètre. Ensuite les différentes concentrations d'ADN obtenues ont été uniformisées à 20ng/μl dans un volume de 20μl de TE en utilisant la formule $C1V1 = C2V2$ où C1 représente la concentration initiale en ADN, C2 la concentration finale, V2 le volume final par conséquent V1 le volume à

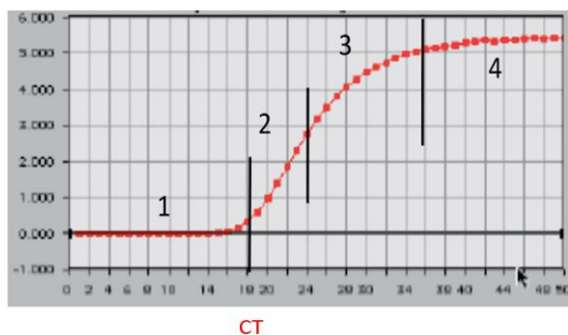
prélever de l'ADN initial en faisant des dilutions.

4.5.3.2 Détection de l'infection à Wolbachia par la qPCR

La détection de l'infection à Wolbachia a été faite sur 32 spécimens d'*An. gambiae s.l* collectés en août (8 échantillons), septembre (13 échantillons) et octobre (11 échantillons) 2019 à Kenieroba.

4.5.3.2.1.1 Mode opératoire

Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman1 et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN double brin. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé « Ct » pour « Cycle Threshold » soit « cycle seuil ». C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Le principe de qPCR est qu'à chaque cycle le nombre de produit d'amplification double. Plus le nombre de cycle augmente, plus la chance d'amplification des produits non spécifiques est élevée.



- 1: Amplification non détectable
- 2 et 3: Phase exponentielle ou phase de détection
- 4: Phase de Plateau
- CT: Valeur du cycle à partir duquel le produit devient détectable

Source: EMV_QPCR%20Pepigenetique_2011.pdf

FIGURE 9 : EXEMPLE DE LA COURBE D'AMPLIFICATION DE QPCR

4.5.3.2.2 Programme d'amplification par la qPCR

TABLEAU 5: PROGRAMME D'AMPLIFICATION DE QPCR DANS LE THERMOCYCLEUR

Phase	Température	Temps	Nombre de cycle	Lecture de la plaque
-------	-------------	-------	-----------------	----------------------

Préchauffage	95°C	15 Minutes	1	NON
Dénaturation	95°C	10 Secondes	45	NON
Hybridation	60°C	20 Secondes	45	NON
Élongation	72°C	45 Secondes	45	NON
	79°C	30 Secondes	30	OUI
Élongation finale	72° C	5 Minutes	1	NON

4.5.3.2.3 Visualisation sur gel d'agarose du produit de la qPCR

Après l'amplification par la PCR en temps réel (qPCR), nous avons réalisé le gel d'agarose pour chaque produit amplifié afin de les comparer aux courbes de détection.

Les produits d'amplification de la qPCR ont été visualisés sur gel d'agarose pour confirmer les spécimens positifs à l'infection à Wolbachia.

4.6 Saisie et analyse des données

Les données ont été saisies sur Microsoft Word version 2016. Les résultats de la PCR classique ont été visualisés sur un gel d'Agarose 2% à l'aide d'une machine à UV. La taille moléculaire attendue des bandes après l'amplification du fragment de gène par les amorces était de **100pb**. Les valeurs Ct (nombres de cycle auxquels la courbe croise le seuil d'amplification dans la phase exponentielle) sont utilisées pour interpréter les résultats de la PCR en temps réel. Dans la détection de *Anopheles gambiae s.l.*, tous les échantillons avec une valeur **Ct inférieure à 30** sont considérés **positifs**. De même pour celle de Wolbachia, les échantillons avec une valeur **Ct inférieure à 35** sont **positifs**.



RESULTATS

5 RESULTATS

5.1 Comparaison des deux procédures d'extraction

Nous avons comparé deux méthodes d'extraction pour avoir une quantité d'ADN suffisante et pure pour la détection.

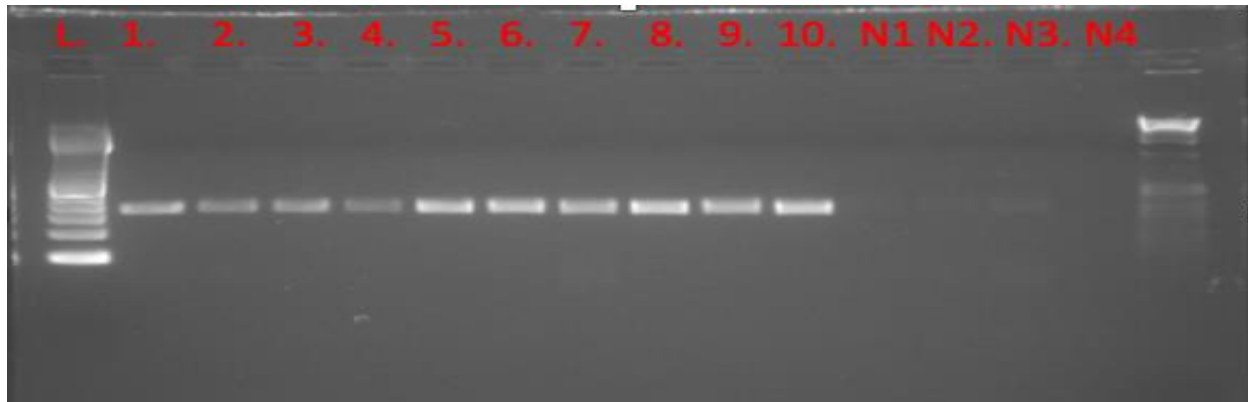
TABLEAU 6 : COMPARAISON DE LA QUANTITE ET DE LA QUALITE (PURETE) DE L'ADN (MOUSTIQUE + WOLBACHIA) A PARTIR DES DEUX METHODES D'EXTRACTION EN FONCTION DE LA DENSITE OPTIQUE

Méthode d'extraction	Concentration moyenne en ng/ μ l	La valeur moyenne de la densité optique DO	Les valeurs Min & Max de la DO
Phénol-Chloroforme	6	2,29	0,77 - 5,97
Kit d'extraction Masterpure	87,24	2,06	1,53 - 2,24

Les plus fortes concentrations en ADN ont été obtenues à partir de l'extraction avec le kit MasterPure avec une concentration moyenne de **87,24ng/ μ l** contre 6ng/ μ l pour la technique par phénol-chloroforme. Le taux de contamination par les protéines était également plus faible avec le kit d'extraction MasterPure avec une valeur moyenne de **2,06** contre **2,29** pour la technique par phénol-chloroforme.

5.2 Amplification de l'ADN du moustique *An. gambiae s.l.* par les amorces S7

La **Figure 10** montre la photo du gel obtenue après amplification de l'ADN extrait des spécimens. C'est à partir de 30 cycles et à la température de 60°C qu'apparaissent les courbes permettant d'identifier l'ADN d'*An. gambiae s.l.* Tous les spécimens testés étaient des *An.gambiae s.l* Notons que la taille attendue des échantillons positifs (N 1 à 10 sur le gel) était environ 450 bp.

