

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Virologie

Circulation arbovirale en Guyane : intérêt de la biologie moléculaire pour la détection et l'identification.

A. Talarmin (1), J. M. Héraud (1), D. Hommel (2), V. Deubel (3), A. Hulin (2) & J. L. Sarthou (1)

(1) Centre national de référence pour la surveillance des arboviroses pour la région Antilles-Guyane, Institut Pasteur, Cayenne, Guyane.

(2) Service de réanimation, Centre hospitalier général de Cayenne, Guyane française.

(3) Unité des arbovirus et virus des fièvres hémorragiques, Institut Pasteur, Paris, France.

La meilleure connaissance du génome des arbovirus a permis le développement d'outils moléculaires extrêmement précieux dans la détection des arbovirus, la confirmation du diagnostic ou une meilleure compréhension de l'épidémiologie.

En Guyane, la RT-PCR est utilisée dans le diagnostic de *Flavivirus* (dengue, fièvre jaune et encéphalite de Saint-Louis) et d'*Alphavirus* (complexe de l'encéphalite équine du Venezuela ou VEE, Mayaro).

Cette technique a permis de retrouver l'agent pathogène alors que les moyens classiques (culture cellulaire, inoculation au souriceau nouveau-né) ne le permettaient plus. Ainsi le virus dengue 2 a été identifié comme responsable d'encéphalite, le premier cas de fièvre jaune en Guyane depuis 1902 a pu être authentifié, et le virus Tonate (complexe VEE) décrit pour la première fois comme agent d'encéphalite.

Le séquençage de ces produits de PCR est un autre outil de surveillance, parfois indispensable pour identifier l'agent pathogène lorsque des sondes spécifiques n'existent pas, comme dans le cas du virus Tonate. Le séquençage permet aussi par comparaison avec des souches déjà séquencées de comprendre l'évolution et la circulation de certains virus comme dans le cas de la fièvre jaune. Enfin le séquençage a également permis de vérifier la contamination de laboratoire dans le cas de fièvre Mayaro chez une technicienne.

La mise à disposition des séquences des différents virus dans une banque de gènes est très intéressante. Le séquençage des nouvelles souches de virus Tonate et la comparaison aux séquences existantes a en particulier permis de suspecter une contamination de laboratoire pour la souche Bijou-Bridge isolée aux Etats-Unis en 1974, ce qui permet de mieux cerner l'épidémiologie de cette maladie.

Réémergence de la fièvre de la vallée du Rift en Mauritanie et au Sénégal en 1998 : aspects épidémiologiques, entomologiques et moléculaires.

A. A. Sall (1), M. Diallo (1), K. Bâ (2), K. Ndiaye (1), E. Macondo (1), M. Bouloy (3) & C. Mathiot (1)

(1) Institut Pasteur de Dakar, Sénégal.

(2) IRD-ORSTOM Dakar, Sénégal.

(3) Institut Pasteur, Paris, France.

La fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une anthroponose virale transmise par des moustiques, endémique cri Mauritanie et au Sénégal. Elle constitue un réel problème de santé humaine et animale comme en témoignent les récentes

poussées épidémiques et/ou épizootiques de 1987 et 1993 dans ces deux pays, et l'ampleur de l'épidémie en Afrique orientale en 1997-98.

En octobre 1998, des cas de FVR avaient été confirmés par PCR et par isolement viral chez des malades prélevés en Mauritanie. Une enquête épidémiologique a été effectuée dans le but de mesurer l'importance de la circulation du virus chez l'homme et les animaux domestiques (moutons, chèvres, bœufs et chameaux), d'étudier le rôle vecteur des moustiques et l'implication des rongeurs en tant que réservoirs.

L'enquête a permis d'évaluer l'ampleur de la circulation du virus FVR qui a couvert une large zone englobant la vallée du fleuve Sénégal, le sud-est de la Mauritanie et même l'ouest du Mali. En Mauritanie, 21 souches du virus FVR ont été isolées de sérums humains et animaux, tandis qu'au Sénégal, 36 souches ont été isolées de moustiques. Un nouveau vecteur du virus FVR, *Culex poicilipes*, a été identifié. Les rongeurs n'ont pas été impliqués dans la transmission du virus. Afin d'élucider les mécanismes qui ont conduit à cette émergence, un panel de vingt souches a été sélectionné et séquencé sur les trois segments du virus. Les séquences obtenues ont permis de comparer les souches entre elles et par rapport à celles des émergences précédentes. L'ensemble de résultats est analysé et discuté.

La peste porcine africaine à Madagascar : épizootie émergente ou maladie ancienne ?

F. Roger (1, 2), N. Randriamahefa (2),

C. Crucière (3), H. Zeller (4),

R. Andriambololona (2) & J. Domenech (1)

(1) CIRAD-EMVT, 2477, av. Val de Montferand, 34000 Montpellier, France.

(2) Direction Services vétérinaires de Madagascar

(3) CNEVA-Alfort, France.

(4) Institut Pasteur de Madagascar.

Une épizootie affectant le cheptel porcin de Madagascar, caractérisée par une mortalité et un taux d'atteinte très importants, a été prise en compte officiellement mi-98. Attribuée à la peste porcine classique, cette maladie s'est étendue en dépit de la vaccination. Le diagnostic de peste porcine africaine (PPA) a été confirmé (CNEVA, France) en décembre 1998 à partir d'échantillons provenant d'élevages porcins de la région d'Antananarivo. Cependant, les données épidémiologiques recueillies lors d'enquêtes rétrospectives font état d'un syndrome pestique dès mi-1997 dans le sud-est de l'île. La progression de l'épizootie, depuis cette origine géographique supposée, suit les voies de communication terrestres et les filières de commercialisation des porcs. Les résultats des analyses virologiques (immunocapture d'antigènes et PCR sur organes lymphoïdes) témoignent d'une circulation active du virus et montrent une très large distribution de la maladie sur l'île de Madagascar où ne sont épargnées que certaines régions côtières, a priori protégées par des barrières naturelles.

