Ann.Soc.Belg.Méd.Trop.,1991, 71(Suppl.1),219-224.

NOUVELLE APPROCHE POUR L'ETUDE DE LA CYTOTAXINOMIE DES VECTEURS

par

P. ELSEN
Laboratoire d'Entomologie, Institut de Médecine Tropicale, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen 1, Belgique

Résumé - **Afin d'éviter la lenteur de l'analyse classique des chromosomes polytènes chez les insectes vecteurs de maladies, un programme d'analyse d'image sur ordinateur a été mis au point. Dans sa forme actuelle, il permet d'obtenir une image réelle droite du chromosome, la courbe de densité optique de l'ADN de toutes ses bandes et la possibilité de ramener toutes les images obtenues à une même longueur standard. L'ensemble des opérations prend entre 3 et 5 minutes par chromosome. L'auteur expose ensuite une méthode d'approche pour compléter ce programme en vue d'obtenir une comparaison des chromosomes analysés permettant le repérage automatique des inversions.**

Introduction

Lutter contre les insectes vecteurs d'agents pathogènes con-stitue une des facettes indispensables pour combattre les maladies qu'ils causent. Encore faut-il savoir quelles sont les populations réellement vectrices au sein de l'espèce concernée. En effet, on a vu ces dernières années, grâce à la génétique, des espèces morphologiques de vecteurs (*Anopheles* et *Simulium*) éclater en complexes d'"espèces jumelles", qualificatif auquel nous préférons substituer celui de complexes de "populations génétiques". Cela évite toute discussion sur le débat sans fin de la définition exacte de la "notion d'espèce". Or, il est démontré que ces diverses populations génétiques au sein d'une même espèce morphologique occupent souvent des biotopes qui leurs sont typiques. Elles ont de ce fait des écologies distinctes. De plus, il arrive souvent que la compétence et la capacité vectorielle varient entre ces populations, certaines étant parfois non vectrices. D'autre part, l'identification de ces populations vectrices ainsi que celle des différentes souches des parasites transmis contribuera à mieux comprendre les interactions entre hôtes-vecteurs et parasites. Enfin, dans le cadre des campagnes de lutte contre les vecteurs, ces identifications sont indispensables dans les cas de réinvasion des zones traitées et dans les cas d'apparition de la résistance aux insecticides utilisés.

La connaissance de tous ces éléments est nécessaire pour l'élaboration de campagnes rationnelles de lutte. Or beaucoup reste à faire par cette nouvelle approche systématique pour les moustiques et les Simuliidae, et rien ou presque n'a été réalisé sur le terrain pour les autres vecteurs. Il est donc indispensable, au vu de ce qui précède, d'identifier ces populations.

L'une des méthodes utilisées à cet effet est le repérage des inversions chromosomiques par l'analyse des bandes des chromosomes polytènes. Or, la comparaison de ces chromosomes par les méthodes classiques, bande par bande, est fastidieuse et le repérage des petites inversions n'est pas évident.

Etant donné d'une part que les zymogrammes, obtenus après électrophorèse des isoenzymmes, peuvent être passés au densitométre afin d'en obtenir les courbes de densitométrie des diverses bandes, et que, d'autre part, un chromosome polytène est également constitué d'une série de bandes particulières, il nous est venu l'idée d'obtenir des courbes similaires pour ces chromosomes polytènes. Le densitomètre dans ce cas n'est pas applicable car il nécessite des images rectilignes. Par contre, l'analyse d'image par ordinateur permet d'obtenir ces éléments.

Méthode

Le laboratoire d'anthropogénétique de la Vrije Universiteit van Brussel possède un ordinateur Magiscan pour lequel la firme anglaise Joyce Loebl avait mis au point un programme d'analyse d'image devant permettre l'analyse comparative des chromosomes polytènes. Ne répondant pas à notre attente, nous leur avons demandé d'y apporter des modifications qui ont abouti à une nouvelle version du programme. Celle-ci permet de réaliser la première phase de l'analyse, à savoir l'obtention d'une image rectiligne du chromosome, de la courbe de densité optique des bandes et les données chiffrées de cette courbe. Il est également possible de ramener toutes les images obtenues à une même longueur standard, ceci aux fins de comparaisons visuelles.

La deuxième phase, qui consistera à obtenir la comparaison automatique des chromosomes, est à l'étude. Nous en donnons ici la procédure d'approche agrémentée de quelques résultats préliminaires.