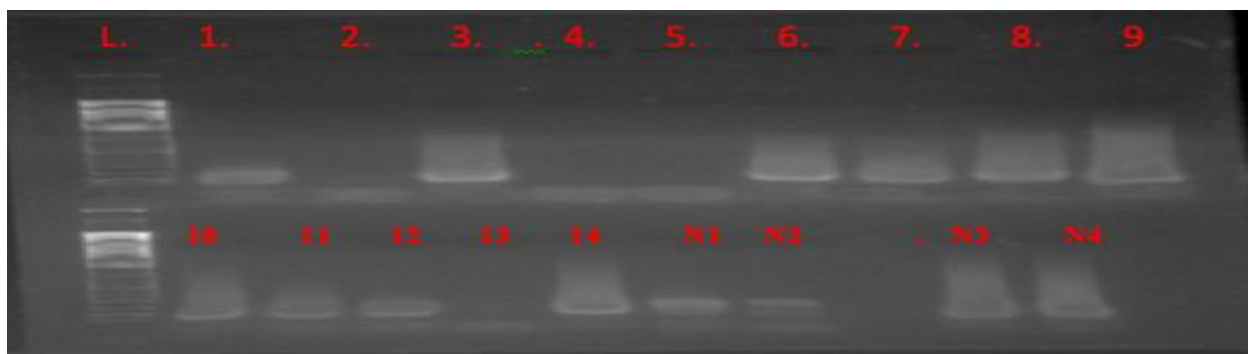


L : Marqueur moléculaire 100 bases paires ; **1-10** Représentent les échantillons : ADN d'*Anopheles gambiae s.l.* ; **N1-N2** : Contrôles Négatifs de l'extraction ; **N3-N4** : Contrôles négatifs de PCR

FIGURE 10 : RESULTAT DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE DE L'ADN D'AN GAMBIAE S.L.

5.3 Optimisation de l'identification de l'ADN de Wolbachia avec les amorces 16S rRNA (Wsp-V68)

La figure 11 représente la photo du gel obtenu dans le processus d'optimisation de la détection de l'ADN de Wolbachia à partir de 45 cycles d'amplification et à la température de 56°C. Elle montre des bandes qui ne sont pas nettes avec des trainées rendant l'interprétation difficile.



L : Marqueur moléculaire 100 bases paires ; **1-14** : Bandes représentant ADN de la bactérie *Wolbachia* ; **N1-N2** : Contrôles Négatifs de l'extraction ; **N3-N4** : Contrôles Négatifs de la PCR

FIGURE 11 : RESULTAT DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE DE L'ADN DE WOLBACHIA APRES AMPLIFICATION A 45 CYCLES AVEC 56°C COMME TEMPERATURE D'HYBRIDATION DES AMORCES.

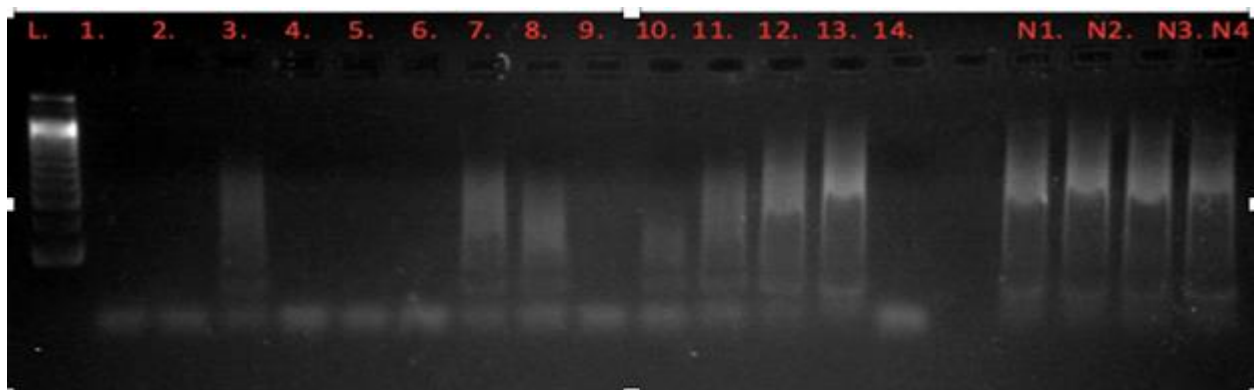
La **Figure 12** montre la photo du gel après 40 cycles d'amplification et à température d'hybridation de 58°C. Sur cette figure les bandes sont plus claires et ont la bonne taille moléculaire qui est autour de 100pb. Mais des bandes non spécifiques apparaissent au niveau des contrôles négatifs de l'extraction (N1 et N2).



L : Marqueur moléculaire 100bp ; 1-14 : Bandes représentant l'ADN de Wolbachia ; N1-N2 Contrôles négatifs de l'extraction N3-N4 Contrôles négatifs de PCR

FIGURE 12 : RESULTAT DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE DE L'ADN DE WOLBACHIA APRES AMPLIFICATION A 40 CYCLES AVEC 58° COMME TEMPERATURE D'HYBRIDATION

Enfin nous avons conservé 40 cycles d'amplifications mais pour résoudre l'apparition des bandes non spécifiques au niveau des contrôles négatifs de l'extraction nous avons amené la température d'hybridation des amorces à 60°C ce qui nous a permis d'obtenir la **figure13** qui montre des bandes claires ayant la bonne taille moléculaire (100pb) mais avec une faible intensité.

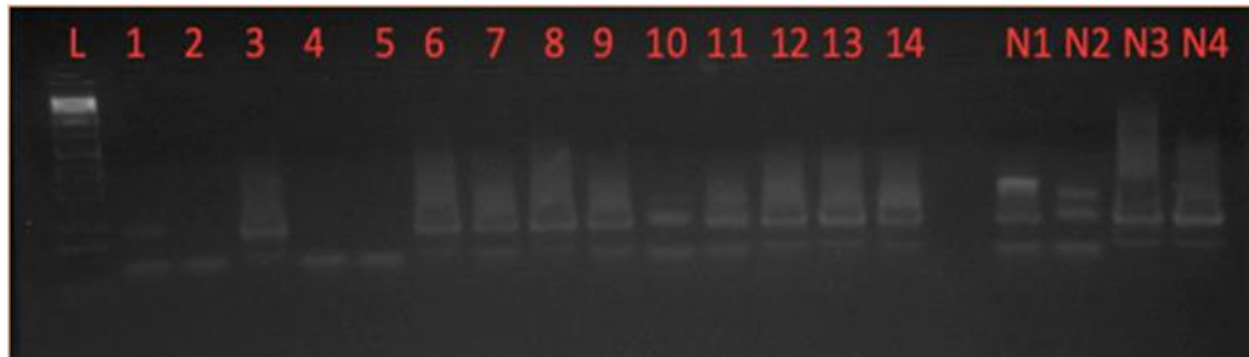


L : Marqueur de taille moléculaire 1 kilo paire de bases ; 1-14 échantillons positifs (trois parmi eux se sont révélés négatifs) ; N1-N2 Négatifs contrôles de l'extraction ; N3-N4 Négatifs contrôles de PCR

FIGURE 13 : RESULTAT DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE DE L'ADN DE WOLBACHIA APRES AMPLIFICATION A 40 CYCLES ET 60°C COMME TEMPERATURE D'HYBRIDATION DES AMORCES.