La PPA est une maladie virale des Suidés, hautement contagieuse, se manifestant sous la forme d'une fièvre hémorragique, et dont les conséquences socio-économiques peuvent être très importantes. Elle ne peut être contrôlée et éradiquée que par des méthodes sanitaires. La transmission se réalise également par l'intermédiaire des produits carnés et

des eaux grasses. L'agent étiologique est un virus enveloppé à ADN double brin, seul représentant de la famille des *Asfarviridae* (African-swine-fever-and-related virus). Ce virus peut être maintenu au sein d'un cycle épidémiologique selvatique faisant intervenir les suidés sauvages ainsi que des tiques du genre *Ornithodoros* (*Argasidae*, *Ixodidae*).

La forme épizootique et l'extension rapide à la quasi totalité de Madagascar, les formes cliniques suraiguës et aiguës orientent vers une origine récente de la maladie. Les résultats sérologiques obtenus corroborent cette hypothèse : des sérums prélevés en 1996 sont négatifs; 4 % des sérums prélevés au moment de l'épizootie sont positifs. Par ailleurs, la souche isolée à Madagascar se rapproche davantage des souches est-africaines que des souches ouest-africaines (travaux de comparaison génomique en cours). La peste porcine africaine a été, en l'espace de 18 mois, responsable de la perte d'environ 60 % du cheptel porcin malgache.

La préexistence de la PPA à Madagascar au sein d'un cycle selvatique (existence du *Potamochoère* et de la tique *Ornithodoros*) apparaît comme peu probable. En effet, en raison des interrelations étroites existant entre les compartiments épidémiologiques sauvages et domestiques (élevage porcin traditionnel caractérisé par une divagation des porcs), la maladie se serait déclaré antérieurement.

L'introduction de la PPA à Madagascar par voie maritime et par l'intermédiaire de la distribution d'eaux grasses de navires nous semble, en l'état actuel des connaissances, l'hypothèse la plus probable.

Surveillance de l'infection à VIH-1 / groupe O au Cameroun sur une période de douze ans.

A. Ayouba, P. Mauclere, P. M.V. Martin, P. Cunin, J. Mfoupouendoun, B. Njinku, S. Souquieres & F. Simon

Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274 Yaoundé, Cameroun.

Objectifs : Étude rétrospective de la proportion des infections à VIH-1 du groupe O au Cameroun sur une période de douze ans (1986-1998).

Méthodes : Screening de tous les sérums et plasmas dépistés et confirmés VIH-1 positifs au Service de virologie du Centre Pasteur du Cameroun, par sérotypie à l'aide des peptides synthétiques spécifiques des différents groupes du VIH-1. Ainsi, 8185 sérums/plasmas VIH-1 positifs ont été testés et couvrent la période allant de 1986 à 1998.

Résultats : Sur les 8185 sérums/plasmas testés, 260 VIH-1 du groupe O ont été identifiés, soit une proportion de 3,17 %. Cette proportion a varié en fonction du temps. Ainsi, en 1986-1988, on avait 63 VIH-1/O pour 311 positifs testés (20,2 %), en 1994-1995, cette proportion était de 8,3 % (55/663) et en 1997-1998 on ne dénombrait plus que 60 VIH-1 du groupe O pour 4459 VIH-1 positifs testés, soit 1,34%. Quand on considère la provenance géographique de ces VIH-1 du groupe O, des différences statistiquement significatives sont trouvées entre les régions Centre, Littoral et le Nord du Cameroun ($p < 10^{-6}$) en 1994-1995. Cette différence interrégionale a disparu en 1997-1998 ($p = 0,7$).

Conclusion : Les résultats de notre étude indiquent une diminution sensible, en fonction du temps, de la proportion des infections à VIH-1 du groupe O au Cameroun. L'affinement (en cours) de ces résultats, en tenant notamment compte de tous les échantillons testés, indiquerait plutôt une baisse relative moins forte et une moindre épidémiogénicité des VIH-1/O, comparés aux virus du groupe M.

Recherche des génotypes et sérotypes du VHC chez les patients atteints d'hépatite chronique et cirrhose en Algérie.

F. Iguer (1), K. Zidouni (1), Z. Baziz (1), C. Kerioui (1), S. Tebbal (1), S. Berkane (2), N. Debzi (3), H. Boussekine (3), F. Asselah (3) & H. Asselah (2)

(1) Institut Pasteur d'Algérie, Laboratoire des hépatites virales, Alger, Algérie.

(2) Centre hospitalo-universitaire de Bologhine, Gastro-entérologie, Algérie.

(3) Centre hospitalo-universitaire de Mustapha-Bacha, Gastro-entérologie, Algérie.

Le VHC, comme d'autres virus à ARN, possède une variabilité génétique importante (environ 103 substitutions par site par an). Cela est très vraisemblablement liée à des erreurs dans la réplication de l'ARN due à l'ARN polymérase.

Pour s'en assurer, une identification des génotypes a été effectuée sur 65 patients algériens atteints d'hépatite chronique et de cirrhose à virus C.

Du fait de l'impossibilité d'analyser la totalité des séquences, la méthode utilisée dans notre étude pour la détermination des génotypes est basée sur l'hybridation des produits amplifiés avec des sondes spécifiques des différents génotypes sur la région de la capsid (SORIN, DEIA).

La détermination des sérotypes, selon la technique de P. SIMMONDS (1953), est recherchée chez ces mêmes patients. Celle-ci ne permet de différencier que les six principaux génotypes, mais pas les sous-types du VHC.