Résultats et discussion

Première phase : la version actuelle de l'analyse d'image

Après avoir repéré un chromosome au microscope, son image est projetée et focalisée sur l'écran du moniteur. Puis, au moyen d'un crayon optique, l'on en trace le contour et l'axe. On indique ensuite par des points le début et la fin du chromosome ainsi que sa largeur maximale. Arrivé à ce stade, dés que le crayon optique perd le contact de l'écran, dans la seconde, l'ordinateur ne conserve à l'écran que le chromosome analysé et fournit en ordonnée son image réelle étirée en ligne droite et en abscisse la courbe de densité optique de toutes ses bandes avec en regard la succession des bandes au niveau de l'axe tracé (figure 1). Dans le même temps, sont classées en mémoire toutes les valeurs chiffrées de chaque point de la courbe avec en regard leurs valeurs relatives respectives par rapport au total des valeurs réelles, et l'attribution d'un numéro d'ordre de position dans la courbe. Les images des courbes et du patron des bandes au niveau de l'axe apparaissant sur l'écran peuvent à leur tour être envoyées en mémoire et être rappelées ultérieurement pour les opérations décrites plus loin. Par contre, les images réelles étirées en lignes droites ne peuvent être mémorisées et doivent être photographiées à partir de l'écran.

Figure 1.

Etude des chromosomes polytènes par analyse d'image sur ordinateur. Au centre, le chromosome analysé; en ordonnée, son image réelle étirée en ligne droite; en abscisse, le patron des bandes au niveau de l'axe du chromosome avec en regard la courbe de densité optique des bandes.

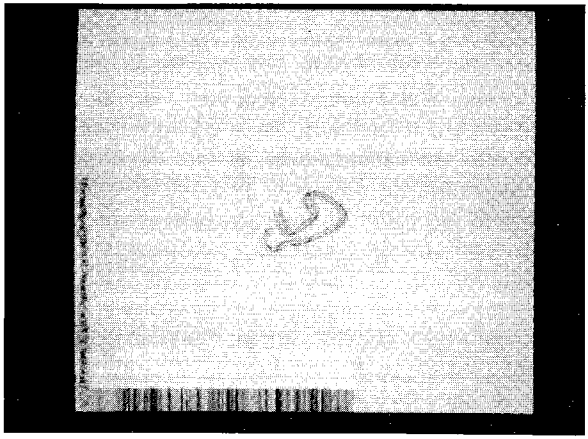
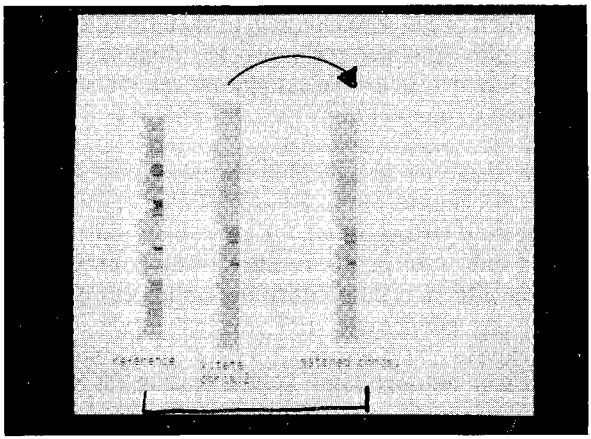


Figure 2.

Standardisation de la longueur des images. A gauche, la courbe du chromosome de référence. Au centre, la courbe d'un deuxième chromosome et à droite ce même chromosome ramené à la longueur de la courbe de référence.



L'ensemble des opérations, depuis le repérage du chromosome au microscope jusqu'à l'envoi des résultats en mémoire, prend de 3 à 5 minutes par chromosome analysé.

Les valeurs relatives sont nécessaires afin de supprimer les différences dues aux variations d'intensité de coloration d'un chromosome à l'autre et aux variations de mise au point de l'image sur l'écran. Une autre source d'erreur est la largeur de l'axe qui, si elle est réduite à une ligne, omettra les variations d'épaisseur des bandes, voire la bande elle-même si elle est constituée d'un chapelet de points comme c'est parfois le cas. Cette source d'erreur est éliminée en donnant une instruction au programme qui transforme l'axe en un ruban dont on détermine la largeur en fonction de celle du chromosome, et que l'ordinateur balayera suivant l'axe tracé. Enfin, le maximum de point qui peuvent être mesuré à l'écran est de 512. L'on a donc intérêt à agrandir l'image jusqu'à ce que l'axe tracé couvre un maximum de ces points, ceci afin d'obtenir un maximum d'information sur l'image (chromosome) analysée.

La même série d'opérations s'effectue sur un deuxième chromosome. Les images du premier chromosome sont rappelées sur l'écran et, toujours au moyen du crayon optique, on demande à l'ordinateur d'étirer, ou contracter suivant le cas, la deuxième image à la même longueur que la première aux fins de comparaisons (figure 2). Toutes les données chiffrées en mémoire sont automatiquement réajustées en fonction de cette nouvelle longueur et conservées dans un nouveau fichier. Lorsque les opérations de mesure sont terminées, on peut les transférer sur une disquette et/ou les imprimer avec la courbe en regard pour les analyses statistiques exposées au paragraphe suivant.

Deuxième phase : la comparaison automatique des chromosomes

Nous avons vu ci-dessus que les variations d'intensité des pics ont pu être résolues par la transformation des données en valeurs relatives. Par contre, malgré que les chromosomes soient ramenés à une longueur standard commune, il existe toute une série de paramètres qui sont sources de variations, d'une courbe à l'autre, dans le décalage des pics homologues pour les diverses mesures d'un même chromosome. Il est dès lors nécessaire de supprimer ces sources de variations si l'on veut ultérieurement obtenir une comparaison automatique des chromosomes.