5.4 Amplification de l'ADN de Wolbachia avec les amorces 16S rRNA + Flap

Pour rendre les bandes plus intenses après 40 cycles d'amplification et à 60°C nous avons ajoutés aux amorces des nucléotides appelés Flap. L'ajout de ces nucléotides a permis de rendre les bandes plus nettes et intenses. Toutefois nous avons observé la réapparition des bandes au niveau des contrôles négatifs ainsi que le dédoublement de la quasi-totalité des bandes.



L : Marqueur de taille moléculaire 100 paire de bases 1-14 échantillons positifs N1-N2 Négatifs contrôles de l'extraction N3-N4 Négatifs contrôles de PCR

FIGURE 14 : UTILISATION DES AMORCES MODIFIEES AVEC FLAP

5.5 Détection du moustique d'Anopheles gambiae s.l. et de la bactérie Wolbachia par la qPCR

TABLEAU 7 : TAUX D'IDENTIFICATION DES SPECIMENS D'ANOPHELES GAMBIAE S.L.

Nous avons commencé par l'amplification de l'ADN du moustique pour vérifier la qualité de l'extraction ainsi tout échantillon négatif lors de cette amplification ne sera pas utilisé dans la détection de l'ADN de Wolbachia

Mois	Nombres testé	Positifs	Taux d'identification
Août	8	8	100
Septembre	14	13	92,86
Octobre	11	10	90,9
Total	33	31	93,94%

Le **tableau 8** montre un taux d'identification moyen de 93.94% (n=33) avec le minimum en

octobre (90.9%) et un maximum de 100% en aout.

TABLEAU 9 : PREVALENCE DE LA BACTERIE WOLBACHIA

Les 31 spécimens positifs pour *Anopheles gambiae s.l.* ont été utilisés pour déterminer la prévalence de Wolbachia

Mois	Nombre testés	Positif	Prévalence
Août	8	5	62,5
Septembre	13	0	0
Octobre	10	9	90
Total	31	14	45,16%

Le **tableau 8** montre des variations de la prévalence de l'infection d'*An. gambiae s.l.* par la bactérie Wolbachia. La prévalence de l'infection à Wolbachia variait entre 62,5% et 90%. La plus forte prévalence était observée en octobre 90%.

5.6 Les résultats de qPCR et leur représentation sous forme de bandes d'amplifications

Les échantillons amplifiés par la qPCR ont ensuite été migrés sur des gels d'agaroses pour faciliter l'interprétation. Les images des différents gels comparés au profil d'amplifications de qPCR sont représentées ci-dessous.

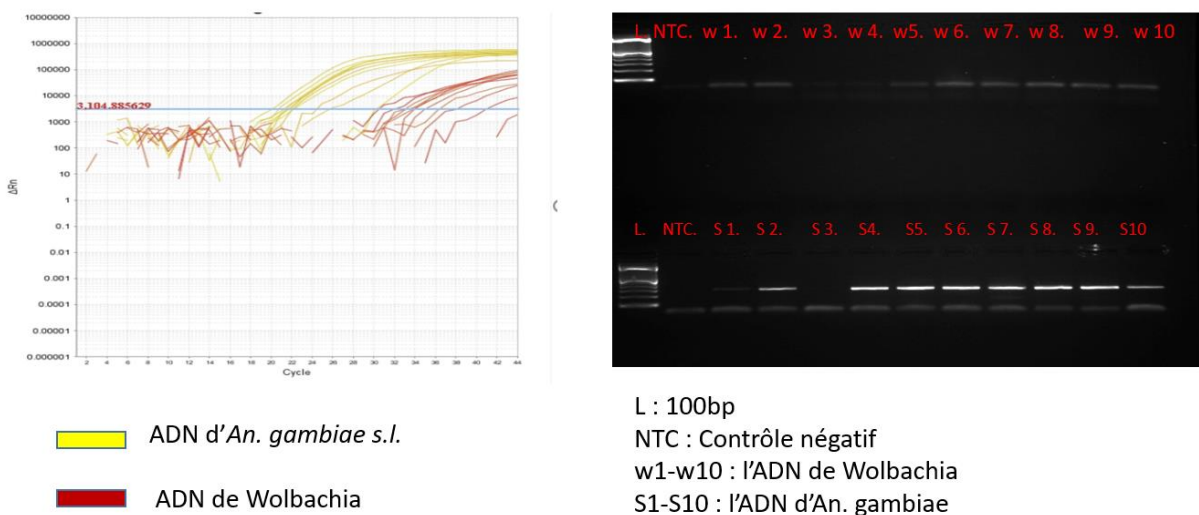
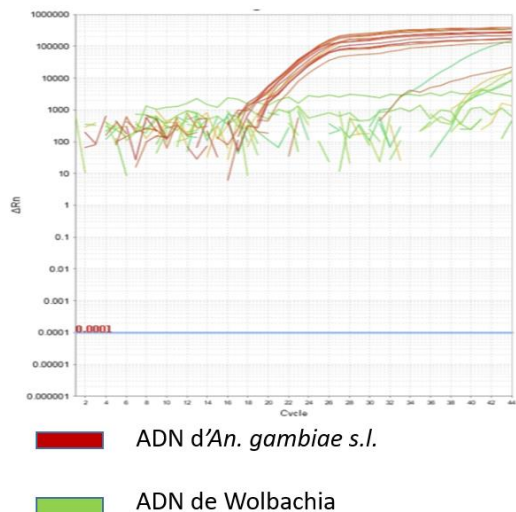
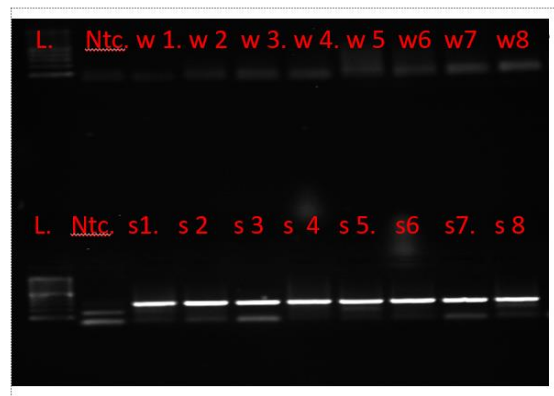
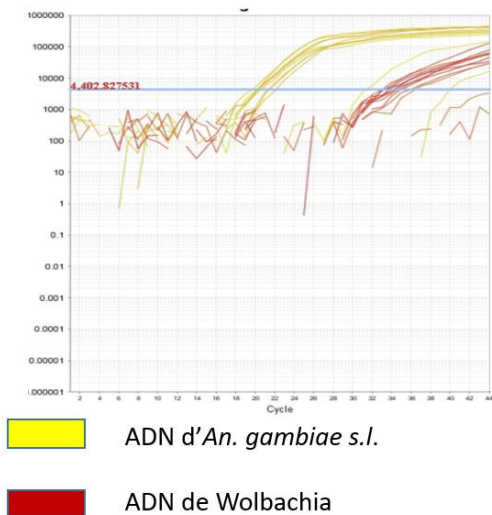