Cette étude d'amplification du génome du VHC permet, en une première étape, la détection de l'ARN-VHC, ainsi que celle des génotypes, affirmant ainsi le diagnostic et, dans un deuxième temps, le suivi de ces patients après thérapie à l'interféron alpha.

Recherche des anticorps anti-VHG chez les patients atteints d'hépatite chronique et de cirrhose en Algérie.

F. Iguer (1), S. Berkane (2), C. Kerioui (1), Z. Baziz (1), S. Tebbal (1), H. Asselah (2) & F. Asselah (3)

(1) Institut Pasteur d'Algérie, Laboratoire des hépatites virales, Alger, Algérie.

(2) Centre hospitalo-universitaire de Bologhine, Gastro-entérologie, Algérie.

(3) Centre hospitalo-universitaire de Mustapha-Bacha, Gastro-entérologie, Algérie.

Les données épidémiologiques disponibles sont de deux ordres : des enquêtes sur la recherche d'ARN du VHG qui, selon LINNENE J *et al.* 1996, apportent des arguments en faveur d'une transmission liée au sang (0,9 - 1,7 %) chez les donneurs de sang et les études de séroprévalences publiées qui ne concernent que les virus GB.

Notre étude porte sur la recherche des anticorps anti-VHG sur 400 patients algériens atteints d'hépatite chronique et de cirrhose, associées aux virus de l'hépatite C, de l'hépatite B et des hépatopathies non répertoriées.

La rage humaine en l'an 2000.

Y. Rotivel & M. Goudal

Unité de la rage, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

Vieille comme le monde, la rage est une maladie du passé pour la plupart d'entre nous.

Cependant, la rage était en 1990 encore au 10ème rang des maladies infectieuses mortelles : plus de 30000 cas sont rapportés chaque année à l'OMS, la plupart dans les pays tropicaux et plus particulièrement en Asie. La rage humaine est encore la cause du décès d'une dizaine d'Européens et de Nord Américains chaque année. Si quelques cas de contamination

autochtone sont rapportés en Europe de l'Est, les cas rapportés en France sont importés de régions d'enzootie canine uniquement. Depuis 1970, 19 cas ont été rapportés au Centre national de référence pour la rage à l'Institut Pasteur.

De 1970 à 1990, il s'agissait soit de Français résidant en Afrique, soit d'Africains hospitalisés en France pour le traitement d'une encéphalite d'étiologie inconnue. Depuis 1990, il s'agit essentiellement de Français en vacances dans leur pays d'origine ou de touristes. Les jeunes enfants et le sexe masculin sont sur-représentés, comme dans la plupart des études.

Une étude conduite à la consultation antirabique à l'Institut Pasteur a permis de mettre en évidence que le principal facteur de risque de contamination à l'étranger est la méconnaissance de la maladie. Les produits biologiques, vaccins modernes et immunoglobulines, font rarement défaut, sauf dans quelques régions, isolées souvent pour des raisons politiques. Seul leur prix est une limite à leur utilisation. Les informations erronées sur la maladie et l'absence totale de connaissance sont en revanche des limitations à l'accès au traitement.

Bactériologie

Infections émergentes à ECEH O157 en République centrafricaine (RCA).

Y. Germani, T. Zagui-mboyo, R. Mambeli, B. Sélékon & J. Morvan

Institut Pasteur de Bangui, BP 923, Bangui, République centrafricaine.

L'épidémie de colites hémorragiques (CH) et de syndrome Lurémique et hémolytique (SUH) à *E. coli* O157:H7 survenue à Zémio et la recrudescence de diarrhées sanglantes observée dans Bangui depuis 1996 justifient une recherche épidémiologique pour apprécier la circulation de cet agent pathogène et tenter de dater son émergence en RCA.

Nous avons entrepris la recherche dans le sérum de la population de différentes régions de RCA, des anticorps (IgG et IgM) dirigés contre le LPS de *E. coli* O157 (ELISA), comme témoin d'une infection par les ECEH O157.

Les sérums ont été prélevés au cours de différentes enquêtes aux quatre points cardinaux et dans la région centrale de la RCA, entre 1985 et 1998. Tous les sujets sont non diarrhéiques, sans signe clinique témoin d'une pathologie lors du prélèvement.

Pour les régions nord, sud et ouest, la présence d'anticorps dirigés contre le LPS O157 n'a pas été observée dans les échantillons éprouvés. Dans la région de Bangui en 1997 et en 1998, ainsi que dans la région est pour 1997, les sérologies indiquent l'existence de ces anticorps (IgG). Tous les titres sont faibles, en limite du seuil de positivité. Pour les régions centre et est, la présence d'IgG anti O157 signe la passage de ce clone dans la population à partir de 1997, période de recrudescence des cas de CH compliqués de SHU. Ce résultat conforte le concept de maladie émergente en RCA pour l'infection à ECEH O157:H7.

Pour 8 sujets suivis à Bangui, des sérologies (IgA, G, M) ont pu être réalisées sur des paires de sérums prélevées à 3 semaines d'intervalles chez des malades infectés par des ECEH O157:H7, le premier sérum étant prélevé en phase de diarrhée sanglante. Un second lot de sérums de 5 malades présentant une CH sans que des ECEH n'aient été isolés a été étudié.

La réponse immunologique dirigée contre le sérotype O157 est observée chez huit patients pour lesquels un ECEH O157:H7 a été isolé lors d'une CH compliquée d'un SHU pour trois d'entre eux. Les IgA dont la décroissance est rapide et les IgM dont la décroissance est lente sur 21 jours sont les deux classes d'Ig utiles pour établir un diagnostic 5 jours après la diarrhée prodromique.

