COMPARAISON DES TECHNIQUES PCR ET CYTOGÉNÉTIQUE POUR LA DÉTERMINATION DES MEMBRES DU COMPLEXE *ANOPHELES GAMBIAE* AU SÉNÉGAL

D. FONTENILLE*, O. FAYE**, L. KONATE*, N. SY**, F. H. COLLINS***/*

RÉSUMÉ

Les auteurs comparent l'étude cytogénétique des chromosomes et une nouvelle technique PCR pour la détermination des espèces membres du complexe *An. gambiae*. Cinquante-sept individus de

trois zones biogéographiques du Sénégal sont déterminés par les deux méthodes. Les résultats sont totalement identiques. Les avantages et les inconvénients respectifs des deux méthodes sont comparés.

SUMMARY: Comparison of cytological and PCR methods for the identification of mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex in Senegal.

The classical cytological technique and a new PCR technique were compared for the identification of mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. Fifty seven specimens, caught in three different bioclimatic senegalese regions, were tested. Thirty two

An. gambiae and 25 *An. arabiensis* were determined by both methods. All the results were similar. The advantages of each method are discussed.

INTRODUCTION

Les *Anopheles* du complexe *An. gambiae* sont, avec *Anopheles funestus*, les vecteurs du paludisme au Sénégal. Trois espèces de ce complexe ont été signalées : *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. melas*.

La détermination précise de l'espèce ne peut pas se faire morphologiquement. Les principales méthodes utilisées sont l'étude cytogénétique des chromosomes (4), l'analyse d'isoenzymes (6), l'analyse des hydrocarbures cuticulaires (2), les sondes ADN (3) et depuis peu la technique PCR de polymérisation en chaîne (7). Nous comparons les résultats obtenus par l'étude cytogénétique et par la technique PCR sur des individus capturés dans trois régions du Sénégal. L'étude de ces vecteurs de paludisme, en particulier au niveau moléculaire, est un des défis des années à venir. Il était donc fondamental de valider la technique PCR dans le contexte de l'Afrique de l'Ouest.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Capture des culicidae

Les moustiques ont été capturés sur homme et parmi la faune résiduelle, entre août et octobre 1992, dans trois stations appartenant à trois domaines biogéographiques différents :

- village de Wassadou dans la région de Tambacounda (13° 20' W/13° 21' N) en zone soudano-guinéenne,
- village de Ngajaga dans la région de Dakar (17° 03' W/14° 57' N) en zone soudano-sahélienne,
- village de Diomandou dans la région de Podor (14° 39' W/16° 31' N) en zone sahélienne.

Détermination par la méthode de polymérisation en chaîne (PCR)

Trois amorces de 20 nucléotides distinguant des différences spécifiques d'espèces dans les séquences d'espacement non traduites des gènes ribosomiaux (Ribosomal DNA intergenic spacers) sont utilisées (8). Les pattes et les ailes sont broyées et le DNA extrait est ressuspendu dans 30 µl d'eau. Chaque tube d'amplification contient 10 µl du tampon de réaction 10X (10X = 100 mM tris à pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 % (w/v) gélatine), 0,05 µl de dNTP (solution à 100 mM pour chaque nucléotide), 2 µl de chaque amorce (20 ng/µl), 78,4 µl d'H₂O stérile, 2 unités de polymérase (Perkin-Elmer Cetus) et 3 µl d'ADN de moustique. Environ 30 µl d'huile minérale sont ajoutés dans chaque tube pour éviter l'évaporation.

L'amplification se fait selon les conditions suivantes : 5 min à 94° suivi par 30 cycles (dénaturation pendant 1 min à 94° C, hybridation pendant 50 sec à 50° C et elongation à 72° C pendant 50 sec) et 5 min à 72° C. Les échantillons amplifiés subissent une électrophorèse sur gel d'agarose. L'amplification de l'ADN d'*An. arabiensis*

* ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.

** Département de Biologie animale, université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

*** Malaria branch, division of Parasitic diseases, Centers for Disease control, Atlanta, GA 30333, USA.

Accepté le : 3 juin 1993.

produit un fragment de 313 paires de bases et l'amplification de l'ADN d'*An. gambiae* un fragment de 388 pb.

Détermination par la méthode cytogénétique

Les femelles d'anophèles prélevés sont fixées sur le terrain dans une solution de Carnoy modifiée (trois parties d'éthanol absolu et une partie d'Acide acétique glacial) et conservées au congélateur à -20°C jusqu'à la préparation. La détermination spécifique des membres du complexe *An. gambiae* est effectuée sur les chromosomes polyténiques des cellules trophocytaires de l'ovocyte des femelles semi-gravides. La technique de préparation cytologique est celle de Hunt (5) et la lecture des inversions chromosomiques est faite selon la méthode de Coluzzi *et al.* (4).