FIGURE 15 : ÉCHANTILLON D'AOÛT 2019 COURBE D'AMPLIFICATION VS IMAGE DU GEL D'AGAROSE



L: 100 s1-s12: l'ADN d'*An. gambiae s.l.*
 Ntc1-Ntc2: Contrôle négatif w1-w12:l'ADN de Wolbachia

FIGURE 16 : ÉCHANTILLON DE SEPTEMBRE 2019 COURBE D'AMPLIFICATION VS IMAGE DU GEL D'AGAROSE



L : 100bp
 NTC : Contrôle négatif
 w1-w8 : l'ADN de Wolbachia
 s1-s8 : l'ADN d'*An. gambiae s.l.*

FIGURE 17 : ÉCHANTILLON D'OCTOBRE 2019 COURBE D'AMPLIFICATION VS IMAGE DU GEL D'AGAROSE



**COMMENTAIRES ET
DISCUSSION**

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

L'extraction d'ADN dont le but est d'obtenir de l'ADN pure et en quantité, constitue la première phase de l'identification des espèces de moustique et de la bactérie *Wolbachia* par la PCR. De ce fait, la quantité et la pureté de l'ADN sont parmi les facteurs les plus critiques de son amplification par la PCR. Nos résultats ont montré que la méthode d'extraction avec le kit MasterPure donnait plus d'ADN et de meilleure qualité que celle avec du phénol-chloroforme. Cela pourrait s'expliquer non seulement par le risque élevé de contamination lors du transfert de l'ADN entre tubes (plusieurs fois) avec la méthode du phénol-chloroforme, mais aussi à cause des réactifs utilisés (phénol, éthanol, isopropanol, acétate de sodium et EDTA) qui sont de potentiels inhibiteurs de la réaction de PCR. En plus elle est plus dangereuse pour l'opérateur à cause de la toxicité élevée du phénol.

L'amplification à 40 cycles et à 60°C a donné un meilleur résultat par rapport aux autres conditions. Toutes autres conditions d'amplification ont donné des résultats en deçà de nos attentes. L'ajout du Flap aux amorces a permis d'augmenter l'intensité des bandes. Cependant, elle a toujours besoin d'être améliorée pour une meilleure identification de *Wolbachia*. D'autres études avaient également montré que l'utilisation du Flap améliorerait le résultat de l'identification de *Wolbachia* par la PCR [42, 43].

Malgré la sensibilité de la PCR en temps réel, deux échantillons sur trente-trois (2/33) étaient négatifs lors de l'amplification de l'ADN d'*An. gambiae s.l.* (voir **Tableau VII**). Cela pourrait être due à une erreur de manipulation lors de l'extraction. C'est pour cette raison que ces deux échantillons n'ont pas été utilisés dans la détection de l'ADN de *Wolbachia*.

La prévalence moyenne de l'infection de *Wolbachia* (wAnge-Mali) pendant la période d'étude était de **45,16%** (minimum = 0% en septembre et Maximum = 90% en octobre). Cette grande variabilité observée dans la prévalence de l'infection de *Wolbachia* pourrait être due au hasard et/ou à la taille limitée des échantillons traités. En effet, *Gomez collaborateurs* avaient, dans la même localité, observé une prévalence de **78%**(18). La prévalence que nous avons observée était plus élevée que celle observée au Burkina (**10,8%**) (17) et au Gabon (**13,72%**) (47). Mais il faut noter que, dans notre étude, nous avons utilisé la partie « tête-thorax » des moustiques femelles, pendant que Baldini et collaborateurs avaient réalisé leurs tests sur les ovaires et les testicules des moustiques(17). Ceci pourrait expliquer la différence entre nos résultats et ceux obtenus au Burkina Faso. L'électrophorèse des produits d'amplification de la qPCR sur gel d'agarose a

permis d'avoir de bandes claires et d'interprétation facile.

Bien que la présence de l'incompatibilité cytoplasmique n'ait pas été établie chez la souche wAnga-Mali, l'utilisation de Wolbachia demeure une alternative prometteuse dans la lutte contre le paludisme.

Au cours de cette étude, nous avons rencontré quelques difficultés dont le plus important était l'absence de contrôles positifs, ce qui a rendu difficile l'interprétation des résultats. Nous nous sommes donc basés sur la taille moléculaire des échantillons dans la PCR classique et la valeur des Ct dans la qPCR pour l'interprétation des résultats.



CONCLUSION

7 CONCLUSION

La méthode d'extraction de l'ADN de Wolbachia par le kit MasterPure donnait une concentration d'ADN plus élevée avec moins de contamination par les protéines. La PCR en temps réel, bien qu'onéreuse est de loin la méthode la plus sensible et la plus rapide dans la détection de la bactérie. La PCR classique bien que moins sensible pourrait servir à la détection de l'infection à Wolbachia chez les vecteurs du paludisme tout en améliorant la technique. Notre étude a montré que la souche de Wolbachia wAnga-Mali est toujours présente au sein *d'An. gambiae s.l.* dans la zone de Kenieroba et dont la prévalence peut varier dans le temps et dans l'espace.



RECOMMADATIONS

8 RECOMMANDATIONS


Au terme de notre étude, nous formulons quelques recommandations :

Aux autorités politiques et sanitaires :

- Renforcer les efforts établis dans les méthodes alternatives de lutte contre le paludisme.
- Accompagner les initiatives de recherche dans ce sens.

Aux chercheurs :

- Trouver des contrôles positifs pour les souches de Wolbachia.
- Pousser la recherche pour utiliser Wolbachia comme stratégie de lutte biologique antivectorielle.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS | Le Rapport sur le paludisme dans le monde 2019 en un clin d'oeil [Internet]. WHO. [cité 18 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2019/fr/>
2. Ba O, Ouldabdallahi M, Koïta M, Sy O, Dahdi SA. Epidemiology of malaria and elimination prospects in Maghreb Countries. *Tunis Med.* nov 2018;96(10-11):590-8.
3. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature.* 8 oct 2015;526(7572):207-11.
4. Cisse MBM, Keita C, Dicko A, Dengela D, Coleman J, Lucas B, et al. Characterizing the insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in Mali. *Malar J* [Internet]. 22 août 2015 [cité 3 sept 2019];14. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4546276/>
5. WHO. Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010–2016. :72.
6. Fiorenzano JM, Koehler PG, Xue R-D. Attractive Toxic Sugar Bait (ATSB) For Control of Mosquitoes and Its Impact on Non-Target Organisms: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 10 2017;14(4).
7. Macias VM, Ohm JR, Rasgon JL. Gene Drive for Mosquito Control: Where Did It Come from and Where Are We Headed? *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. sept 2017 [cité 24 juin 2020];14(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5615543/>
8. Barratt BIP, Ehlers CAC. Impacts of Exotic Biological Control Agents on Non-target Species and Biodiversity. In: *Environmental Pest Management* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cité 24 juin 2020]. p. 325-46. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119255574.ch14>
9. Koul O. Chapter 1 - Nanobiopesticides: An introduction. In: Koul O, éditeur. *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives* [Internet]. Academic Press; 2019 [cité 24 juin 2020]. p. 1-15. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128158296000012>
10. Engelstädter J, Telschow A. Cytoplasmic incompatibility and host population structure. *Heredity.* sept 2009;103(3):196-207.
11. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett.* 1 avr 2008;281(2):215-20.
12. Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature.* 24 août 2011;476:450.