Nous envisageons, pour faciliter nos études épidémiologiques et disposer d'un outil de diagnostic adapté à l'urgence, de développer une sérologie IgA anti LPS O157 à partir de la salive.

ECEH O157 d'Afrique Centrale proches de la souche ancestrale 055:H7 ?

Y. Germani, X. Konamna, C. Lenguetema, R. Zenguela & J. Morvan

Institut Pasteur de Bangui, BP 923, Bangui, République Centrafricaine.

Les souches de ECEH isolées à Zémio en RCA (GERMANI *et al.*, *Lancet*, 1997, 349, 1670) en 1996, à Bangui entre 1996 et 1997, et à Ngoïla au Cameroun (CUNIN *et al.* *Em Infect Dis*, 1999, 5, 285) en 1998 sont toutes des *E. coli* O157:H7 produisant la toxine SLT1, possédant le système *eaeA* codant l'intimine, ne fermentant pas le sorbitol et sans activité β -glucuronidase. Elles diffèrent uniquement par l'antibiogramme. Contrairement à la majorité des *E. coli*, le sérotype O157:H7 se distingue par l'absence de fermentation du sorbitol (SOR) et l'absence d'activité β -glucuronidase (GUD). Le gène de structure codant GUD (*uidA*) présente une mutation ponctuelle (T en G) en position +92 qui était réputée conservée chez toutes les souches O157:H7 et chez le variant non mobile O157:H-SOR+; elle était utilisée comme outil d'identification. En ferme d'évolution, FENG *et al.* ont décrit un modèle dans lequel le sérotype O157:H7 est le produit d'une évolution séquentielle à partir du sérotype ancestral 055:H7, premièrement par l'acquisition des gènes six (toxine de la famille Shiga) puis en divergeant selon deux branches, l'une donnant des souches GUD- SOR- dont la distribution était réputée ubiquitaire et à l'origine de la plupart des graves épidémies qui toucheront de nombreux pays industrialisés, et l'autre O157:H-SOR+ en perdant la mobilité. Ce dernier sérotype est à l'origine des épidémies observées en Europe du Nord.

Les souches isolées d'Afrique centrale sont stx1 et ne possèdent pas cette mutation ponctuelle, ce qui les rapproche de la souche ancestrale 055:H7. Ce résultat pose les problèmes suivant sur l'origine des souches isolées dans cette région.

1. Les souches d'ECEH d'Afrique centrale n'auraient pas la même origine clonale que celles touchant les pays industrialisés de la zone tempérée.
2. Si l'hypothèse d'une introduction de souches d'ECEH à l'origine des épidémies que nous avons observées en 1997 et 1998 est remise en cause, celle de l'émergence de souches ayant une origine régionale peut être émise.
3. Nous rapprochons ce résultat de celui de l'enquête épidémiologique de 1997 qui révélait comme facteur de risque la consommation de viande de chasse prélevée dans la forêt équatoriale, et des souches d'ECEH isolées de viande de chasse par des équipes américaines.

Il n'existe aucune information épidémiologique sur les ECEH en Afrique. La surveillance microbiologique et épidémiologique est maintenue au niveau humain mais il est impossible d'envisager des études pour identifier les animaux réservoirs de germes ou d'enquêter sur l'alimentation

en raison de l'insécurité. Les investigations complémentaires pour déterminer la position phylogénétique des souches d'Afrique centrale sont en cours : séquençages du locus *uidA*, analyse électrophorétique des enzymes (MEE).

Characterization of Virulence Genes of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Strains by Use of Specific DNA Probes and PCR.

S. Bouzari, A. Jafari, N. Makey, F. Shokouhi, M. N. Jafari & M. Parsi

Unité de biologie moléculaire, Institut Pasteur, avenue Pasteur, Téhéran 13164, Iran.
Fax : 00 98 21 646 5132

Diarrhoea is a major health problem in developing countries and among bacterial pathogens, strains belonging to different categories of diarrhoeagenic *E. coli* play an important role. EPEC is one of these groups, which is mainly associated with diarrhoea in infants and children and in Iran, this group is generally identified by slide agglutination. Recently the presence of genes for EPEC adherence factor (EAF), attaching and effacing phenotype (*eae*) and bundle forming pili (*bfp*) has been considered the main criteria for classification of *E. coli* strains as typical EPEC. In this study, 72 *E. coli* strains isolated from infants and children with diarrhoea and identified serologically using commercially available antisera were tested for *eae* and EAF by DNA hybridization and *bfp* by PCR. Of these strains, only 10 (13.9%) were positive for all three virulence determinants (typical EPEC), 34 (47.2%) were positive for either one or two of these genes (atypical EPEC) and the remaining 28 (38.9%) were negative for all these virulence factors (non-EPEC). Of all the typical EPEC strains identified in this study, 90% (9/10) manifested localised adherence pattern when tested and among atypical EPEC isolates 60% were adherent irrespective of the pattern. Adherence to HeLa cells was observed in 51.9% of the strains which did not carry any of the three virulence determinants. Moreover, multiple drug resistance is a very common phenomenon among diarrhoeal isolates in Iran. Therefore, identification of EPEC strains on the basis of serological tests alone results in an over-estimation of these isolates leading to unnecessary treatment putting an unwarranted economical burden on the health system and also making the treatment of the more complicated cases more difficult.

Résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antibacillaires dans la Province de l'ouest du Cameroun.

R. Bercion, C. Kuaban, P. Cunin, J. Noeske, P. Nkamsse & S. Ngo Niobe

Laboratoire des mycobactéries, Centre Pasteur, BP 1274, Yaoundé, Cameroun.

Cadre : Les 15 centres de diagnostic et de traitement (CDT) de la tuberculose (TB) de la Province de l'ouest du Cameroun.