D'autre part, si ramener les images des chromosomes à une même longueur standard est utile pour des comparaisons *de visu*, il n'en va pas de même sur le plan statistique car il y a perte d'information. En effet, ce réajustement de longueur se fait au détriment du nombre de points mesurés, une contraction de l'image, par exemple, provoquant la réduction du nombre des points et non leur compression en créant des décimales. Nous avons donc opté pour conserver les longueurs réelles et de transformer, pour chaque chromosome, les rangs des points mesurés en valeurs relatives par rapport à leur nombre total. L'information est ainsi conservée tout en ramenant les longueurs réelles à une longueur arbitraire standard de cent unités permettant les comparaisons entre chromosomes.

a) Les sources de variation

Variations au niveau du tracé de l'axe du chromosome

Si l'on répète l'opération plusieurs fois sur un même chromosome, l'axe n'est jamais tracé deux fois exactement au même endroit et il varie dès lors légèrement en longueur. Il y a donc un léger décalage dans les pics des bandes. La méthodologie consiste à mesurer, dans un noyau donné, plusieurs fois le même chromosome. Au moyen des photographies, on repère sur les courbes obtenues une série de bandes caractéristiques et l'on note pour chacune d'elles leur position relative dans chaque série de données. La moyenne et l'écart-type de ces positions sont calculés pour chaque bande.

Le résultat des premières analyses nous indiquent à ce niveau de la procédure que l'écart-type dans le positionnement relatif des bandes repaires est assez constant d'une bande à l'autre, sa valeur moyenne, suivant l'exemplaire du chromosome analysé, oscillant entre 0,47% et 0,97%.

Variations d'étalement entre exemplaires d'un même chromosome d'une même préparation

Dans une même préparation, deux exemplaires d'un même chromosome ne s'étalent pas de la même façon, le degré d'étalement d'une partie du chromosome pouvant varier d'avantage d'un exemplaire à l'autre que celui d'une autre partie. La méthodologie est la même que ci-dessus mais étendue à plusieurs noyaux de la même préparation.

Le résultat des premières analyses nous indiquent à ce niveau-ci un écart type plus élevé et plus variable, allant de 0,51% à 4,09% suivant le pic considéré, la moyenne se situant aux alentours des 2,52%.

Variations d'étalement entre préparations

Même méthodologie, mais étendue à plusieurs préparations (= individus différents). On détermine ici les variations dues à la fois au préparateur des squash (l'intensité des sqhash n'est pas constante d'une préparation à l'autre) et à des facteurs intrinsèques aux individus squashés.

Nous n'avons pas encore de données à présenter pour cette étape de la procédure.

b) L'obtention du parallèlisme des courbes

Pour chaque source de variation, il faudra établir un coéfficient correcteur qui tienne compte à la fois de la position du pic sur le chromosome de référence et de l'ampleur de ce pic. L'ensemble de ces coéfficients appliqués aux données doit permettre d'obtenir le parallèlisme des courbes en faisant concorder les pics des bandes homologues par comparaison de proche en proche et réajustement automatique de position.

c) La comparaison automatique des chromosomes

Une fois que le parallèlisme des courbes est obtenu, il faudra tester le repérage des inversions chromosomiques par la méthode d'autocorrelation consistant à autocorreler un profil avec lui-même après y avoir effectué une ou plusieurs inversions artificielles. D'autres méthodes peuvent être envisagées, mais il est prématuré d'en parler, la méthode à appliquer dépendant des résultats obtenus.

Ce n'est que lorsque ces éléments auront été définis que l'on pourra passer à la programmation de la procédure permettant d'obtenir dans un temps très court le réajustement de position des bandes et la comparaison des chromosomes de populations suspectées différentes, aboutissant ainsi en quelques minutes au repérage automatique des inversions.

Conclusion

Cette technique est prometteuse en ce sens qu'elle présente trois avantages :

- sa rapidité d'exécution permettant d'obtenir des cartes chromosomiques en très peu de temps.

- une analyse beaucoup plus fine des inversions et le repérage des plus petites qui échappent facilement à l'attention par les méthodes classiques, surtout lorsqu'elles ne concernent que deux ou trois bandes.

- la comparaison, entre cytotypes différents, de la densité optique de l'ADN dans des bandes particulières, ce qui n'a encore jamais été réalisé.

Summary - In order to avoid the slowness of the classical analysis of polytene chromosomes in insect vectors of diseases, a programme of image analysis on computer has been perfected. In its actual form, it allows to obtain a real straight image of the chromosome, the curve of DNA optic density for all the bands and the possibility to bring all the obtained images to a same standard length. The whole of the operations takes between 3 and 5 minutes per chromosome. Then, the author describes a way of approach to complete this programme in order to obtain a comparison of the analysed chromosomes allowing the automatic location of inversions.