13. Chrostek E, Gerth M. Is *Anopheles gambiae* a Natural Host of *Wolbachia*? *mBio* [Internet]. 11 juin 2019 [cité 25 juill 2019];10(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6561020/>
14. Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through Cytoplasmic Incompatibility. *Nature*. oct 1967;216(5113):383.
15. Dolo H, Coulibaly YI, Dembele B, Guindo B, Coulibaly SY, Dicko I, et al. Integrated seroprevalence-based assessment of *Wuchereria bancrofti* and *Onchocerca volvulus* in two lymphatic filariasis evaluation units of Mali with the SD Bioline Onchocerciasis/LF IgG4 Rapid Test. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 30 janv 2019 [cité 13 mars 2020];13(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6370230/>
16. Ricci I, Cancrini G, Gabrielli S, D'amelio S, Favia G. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Mosquitoes (Diptera: Culicidae): Large Polymerase Chain Reaction Survey and New Identifications. *J Med Entomol*. 1 juill 2002;39(4):562-7.
17. Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Robert Shaw W, Dabiré RK, et al. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nat Commun* [Internet]. 6 juin 2014 [cité 25 juill 2019];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059924/>
18. Gomes FM, Hixson BL, Tyner MDW, Ramirez JL, Canepa GE, Alves e Silva TL, et al. Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 nov 2017;114(47):12566-71.
19. Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*. déc 2004;94(6):537-53.
20. Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC, et al. Developing Global Maps of the Dominant *Anopheles* Vectors of Human Malaria. *PLoS Med* [Internet]. 9 févr 2010 [cité 28 févr 2020];7(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2817710/>
21. Fontenille D, Cohuet A, Awono-Ambene P, Kengne P, Antonio-Nkondjio C, Wondji C, et al. Vecteurs de paludisme : du terrain à la génétique moléculaire Recherches en Afrique. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*. 1 juin 2005;53(3):283-90.
22. Coetzee M. Key to the females of Afrotropical *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Malaria Journal*. 13 févr 2020;19(1):70.
23. Carnevale P, Robert V, éditeurs. 3. Bio-écologie. In: *Les anophèles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle* [Internet]. Marseille: IRD Éditions; 2017 [cité 24 juin 2020]. p. 47-86. (Didactiques). Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/10389>

24. Dao A, Adamou A, Yaro AS, Maïga HM, Kassogue Y, Traoré SF, et al. Assessment of Alternative Mating Strategies in *Anopheles gambiae*: Does Mating Occur Indoors? *J Med Entomol*. 1 juill 2008;45(4):643-52.
25. MOUCHET, J, CARNEVALE P, COOSEMANS M. Biodiversité du paludisme - Institut de Recherche pour le Développement (IRD) [Internet]. 2004 [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ird.fr/toute-l-actualite/communiqués-et-dossiers-de-presse/cp-2006-et-antérieurs/biodiversité-du-paludisme>
26. Lehmann T, Dao A, Yaro AS, Adamou A, Kassogue Y, Diallo M, et al. Aestivation of the African Malaria Mosquito, *Anopheles gambiae* in the Sahel. *Am J Trop Med Hyg*. sept 2010;83(3):601-6.
27. Nugapola NWNP, De Silva WAPP, Karunaratne SHPP. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* strains in wild mosquito populations in Sri Lanka. *Parasit Vectors* [Internet]. 10 mai 2017 [cité 26 juill 2019];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5424329/>
28. Sasaki T, Ishikawa H. *Wolbachia* Infections and Cytoplasmic Incompatibility in the Almond Moth and the Mediterranean Flour Moth. *Zoological Science*. oct 1999;16(5):739-44.
29. Takahiro Hosokawa, Ryuichi Koga, Xian-Ying Meng, Yoshitomo Kikuchi, Takema Fukatsu. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2818902/>
30. Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W. Mutualistic *Wolbachia* Infection in *Aedes albopictus*: Accelerating Cytoplasmic Drive. *Genetics*. 1 mars 2002;160(3):1087-94.
31. Weeks AR, Tracy Reynolds K, Hoffmann AA. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology & Evolution*. 1 juin 2002;17(6):257-62.
32. Unckless RL, Jaenike J. Maintenance of a male-killing *Wolbachia* in *Drosophila innubila* by male-killing dependent and male-killing independent mechanisms. *Evolution*. mars 2012;66(3):678-89.
33. I. D. Alexandrov, M. V. Alexandrova, I. I. Goryacheva, N. V. Rochina, E. V. Shaikevich, I. A. Zakharov. Removing endosymbiotic *Wolbachia* specifically decreases lifespan of females and competitiveness in a laboratory strain of *Drosophila melanogaster* | SpringerLink [Internet]. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1022795407100080>
34. LAURENT GAVOTTE, DAVID R. MERCER, JOHN J. STOECKLE, STEPHEN L. DOBSON. Costs and benefits of *Wolbachia* infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level [Internet]. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401884/>