Objectif : Déterminer les prévalences de la résistance initiale (RI) et acquise (RA) de *M. tuberculosis* aux médicaments antibacillaires dans la Province de l'ouest deux ans après la relance du programme national de lutte (PNLT) dans la province.

Schéma : Les profils de résistance aux drogues ont été évalués chez 566 malades atteints d'une tuberculose pulmonaire bactériologiquement confirmée (nouveaux cas : 437/566 et anciens cas 129/566) hospitalisés consécutivement dans les CDT.

Résultats : Le taux global de résistance à une drogue antibacillaire ou plus était de 26,9 % avec une résistance initiale de 19,7 % (86/437) et une résistance acquise de 51,1 % (66/129). Le taux de RI était de 13,5 % à un seul antibacillaire, 4,31 % à 2 drogues et 1,8 % à plus de deux drogues. Une RI à l'isoniazide était la plus fréquente (12,1 %), suivie de la streptomycine (11,7 %), de l'éthambutol (2,5 %) et de la rifampicine (2,1%). La RA était de 25,6 % à 1 drogue, de 14,7 % à 2 drogues et de 10,9 % à plus de 2 drogues. Une RA à l'isoniazide était la plus fréquente (41,1%), suivi de la streptomycine (26,41%), de la rifampicine (14,7 %) et de l'éthambutol (9,3 %). Une multirésistance à au moins l'isoniazide et la rifampicine était notée chez 1,4% des nouveaux malades et 13,2 % des anciens cas.

Conclusion : Cette étude réalisée pour la première fois à l'échelle d'une province au Cameroun montre des taux élevés de résistance des bacilles tuberculeux et souligne le besoin urgent d'étendre le PNLT à l'ensemble du pays afin de combattre la situation préoccupante que représente une importante résistance initiale et acquise aux antibacillaires.

Etude de la biodiversité de Mycobacterium tuberculosis par typage oligonucléotidique des espaceurs du locus DR (spoligotyping).

C. Sola, I. Filliol, E. Legrand & N. Rastogi

Unité tuberculose & mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, France.

La méthode dite de "spoligotyping" repose sur la détection du polymorphisme des séquences nucléotidiques localisées entre les séquences identiques de 36 pb de la région DR du complexe *M. tuberculosis*. Les variations des séquences inter-DR sont assez limitées et représentent jusqu'à aujourd'hui un éventail de 43 oligonucléotides. La méthode utilise deux amorces complémentaires de la partie conservée de la région DR, dirigées vers l'extérieur, qui amplifient les séquences inter-DR. Les profils génomiques sont révélés après hybridation avec une membrane portant l'ensemble des 43 séquences inter-DR connues qui correspondent à 37 séquences inter-DR de *M. tuberculosis* H37Rv et 6 séquences inter-DR de *M. bovis* BCG. Plus rapide et moins laborieux que le RFLP, le "spoligotyping" qui ne nécessite que peu d'ADN est une méthode de criblage utile dans le cadre de larges enquêtes épidémiologiques et permet à la fois la détection rapide, sans culture préalable, du complexe *M. tuberculosis*, l'obtention d'un profil spécifique de souche et une distinction entre *M. bovis* et *M. tuberculosis*. Dans ce travail, nous avons cherché à : (1) souligner l'intérêt du spoligotyping dans l'épidémiologie de la tuberculose humaine ou bovine, (2) étudier la fréquence relative des différents spoligotypes dans la zone Caraïbe, leur spécificité géographique ainsi que détecter les spoligotypes d'importation, (3) construire des banques de données des profils des souches circulantes, et (4) étudier la biodiversité et la phylogénie du complexe *M. tuberculosis*. Les résultats présentés concernent environ 1500 profils disponibles dans notre banque de données (parmi lesquels 400 types distincts). La fréquence relative des différents espaceurs chez *M. tuberculosis* et *M. bovis* suggère l'existence de deux ancêtres distincts. Ces fréquences pourraient refléter indirectement les sites préférentiels d'insertion de IS6110. De plus, une technique de spoligotyping modifiée mise au point dans notre laboratoire permettra de mieux appréhender le polymorphisme des copies IS6110 liées au locus DR.

Parasitologie

DHFR et résistance de *Plasmodium falciparum* aux antifolates : à la recherche d'autres mutations dans l'Océan Indien.

R. Milijaona (1), L. Raharimalala (1), D. Parzy (2), J. F. Roux (1) & R. Jambou (1)

(1) Institut Pasteur de Madagascar

(2) I.M.T.S.S.A., Le Pharo, Marseille Armées, France.

La chloroquine est l'antipaludique de première ligne pour la prise en charge des accès palustres à Madagascar. La résistance de type R3 n'a jamais été décrite. Mais les taux de R1 et R2 franchissent parfois les 30 %. Depuis 1997, l'utilisation de l'association pyriméthamine-sulfadoxine est donc recommandée en seconde intention.

Cependant, différentes études ont montré que l'apparition des souches de *P. falciparum* résistantes aux antifolates est relativement rapide. Les mutations ponctuelles des codons 16, 51, 59, 108 et 164 du gène DHFR sont, en Asie du Sud-est et en Afrique, à l'origine de la résistance des parasites aux antifoliques.

La culture des parasites (méthode de référence pour étudier la résistance) est une technique lourde qui peut biaiser les études en sélectionnant les souches. De plus elle est difficile à mettre en œuvre sur le terrain, alors que les méthodes de typage moléculaire, non seulement évitent la mise en culture des parasites, mais n'exigent qu'une faible quantité de sang parasité (une goutte prélevée sur papier buvard suffit).