Les déterminations ont été faites en aveugle, par OF pour la cytogénétique et par DF pour la PCR et les résultats comparés à la fin du protocole.

RÉSULTATS

Au total 57 anophèles ont été identifiés par les deux méthodes. Les résultats des déterminations au niveau de l'espèce ont été entièrement identiques et sont présentés dans le *tableau I*.

TABLEAU I. — Détermination par cytogénétique et PCR des Anopheles du complexe *gambiae*.

Espèces	Méthode de capture	Wassadou	Ngajaga	Diomandou
<i>An. gambiae</i>	homme	3	0	5
	faune résiduelle	19	1	4
<i>An. arabiensis</i>	homme	0	8	1
	faune résiduelle	0	10	6
Total		22	19	16

En zone soudano-guinéenne seul *An. gambiae* a été trouvé. *An. arabiensis* est très largement dominant dans la région de Dakar en zone soudano-sahélienne et on trouve les deux espèces en proportion comparable dans la région du fleuve Sénégal en zone sahélienne. Dans cette dernière région, il est intéressant de noter que 5 des 6 anophèles du complexe capturés sur homme étaient de l'espèce *An. gambiae*.

L'étude cytogénétique a permis de préciser qu'à Ngajaga vers Dakar les rares *An. gambiae* sont du type 2Rb (forme savane) et les *An. arabiensis* majoritairement du type 2Rab. A Diomandou les *An. gambiae* sont du type 2Rb et 2Rbd (forme savane) et les *An. arabiensis* du type 2Rab et 2Rabd. A Wassadou, où *An. gambiae* est seul présent, le cytotype savane prédomine (type 2Rb).

DISCUSSION

On observe une parfaite corrélation entre les deux méthodes pour la détermination de l'espèce.

Chacune des méthodes présente cependant des avantages et des inconvénients par rapport à l'autre. L'étude cytogénétique nécessite d'avoir des femelles semi-gravides, ce qui exclut

une partie des moustiques capturés en faune résiduelle et oblige à maintenir en survie au moins 12 heures les moustiques ayant pris un repas de sang complet sur volontaires. L'interprétation des chromosomes demande une connaissance approfondie, et même pour un entomologiste averti au maximum 80 % des *Anopheles* étudiés sont interprétables (ovaire au bon stade et lecture correcte), mais l'étude cytogénétique permet d'aller plus loin que le niveau spécifique dans l'interprétation génétique en déterminant les cytotypes d'*An. gambiae* (forêt, savane, mopti, bamako, bissau).

L'intérêt majeur de la technique PCR est l'identification de tous les *Anopheles* du complexe *gambiae* capturés, et ce seulement à partir des pattes et des ailes. Le moustique est conservé simplement dans un tube avec un dessiccateur. La technique est simple mais encore onéreuse et elle nécessite un matériel adapté. Une modification de la technique PCR ou l'utilisation de RAPD-PCR (1) devrait permettre d'atteindre voire de dépasser la précision de la technique cytogénétique en permettant la caractérisation de différentes populations d'*An. gambiae* ou d'*An. arabiensis*.

Remerciements. — Nous remercions le Dr DIGOUTTE, directeur de l'Institut Pasteur de Dakar qui nous a autorisé à utiliser du matériel de l'Institut. DF a bénéficié d'un financement de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) et OF d'un financement TDR (UNDP/Banque Mondiale/OMS n° 900071).

Ce travail a été en partie financé par l'appel d'offre paludisme (projet 92 b 26) du Ministère Français de la Coopération.

RÉFÉRENCES

1. Ballinger-Crabtree M. E., Black W. C., Miller R. : Use of genetic polymorphisms detected by RAPD-PCR for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 47, 893-901.
2. Carlson D. A., Service M. V. : Identification of mosquitoes of the *Anopheles gambiae* species complex A and B by analysis of cuticular components. *Science*, 1980, 207, 1089-1091.
3. Gale K. R., Crampton M. C. : DNA probes for species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Med. Vet. Entomol.*, 1987, 1, 127-136.
4. Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., Di Deco M. A. : Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, 73, 483-497.
5. Hunt R. H. : A cytological technique for the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 1973, 15, 137-139.
6. Miles S. J. : A biochemical key to adult member of the *Anopheles gambiae* group of species (Diptera: culicidae). *J. Med. Entomol.*, 1979, 15, 297-299.
7. Paskewitz S. M., Collins F. H. : Use of polymerase chain reaction to identify mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. *Med. Vet. Entomol.*, 1990, 4, 367-373.
8. Scott J. A., Brogdon W. G., Collins F. H. : Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993 (submitted).