35. Chrostek E, Marialva MSP, Esteves SS, Weinert LA, Martinez J, Jiggins FM, et al. Wolbachia Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. *PLoS Genet* [Internet]. 12 déc 2013 [cité 5 sept 2019];9(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3861217/>
36. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Guangjin Lu, Pyke AT, Hedges LM, et al. A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 24 déc 2009;139(7):1268-78.
37. Bian G, Joshi D, Dong Y, Lu P, Zhou G, Pan X, et al. Wolbachia Invades *Anopheles stephensi* Populations and Induces Refractoriness to Plasmodium Infection. *Science*. 10 mai 2013;340(6133):748-51.
38. Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D. Evidence for a new feminizing Wolbachia strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity*. juill 2004;93(1):78-84.
39. Cordaux R, Bouchon D, Grève P. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics*. 1 août 2011;27(8):332-41.
40. Bart A Pannebakker, Laas P Pijnacker, Bas J Zwaan, Leo W Beukeboom. Cytology of Wolbachia-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae) - Genome [Internet]. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/g03-137#.Xlmzdy2ca00>
41. Luciano A. Moreira, Inãki Iturbe-Ormaetxe, Jason A. Jeffery, Guangjin Lu, Alyssa T. Pyke, Lauren M. Hedges, et al. Male-killing symbiont damages host's dosage-compensated sex chromosome to induce embryonic apoptosis | *Nature Communications* [Internet]. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/ncomms12781>
42. JANICE HARUMI YEN, A. RALPH BARR. New Hypothesis of the Cause of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* L. | *Nature* [Internet]. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/232657a0>
43. Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, Weill M, Duron O. Diversification of Wolbachia Endosymbiont in the *Culex pipiens* Mosquito. *Mol Biol Evol*. 1 oct 2011;28(10):2761-72.
44. Francois Rousset, Michel Raymond, Kjellberg, Finn. Cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens*: How to explain a cytotype polymorphism?* | Request PDF [Internet]. ResearchGate. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/230073115_Cytoplasmic_incompatibilities_in_the_mosquito_Culex_pipiens_How_to_explain_a_cytotype_polymorphism
45. Afonina I, Ankoudinova I, Mills A, Lokhov S, Huynh P, Mahoney W. Primers with 5' flaps improve real-time PCR. *BioTechniques*. déc 2007;43(6):770-4.

46. Kutuyavin IV. Use of Base Modifications in Primers and Amplicons to Improve Nucleic Acids Detection in the Real-Time Snake Polymerase Chain Reaction. *ASSAY and Drug Development Technologies*. févr 2011;9(1):58-68.
47. Ayala D, Akone-Ella O, Rahola N, Kengne P, Ngangue MF, Mezeme F, et al. Natural Wolbachia infections are common in the major malaria vectors in Central Africa. *Evol Appl*. 11 juin 2019;12(8):1583-94.



ANNEXES

10 ANNEXES

Annexe 1 : Protocoles des deux méthodes d'extractions d'ADN utilisées

❖ Protocole d'extraction au phénol-chloroforme

- Placer les moustiques individuellement (tête et thorax) dans des tubes de 1,5 ml ;
- Ajouter 20µl de TE +200µl d'EDTA Buffer (TE+EDTA a pour rôle d'empêcher les ADNase d'agir.), et broyer le moustique à l'aide d'un pilon stérile jusqu'à ce qu'on voie aucun débris au fond du tube ;
- Ajouter 20µl de protéinase K (dont le rôle est de détruire les protéines de la membrane cellulaire et de libérer l'ADN du moustique et de la bactérie dans la solution)
- Centrifuger brièvement pour faire descendre tous les débris au fond du tube (important) ;
- Incuber l'homogénat au bain-marie à 55° C pendant 1 heure ou toute la nuit ;
- Vortexer les tubes puis centrifuger pendant 5 minutes ;
- Transférer 200µl de la partie surnageant dans de nouveaux tubes ;
- Ajouter 100µl de phénol + 100µl de chloroforme pour la purification de l'ADN ;
- Vortexer 10 secondes puis centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 minutes on obtient ainsi une solution divisée en trois parties : la phase phénolique, au fond du tube contient les lipides, la phase protéique (l'interphase contenant les protéines retenues par le phénol) et la phase aqueuse qui contient l'ADN ;
- Transférer 200µl du surnageant (la phase aqueuse qui contient l'ADN) dans de nouveaux tubes puis ajouter 200µl de chloroforme pour éliminer les traces du phénol ;
- Vortexer 10 secondes puis centrifuger pendant 1 minute ;
- Transférer 180µl du surnageant dans de nouveaux tubes ;
- Ajouter 18µl l d'Acétate de Sodium et 138,6µl d'Isopropanol pour faciliter la précipitation de l'ADN ;
- Centrifuger à la vitesse maximale pendant 15 minutes ; une pellette se forme au fond du tube ; puis enlever le surnageant à l'aide d'une pipette sans toucher la pellette ;
- Ajouter 100µl d'éthanol 70% ; Vortexer et centrifuger à la vitesse maximale pendant 5mn
- Jeter la partie liquide et reprendre les deux étapes précédentes

- Faire sécher les tubes dans un Speed-Vac ou à l'air libre ;
- Suspendre l'ADN ainsi obtenu dans 30µl de TE (0,05M Tris-HCL, EDTA pH 8,0) ou de l'eau stérile.

L'ADN ainsi suspendu, peut être conservé dans un Revco pendant une durée de 6 mois ou plus, dans un congélateur à 20° C. Pour une utilisation à court terme il peut être gardé à 4° C (24h).

❖ **L'extraction avec kit « MasterPure »**

- Placer les moustiques individuellement (tête et thorax) dans des tubes de 1,5ml ;
- Ajouter 100µl de Tris Buffer plus 10µl d'EDTA dans chaque tube ;
- Écraser les moustiques avec des pillons stériles jusqu'à homogénéisation ;
- Centrifuger l'homogénat pendant 30 secondes, 3000 tours à 4 C ; et transférer le surnageant dans de nouveaux tubes 1,5 ml et jeter le culot ;
- Ajouter 10µl de protéinase K et incuber l'homogénat à 56°C sur les blocs chauffants ou dans le bain-Marie pendant au moins 16 heures ;
- Ajouter 100µl du mélange 0,33µl de Protéinase K du kit plus 100uL 2X « Tissue and Cell Lysis » par surnageant ;
- Incuber à 65°C pendant 15 minutes en les vortexant toutes les 5 minutes ;
- Incuber sur la glace pendant 5 minutes ;
- Ajouter 100µl de la solution « MPC Protein Precipitation Reagent » à chaque tube et vortexer pendant 10 secondes ;
- Centrifuger les tubes à la vitesse maximale pendant 10 minutes à 4°C ; et transférer le surnageant dans de nouveaux tubes stérile ((lors du transfert, l'embout ne doit pas toucher le culot déposé au fond du tube) ;
- Ajouter 333µl d'Isopropanol et secouer les tubes 30 à 40 fois ;
- Laisser les tubes à la température ambiante pendant 30 minutes ;
- Centrifuger de nouveau à la vitesse maximale pendant 30 minutes à 4°C ;
- Retirer l'Isopropanol avec la pipette attentivement sans toucher la pellette au fond du tube ;
- Ajouter 100uL d'éthanol 70% ; puis centrifuger à la vitesse maximale à 4°C pendant 5 minutes ;
- Retirer l'éthanol avec la pipette et reprendre le l'étape précédente

- Retirer attentivement l'homogénat d'éthanol avec la pipette et laisser les tubes sécher à l'air libre ;
- Suspending l'ADN obtenu dans 15 à 20µl de TE ;
- Chauffer à 50 C pendant 10 à 15 minutes avant de les utiliser dans la réaction.