Pour préciser cette résistance aux antifoliques, compte tenu de la situation géographique de Madagascar, dans l'Océan Indien, entre l'Asie et l'Afrique, il est capital de surveiller l'apparition des mutations connues et surtout d'identifier d'autres mutations du gène DHFR des isolats de *P. falciparum*.

En 1998, 48 isolats ont été étudiés. La PCR mutation-spécifique du codon 108 de DHFR, a permis de détecter parmi ces souches le premier cas de mutation Asn-108 responsable de la résistance à la pyriméthamine chez un isolat de *P. falciparum* de Madagascar. Ce résultat a été confirmé par le séquençage. Par contre, après séquençage de DHFR pour 25 isolats (sur les 48 étudiés), aucune mutation n'a été détectée pour les codons 16, 51, 59 et 164.

Pour compléter cette étude, il sera nécessaire de confronter les résultats des tests de chimiosensibilité *in vitro* aux résultats de PCR sur des mutations connues. Tous les cas de discordance seront à séquencer.

Polymorphisme du gène CG2 chez les isolats sauvages de *Plasmodium falciparum* à Madagascar.

S. Gendt (1, 2), R. Jambou (1), C. Doerig (3), R. Milijaona (1), L. Raharimalala (1), F. Ariey (1), R. Durand (4) & M. Danis (2)

(1) Laboratoire du paludisme, Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar.

(2) Laboratoire de parasitologie-mycologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

(3) Unité INSERM U 313, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

(4) Laboratoire de parasitologie-mycologie, CHU Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

L'apparition de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine pose de nouveaux problèmes de santé publique dans les pays où sévit le paludisme. À Madagascar, le premier cas clinique fut suspecté en 1975. Depuis, des études *in vivo* et *in vitro* sont réalisées pour suivre la dispersion de cette résistance. Cependant les difficultés de

déplacement et de transport compliquent les études *in vitro* dans les provinces éloignées de la capitale. La mise au point d'un test de sensibilité à la chloroquine ne nécessitant pas la culture du parasite serait donc d'un grand apport.

L'identification d'un gène potentiellement (*cg2*) lié à la chloroquinorésistance chez *Plasmodium falciparum* par l'équipe de SU en 1997 semble permettre cette nouvelle approche.

Le locus correspondant à ce gène a été décrit en 1991 par WELLEMS *et al.* Le gène *cg2* présente un polymorphisme complexe constitué par 12 mutations ponctuelles, un motif polyAsn central de longueur variable et un polymorphisme de taille de 3 séquences répétées : , et . L'étude de ce gène révèle (DURAND *et al.*) un polymorphisme particulier (14 et 16) associé à la chloroquinorésistance. Un allèle identique chez quasiment toutes les souches chloroquinorésistantes a été mis en évidence en Afrique. Cependant SU *et al.* ne retrouvent pas de corrélation entre l'allèle *cg2* des souches chloroquinorésistantes d'Afrique et d'Asie du Sud-est et celle d'Amérique du Sud, alors qu'une étude comportant cinq souches provenant des Comores montrait que ces dernières ne présentaient pas non plus l'allèle *cg2* des souches chloroquinorésistantes d'Afrique de l'Ouest.

En pratique, l'étude du polymorphisme génétique du gène *cg2* par une technique d'amplification génique (PCR) pourrait donc présenter un intérêt en santé publique, mais plusieurs problèmes restent à résoudre : le polymorphisme de taille de la zone kappa est-il suffisant comme critère de jugement? Quelle est l'efficacité d'amplification au sein d'isolats complexes où des parasites résistants et sensibles pourraient coexister? Les souches chloroquinorésistantes de l'Océan Indien présentent-elles cette signature génétique (14 et 16)?

Une première étude se termine sur le polymorphisme du gène *cg2* portant sur 40 isolats sauvages de Madagascar. Des différences de taille de la zone kappa sont effectivement retrouvées entre souches sensibles et résistantes, mais elles montrent les difficultés d'utilisation de ce marqueur sans confirmation par le séquençage du gène. La séquence d'une dizaine de souches est actuellement en cours pour préciser le véritable polymorphisme de ce gène dans la région, et développer peut-être d'autres techniques de typage (RFLP...).

Transmission du paludisme à Madagascar.

Outils biométriques et moléculaires de l'étude de la génétique des populations d'*Anopheles gambiae* s. l. et des possibilités de migrations entre zones de forte et faible transmission.

J. B. Duchemin, I. Martin & P. Rabarison

Institut Pasteur de Madagascar

Madagascar est marquée par une diversité de la transmission du paludisme. Les Hautes Terres centrales sont soumises à une transmission faible et sont le siège d'épidémies meurtrières. La recrudescence des vecteurs dans ces zones après les opérations de lutte antivectorielle fait appel à deux hypothèses :

- possibilité de migrations de vecteurs malgré des barrières physiques (relief) entre ces zones et les zones côtières, où la transmission est forte

- permanence, à bas niveau, de populations vectorielles dans des poches résiduelles.

L'analyse de la structure génétique des populations peut permettre d'apporter des arguments à l'une ou l'autre des possibilités. *Anopheles gambiae* s. l., présent sur toute l'île, a été choisi, dans un premier temps, bien que n'étant pas le vecteur principal responsable des épidémies de paludisme sur les Hautes Terres.

La mise au point de plusieurs marqueurs moléculaires de type RAPD a été effectuée et l'analyse du polymorphisme phénotypique s'est faite par biométrie sur des spécimens fixés, montés et mesurés au microscope.

En dehors de la classique séparation entre membres du complexe *gambiae* (*Anopheles arabiensis* et *Anopheles gambiae sensu stricto*), confirmée par PCR, des populations vectorielles semblent pouvoir être individualisées au niveau des sites étudiés. *Anopheles gambiae sensu stricto* prédomine quasi exclusivement sur la côte est tandis que *Anopheles arabiensis* est majoritaire sur les Hautes Terres et la côte ouest. Entre ces deux dernières zones, une différence morphométrique semble se dessiner. Ce phénomène pourrait être multifactoriel, à la fois environnemental, le temps de développement larvaire étant plus long sur les plateaux, et génétique.