Annexe 2 : Princes, Modes opératoires, matériels et équipements de la PCR classique et la PCR en temps réel

❖ PCR CLASSIQUE

- **Principe :** La PCR est une technique d'amplification d'ADN in vitro. Elle a pour but d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence cible. Elle est donc basée sur le mécanisme de répllication de l'ADN. L'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et ré-enroulé à travers des cycles répétitifs qui comprennent trois étapes : une étape de dénaturation de la matrice d'ADN, une étape d'hybridation des amorces et une étape d'extension des amorces en brins complémentaires. Après chaque cycle, les brins d'ADN nouvellement formés servent de matrice dans le cycle suivant. Au fur et à mesure des répétitions de cycles, il s'en suit une augmentation et une accumulation exponentielle des séquences d'ADN cible.

Dans la PCR classique, la détection se réalise en end-point (à la fin des réactions) soit en couplant un test ELISA, soit à travers une migration électrophorétique sur un gel d'agarose. Dans cette dernière, nous utilisons non seulement un agent intercalant comme le bromure d'éthidium pour rendre les bandes visibles mais aussi un marqueur de poids moléculaire comme échelle pour comparer avec les bandes de l'ADN cible.

➤ Matériels et Équipements

- Hotte de biosécurité avec lumière UV ;
- Microtubes 2ml, 1,7ml, 0,5ml ;
- Micropipettes P2, P20, P100, P200 et P1000 et leurs embouts stériles ;
- Portoirs ;
- Congélateur ;

- Vortex ;
- Blouse et gant ;
- Désinfectant spray ;
- Poubelle ;
- Minuteur chrono-rebours ;
- Plaque chauffante ;
- Four micro-onde ;
- Centrifugeuse
- Thermocycleur PTC
- les amorces
- Master Mix 2XGreenTag
- Eau moléculaire

➤ **Mode opératoire**

Après l'extraction d'ADN, la PCR classique se fait par les étapes suivantes : Préparation de la mixture, amplification par le thermocycleur, la préparation et migrations sur le gel d'agarose et la visualisation par une machine à UV

• **Préparation de la mixture et amplification par le thermocycleur**

Pour diminuer le risque de la contamination, la préparation de la mixture se fait sous une hotte de biosécurité. Elle est préparée à chaque lancement de PCR et utilisée aussitôt. Le volume à préparer est fonction du nombre d'échantillons à tester, les contrôles négatifs inclus. Le volume à préparer étant trop juste, il faut rajouter un volume supplémentaire pour 2 à 3 tubes afin de compenser les éventuelles pertes de pipetage. Les réactifs nécessaires et leurs volumes pour la préparation de mixture de la PCR Classique ainsi que la qPCR sont dans les **Tableau II et III**.

Après préparation de la mixture, elle est bien agitée au vortex et 19ul est déposé dans chaque plaque ou tube de PCR, puis 1ul d'ADN de chaque échantillon est ajouté à tous les tubes sauf les contrôles négatifs obtenant un volume final de 20ul. Les plaques ou tube de PCR sont ensuite placés dans le thermocycleur et le programme d'amplification (tableau) est lancé.

- **Préparation du gel d'agarose 2%**

Le gel d'agarose sert au dépôt d'amplicon pour sa migration. Nous préparons le gel dans un flacon de 250 ml en ajoutant 2g d'agarose poudre dans 100ml du tampon TBE. Le mélange est chauffé au four micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose après quoi, on le laisse rafraichir pendant 5mn. Nous ajoutons ensuite 2-3ul de bromure d'éthidium pour faciliter la visualisation par le polaroïd. Dans une cuve, les peignes séparateurs (10 ou 15 dents) sont alignés, le gel est coulé et laissé à température ambiante pour son refroidissement. Les peignes sont ensuite retirés après refroidissement (voir figure).

- **Migration électrophorétique**

La migration électrophorétique est effectuée comme suit :

- Ouvrir la cuve à migration contenant du tampon TBE 1X et placer le gel ;
- Le dépôt des échantillons s'effectue dans l'ordre suivant : 2,5µl du marqueur de poids moléculaire dans le puits N°1, 10µl de chaque échantillon dans les puits suivant et dans l'ordre de numérotation et ensuite 10µl des contrôles négatifs dans les quatre puits suivants.
- Après le dépôt des échantillons, la cuve est branchée au générateur réglé sur 120 volts. En fin de distribution des échantillons, fermer la cuve branchée au générateur réglé sur 120 volts
- Laisser migrer pendant une durée pendant la durée d'une heure.
- Observer la migration du colorant de la charge cathode vers l'anode.

- **Visualisation**

Les visualisations ont été faites en fin de migration à l'aide d'une machine à UV.

Retire le gel de la cuve et dépose-le sur le plateau de la machine à UV;

- La lecture s'effectue sous rayonnement UV ;
- Enfin la photo du gel est prise par la machine à UV et enregistré sur un dispositif de stockage.

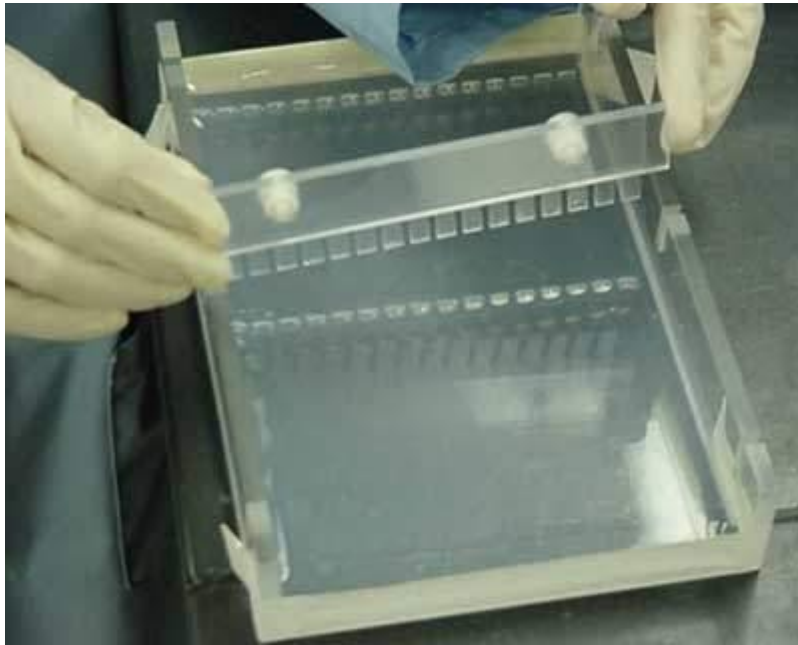


FIGURE 18 : MISE EN PLACE DES PEIGNES DU GEL SOURCE: WWW.BING.COM/IMAGES

❖ PCR EN TEMPS REEL OU QPCR

- **Principe :** La PCR en temps réel encore appelée PCR quantitative (qPCR) est un dérivé de la PCR classique qui permet de suivre en temps réel la quantité d'ADN contenue dans la réaction. C'est à dire, à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. Ces sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman). Ces sondes ne donnent un signal qu'une fois fixées à l'ADN cible ou à l'ADN double brin. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. A chaque fois que la quantité d'ADN permet aux sondes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé « Cycle Threshold » Ct ou « cycle seuil ». C'est cette valeur qui nous permet de faire des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

➤ **Matériels et équipements**

- Hotte de biosécurité avec lumière UV ;
- Microtubes 2ml, 1,5ml ;
- Micropipettes P2, P20, P100, P200 et P1000 et leurs embouts stériles ;
- Portoirs ;
- Congélateur ;
- Vortex ;
- Blouse et gant ;
- Désinfectant spray ;
- Poubelle ;
- Minuteur chrono-rebours ;
- Plaque chauffante ;
- Four micro-onde ;
- Centrifugeuse
- Thermocycleur de qPCR muni de son ordinateur
- Plaque de qPCR adapté au thermocycleur
- Les amorces
- Master Mix SYBR Green
- Eau moléculaire

➤ **Mode opératoire**

Contrairement à la PCR classique, les résultats de la PCR en temps réel sont directement interprétés par l'ordinateur connecté à la machine de PCR. L'extraction et la préparation de la mixture sont similaires à la PCR classique. A noter que le Master Mix utilisé dans qPCR contient un intercalant « SYBR Green » qui se fixe à l'ADN double brin hybridé par les amorces de la réaction.

Pendant tout le processus de la qPCR nous pouvons suivre sur l'écran l'évolution de chaque échantillon dans la réaction à travers les courbes d'amplification. Les résultats sont interprétés par les valeurs Ct

FICHE SIGNALITIQUE

Fiche signalétique

Nom : Thiam

Prénom : Salif

Tel : +223 74568269

Email : salif1799@gmail.com

Nationalité : Malienne

Thème : Technique moléculaire de détection de wolbachia (wAnga-Mali) chez *Anopheles gambiae sensu lato* à l'état sauvage au Mali

Date de Soutenance :

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie et de la Faculté de Pharmacie

Secteurs d'intérêts : Entomologie médicale, Biologie moléculaire

Résumé

Le paludisme représente un problème majeur de santé publique pour les pays sub-sahariens dont le Mali. Les progrès enregistrés dans la lutte contre le paludisme par l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) et à la pulvérisation intra domiciliaire (PID) à effet rémanent sont menacés par l'apparition et la progression de la résistance des vecteurs majeurs aux insecticides couramment utilisés d'où la nécessité de développer de nouvelles méthodes de lutte antivectorielle comme l'utilisation de la bactérie endosymbiotique appelée Wolbachia.

Le but de ce travail était de mettre en place au Mali une technique de détection efficace de Wolbachia au sein d'*Anopheles gambiae s.l.* en prélude de la lutte contre le paludisme.

Il s'agissait d'une étude expérimentale, réalisée au sein d'ICER-Mali dans le cadre d'une collaboration entre l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) et les Instituts Nationaux de la Santé des États Unis d'Amérique (NIH). Les moustiques ont été collectés à Kenieroba par la méthode d'aspersion d'insecticide « Spray catch » dans les habitations humaines.

Pour obtenir une bonne qualité d'ADN de moustiques et de la bactérie, deux méthodes d'extraction ont été comparées à savoir « l'ancienne » méthode d'extraction par le Phénol-Chloroforme et l'extraction par le kit « MasterPure ». Les techniques moléculaires utilisées pour la détection de Wolbachia étaient : la PCR classique qui a été optimisée et la PCR quantitative (qPCR) pour la détermination de la prévalence de Wolbachia au sein de la population d'*Anopheles gambiae s.l.*

Les plus fortes concentrations d'ADN et le plus faible taux de contamination par les protéines ont été obtenues avec le kit « MasterPure ». Cette méthode était également la moins toxique pour le laborantin. Dans l'optimisation de la PCR classique, les bandes recherchées ont été obtenues avec une amplification de 40 Cycles et 60°C comme température optimale d'hybridation des amorces mais avec une faible intensité. La modification des amorces avec l'ajout des nucléotides FLAP a augmenté l'intensité des bandes mais entraînant une réapparition des bandes au niveau des contrôles négatifs. La prévalence de l'infection de Wolbachia était 45,16%. Cette prévalence était inférieure à celle obtenue par Gomez et al. dans la même localité en 2016 mais qui avaient utilisé une plus grande taille d'échantillons.

Notre étude a montré que la souche de Wolbachia wAnga-Mali est toujours présente au sein d'*An. gambiae s.l.* dans la zone de Kenieroba dont la prévalence peut varier dans le temps et dans l'espace. L'utilisation de la bactérie Wolbachia demeure une méthode prometteuse dans l'éradication du paludisme dans le monde.

Mots clés : Wolbachia, *Anopheles gambiae s.l.*, PCR, paludisme, détection

Family Name: Thiam

First Name: Salif

Tel: +223 74568269

Email: salif1799@gmail.com

Nationality: Malian

Theme: Molecular technique for the detection of wolbachia (wAnga-Mali) within natural *Anopheles gambiae sensu lato* in Mali

Date of defence:

Town of defence: Bamako

Deposit local: Library of the Faculty of Medicine and Odonto-stomatology and Faculty of Pharmacy of Mali

Fields of interest: Medical entomology, Molecular biology

Abstract:

Malaria is a major public health problem for sub-Saharan countries including Mali. The progress made in the fight against malaria through the use of long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS) is threatened by the emergence and progression of resistance of major vectors to commonly used insecticides, hence the need to develop new vector control methods such as the use of the endosymbiotic bacterium called Wolbachia.

The aim of this work was to set up in Mali an efficient detection technique of Wolbachia within *Anopheles gambiae s.l.* as a prelude to the fight against malaria.

This was an experimental study, carried out within ICER-Mali in the framework of a collaboration between the University of Science, Technology and Technology of Bamako (USTTB) and the National Institutes of Health of the United States of America (NIH). Mosquitoes were collected in Kenieroba by the "Spray Catch" insecticide spraying method in human dwellings.

In order to obtain a good quality of mosquito DNA and the bacteria, two extraction methods were compared, namely the "old" Phenol-Chloroform extraction method and the "MasterPure" extraction kit. The molecular techniques used for the detection of Wolbachia were: Regular PCR which was optimized and quantitative PCR (qPCR) for the determination of the prevalence of Wolbachia in the *Anopheles gambiae s.l.* population.

The highest DNA concentrations and the lowest protein contamination were obtained with the MasterPure kit. This method was also the least toxic for the laboratory technician. In the optimization of the regular PCR, the desired bands were obtained with an amplification of 40 Cycles and 60°C as the optimal temperature for primer hybridization but with a low intensity. The modification of the primers with the addition of FLAP nucleotides increased the intensity of the strips but resulted in a reappearance of the strips in the negative controls. The prevalence of Wolbachia infection was **45.16%**. This prevalence was lower than that obtained by **Gomez et al.** in the same locality in 2016 but who used a larger sample size.

Our study showed that the Wolbachia wAnga-Mali strain of Wolbachia is still present in *An. gambiae s.l.* in the Kenieroba area, the prevalence of which may vary in time and space. The use of the Wolbachia bacterium remains a promising method in the eradication of malaria worldwide.

Key words: Wolbachia, *Anopheles gambiae s.l.*, PCR, malaria, detection

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !!!