Entomologie

L'investigation par des méthodes moléculaires des anophèles du complexe maculipennis circulants en Roumanie.

A. Vladimirescu (1), G. Nicolescu (1) & M. Damian (2)

(1) Laboratoire d'entomologie médicale, Institut Cantacuzène, Bucarest, Roumanie.
(2) Laboratoire d'épidémiologie moléculaire, Institut Cantacuzène, Bucarest, Roumanie.

La circulation des anophèles vecteurs appartenant à des espèces *Anopheles atroparvus*, *An. messeae* et *An. maculipennis* s.s. l'élément de risque pour la réémergence du paludisme en Roumanie justifie les préoccupations pour la surveillance des populations de moustiques.

Les études classiques de taxonomie ont signalé la présence d'hybrides entre les différentes espèces du complexe maculipennis, qui peut avoir une signification concernant leur pouvoir vectoriel.

Des méthodes moléculaires (RAPD-PCR, SDS-PAGE), associées aux méthodes classiques, ont été utilisées pour discriminer les hybrides et les espèces du complexe.

L'ADN a été isolé à partir des larves, des nymphes et des adultes par la méthode de COLLINS *et al.* (1988) et BALLINGER *et al.*, (1992) et la purification a été développée avec Chelex-100.

La réaction d'amplification enzymatique avec des amorces spécifiques a permis l'identification et la discrimination entre les différents genres de culicidés (*Anopheles*, *Culex* et *Aedes*) et entre les espèces et les hybrides du complexe maculipennis.

Structure génétique d'*Aedes aegypti* dans les îles de Tahiti et Moorea (Polynésie française).

C. Paupy, L. Mousson, M. Vazeille-Falcoz, F. Rodhain & A.-B. Failloux

Unité d'écologie des systèmes vectoriels, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France.
Tel : 01 40 61 36 17, fax : 01 40 61 30 89, e-mail : afaillou@pasteur.fr

Aedes aegypti est une espèce de moustique d'introduction récente (1924) en Polynésie française. C'est à la faveur de l'ouverture de l'aéroport international de Tahiti en 1961 et d'une intensification des échanges inter-îles que ce vecteur a graduellement colonisé les îles polynésiennes. Aujourd'hui, cette espèce de moustique prédomine dans les milieux fortement anthropisés et notamment sur les îles de Tahiti et Moorea, les plus développées de Polynésie française où se concentre l'essentiel de l'activité économique. On assiste actuellement à un raccourcissement des périodes inter-épidémiques qui

semblerait lié au développement des moyens modernes de transport associé à une urbanisation galopante et une démographie croissante.

Cette espèce décrite comme étant fortement associée à l'environnement humain a fait l'objet d'une étude dont le but est de décrire l'organisation génétique d'*Ae. aegypti*. C'est ainsi que 28 échantillons de moustiques ont été récoltés sur les îles de Tahiti (21) et Moorea (8). Le génotypage des moustiques a été réalisé à partir des profils électrophorétiques obtenus au niveau de neuf systèmes enzymatiques. À partir des fréquences alléliques établies pour cinq loci polymorphes, une organisation de la différenciation génétique a pu être proposée sur la base d'une estimation des valeurs de Fst (indice de différenciation). Trois types de zones ont été mis en évidence : (1) une zone comprenant Papeete, le chef lieu, et les six districts l'entourant. La population humaine y est la plus dense et les moustiques analysés sont génétiquement structurés. La profusion de gîtes de ponte au voisinage immédiat d'une forte densité humaine, soumis à des traitements insecticides réguliers, a eu pour conséquence une accentuation de la différenciation ; (2) une zone correspondant aux moustiques récoltés sur la côte est de l'île de Tahiti, où la densité humaine est plus faible en raison d'un relief accidenté prévenant toute installation massive d'habitations. Les moustiques y sont peu différenciés. Ce résultat confirme l'importance du niveau d'urbanisation ainsi que des traitements insecticides dans la structuration des moustiques et (3) une zone intermédiaire, présentant un écotopie voisin de celui de la côte ouest de Tahiti mais avec une densité humaine beaucoup plus faible. La différenciation des moustiques y est intermédiaire. Cette situation illustre bien la complexité des phénomènes mis en jeu où interagissent la densité humaine, l'urbanisation, les écotopes et les mesures de lutte et cela à des degrés divers. Un schéma de différenciation similaire à celui de Tahiti a été également établi pour l'île de Moorea mais à un degré moindre, compte tenu des plus faibles densités humaines. Ces résultats seront confrontés à ceux obtenus pour les compétences vectorielles évaluées à partir d'infection orale des moustiques par le virus de la dengue 2.

Les microsatellites chez *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linné) 1762, le moustique vecteur des virus de la dengue

K. Huber, L. Mousson, F. Rodhain & A.-B. Failloux

Unité d'écologie des systèmes vectoriels, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France.
Tel : 01 40 61 36 17, fax : 01 40 61 30 89, e-mail : afaillou@pasteur.fr

En l'absence de vaccin et de traitement spécifique, le seul moyen de limiter l'expansion de la dengue, une arbovirose transmise par *Aedes aegypti*, est la lutte antivectorielle visant à réduire les densités des populations de moustiques. Pour adopter une stratégie de lutte appropriée aux écosystèmes soumis aux traitements insecticides, une estimation de la structure génétique et des flux géniques des populations sont nécessaires. Parmi les marqueurs moléculaires disponibles pour une telle évaluation, les microsatellites représentent l'avantage d'être très discriminants.

L'isolement des séquences répétées de type microsatellite a été tenté en utilisant un protocole classique d'isolement par construction d'une banque génomique. Les résultats peu concluants obtenus nous ont orientés vers un protocole d'enrichissement en séquences répétées. Une étape d'enrichissement en motifs CAA a été incluse au protocole de clonage. Les séquences répétées de type microsatellite ont été sélectionnées, au préalable, sur billes magnétiques auxquelles est accroché un oligonucléotide de motif CAA. Une banque d'environ

5 000 clones a été constituée permettant l'analyse de 3250 kb soit environ 0.4 % du génome d'*Ae. aegypti*. De cette banque enrichie, 172 clones ont été séquencés et 57 contiennent un motif microsatellite. Ces microsatellites sont dans leur grande majorité de type imparfait et présentent un faible nombre de répétitions. Trente pour cent de ces séquences sont malheureusement inutilisables car le microsatellite est situé près du site de clonage du plasmide. Un protocole a été mis au point en vue d'identifier les régions flanquant le microsatellite. Nous avons déterminé des amorces pour cinq microsatellites et testé leur polymorphisme sur différentes souches de moustiques d'origine géographique diverse. De plus, pour chaque locus, l'héritabilité de type mendélien a été vérifiée sur des couples d'individus constitués en laboratoire. La technique de la banque enrichie nous a donc permis d'isoler des marqueurs microsatellites exploitables pour l'étude de la génétique des populations d'*Ae. aegypti*.

Les circuits potentiels de peste à Madagascar : biodiversité de la faune pulicidienne et écosystèmes forestiers malgaches.

J. B. Duchemin (1), J. M. Duplantier (2),
S. M. Goodman (3), J. Ratovoniato (1)
& S. Chanteau (1)

(1) Institut Pasteur de Madagascar.
(2) Programme RAMSE - IRD Madagascar.
(3) Chicago Field Museum et WWF, Etats-Unis.

La peste sévit depuis environ 75 ans sur les plateaux centraux de Madagascar. Certaines données récentes font

suspecter une circulation du bacille non plus seulement dans des milieux anthropisés, ruraux ou urbains, mais aussi au sein de forêts. Il est important d'identifier les éléments potentiels qui peuvent participer à cette circulation aussi bien au niveau des mammifères que des puces.

Plusieurs massifs forestiers d'altitude ont été étudiés sur le plan de la faunistique. Une forte biodiversité et une endémicité importante ont été retrouvées au niveau des puces de micromammifères et notamment des rats.

Même si ceux-ci ont colonisé pratiquement tous les milieux, probablement aux dépens de la faune endémique, la faune pulicidienne reste spécifique des écosystèmes dans lesquels ils évoluent. Cette particularité permet, en comparant les puces retrouvées sur les rats, d'apprécier l'effet de fragmentation des massifs forestiers.

La diminution des surfaces selvatiques à Madagascar est favorisée par les activités agricoles et la colonisation des forêts par brûlis. Ces activités non seulement renforcent le contact des hommes avec les écosystèmes naturels mais également sélectionnent les couples hôtes/ectoparasites les plus inféodés à l'homme. L'émergence dans la communauté humaine de germes nouveaux par transferts horizontaux est alors favorisée ainsi que le passage du bacille pesteux des milieux anthropisés vers les milieux naturels. Ceci a pu se réaliser de manière précoce lors de l'arrivée de la peste à Madagascar mais peut également continuer du fait de l'accélération des processus de déforestation. La rencontre du bacille avec de nouveaux intervenants des écosystèmes, qu'ils soient mammifères ou puces, mérite une surveillance attentive.



Abonnement/subscription 1999

Je souhaite souscrire un abonnement d'un an (5 n°)

I wish to subscribe for one year (5 issues):

Nom / Name :

Prénom / First Name :

Spécialité / Speciality :

Adresse / Address :

Code postal / Postal code :

Ville / Town :

Pays / Country :

• France * : 550 FF/275 FF*

Vente au numéro : 130 F

• Autres pays (voie de surface) : 720FF
other countries (normal mail) :

• Autres pays (voie aérienne) : 950FF
other countries (by plane) :

Mode de paiement Directement par chèque, Eurochèque /
/ Payment *Directly by cheque, Eurocheque*

Envoyez moi un reçu / *Please send me a receipt*

Numéro de commande / Number of order :

Nom et adresse de facturation / Name and address for invoice :

.....

Date : Signature :

Adressez votre commande et votre paiement à l'ordre de/
Send your order and your payment to the order of:
SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE EXOTIQUE

SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE EXOTIQUE - Abonnements,
25 rue du Docteur Roux, F - 75015 PARIS - FRANCE
Tél : (33) 1 45 66 88 69, Fax : (33) 1 45 66 44 85
Email : socpatex@pasteur.fr ; http://www.pasteur.fr/socpatex

• * Tarif réduit sur justificatif : étudiants, internes de CHU et élèves inscrits au diplôme de spécialités / * Students: to receive reduced rates, order must be accompanied by name of affiliated institutions and proof of status.

• Les abonnements sont mis en service dans un délai maximum de quatre semaines après réception de la commande et du règlement / Subscriptions begin 4 weeks following receipt of payment.

• Les abonnements partent du premier numéro de l'année / Subscriptions begin with the first issue of calendar year.

• Les réclamations pour les numéros non reçus doivent parvenir dans un délai maximum de six mois / Claims for missing issues must be submitted to the publisher for a period of six months after publication of each individual issue.

Numéros séparés de l'année et volumes antérieurs (jusqu'à épuisement des stocks) / Back issues and volumes : SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE EXOTIQUE (adresse ci-dessus/address above)