

IDENTIFICATION MOLECULAIRE D'ESPECES JUMELLES D'ANOPHELES : EXEMPLE DES COMPLEXES ANOPHELES MINIMUS ET ANOPHELES DIRUS VECTEURS MAJEURS DU PALUDISME EN ASIE DU SUD-EST

S. MANGUIN, J. MOUCHET, M. COOSEMANS

Travail du Centre de Biologie et Gestion des Populations (CBGP), IRD-Montpellier (S.M., Chargée de Recherches 1ère classe) ; IRD, Paris (J.M., Inspecteur Général de Recherche) ; Département de Parasitologie, Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgique (M.C., Professeur). • S. MANGUIN, CBGP-IRD, Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montpellier sur Lez, France • Fax : +33 (0) 4 99 62 33 45 • e-mail : manguin@mpl.ird.fr •

Med. Trop. 2001 ; 61 : 463-469

Les agents pathogènes du paludisme sont des sporozoaires du genre *Plasmodium* dont le cycle biologique passe par l'homme pour la phase asexuée et le moustique du genre *Anopheles* pour la phase sexuée. Près de 460 espèces d'anophèles ont été identifiées dans le monde, mais seulement une soixantaine sont des vecteurs du paludisme, et une trentaine seulement assurent l'essentiel de la transmission de cette maladie. La plupart des espèces vectrices se sont révélées être autant de complexes d'espèces (1) dont les différents composants présentent des caractéristiques chorologiques et écologiques ainsi que des compétences vectorielles parfois très différentes. Aussi, il est indispensable de développer des outils fiables et pratiques pour pouvoir identifier avec précision les membres des complexes et mettre en œuvre une approche sélective des programmes de lutte antivectorielle.

L'identification morphologique des adultes ou/et des stades préimaginaux est la technique de base qui permet de faire un premier tri. Les analyses isoenzymatiques et cytotoxonomiques restent les méthodes d'identification de référence pour un grand nombre de taxons au sein de complexes d'espèces. Plus récemment, des techniques de biologie moléculaire sont entrées dans l'arsenal des taxonomistes. Elles présentent l'avantage d'être d'utilisation facile et de pouvoir s'appliquer à des fragments de l'insecte (patte de moustique) conservés à l'état sec. Ainsi un spécimen peut être analysé par plusieurs techniques [tête-thorax pour un test ELISA de détection de sporozoïtes, abdomen pour identification du repas sanguin, pattes pour les PCR (*Polymerase Chain Reaction*)], même les spécimens de collections peuvent être utilisés.

Il existe à présent un large éventail de techniques moléculaires qui sont plus ou

moins bien adaptées aux besoins des chercheurs (2, 3). La méthode présentée ici, choisie pour l'identification des espèces jumelles de deux complexes d'anophèles, *Anopheles minimus* et *Anopheles dirus*, a été élaborée pour répondre aux attentes des entomologistes de terrain à la recherche d'une technique simple, fiable et peu onéreuse.

Complexe minimus

Anopheles (Cellia) minimus occupe les collines du Sud-Est asiatique où ses larves vivent dans les eaux courantes et ombragées depuis le Nord de l'Inde (Uttar Pradesh) jusqu'au Sud du Japon (Ile Ishigaki, archipel

RyuKyu), du Sud de la Chine (Provinces de Yunnan et Guangxi, Ile de Hainan) au Nord de la Malaisie, incluant le Bangladesh, l'Est du Népal, le Bhoutan, le Myanmar, la Thaïlande, le Cambodge, le Laos et le Viêt-nam (4-13) (Fig. 1a).

Dans toute son aire de répartition, il est reconnu comme étant un excellent vecteur du paludisme. Son comportement a été décrit comme endophile et anthropophile d'où la grande efficacité des traitements intradomiciliaires de DDT qui ont entraîné sa raréfaction, voire sa disparition dans de nombreux sites. Toutefois, à partir de 1975 dans le Nord de la Thaïlande (14, 15), puis au Viêt-nam (16) et au Myanmar (17), une recrudescence du vecteur et une modi-

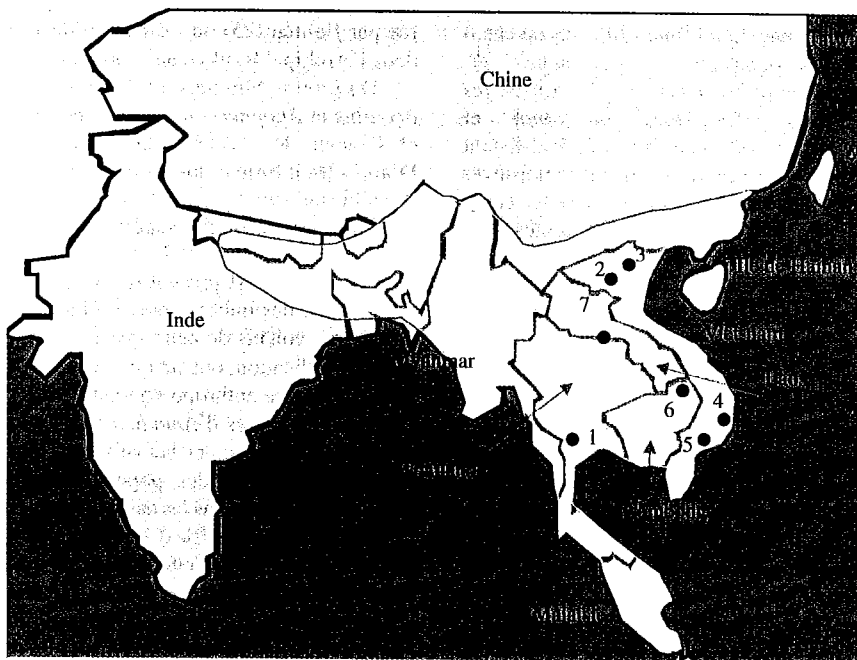


Figure 1a - Distribution d'*Anopheles minimus* s.l. avec mention de nos 7 sites de collectes : 1, Kanchanaburi (Thaïlande) ; 2, Hoa Binh (Vietnam) ; 3, Hanoi (Vietnam) ; 4, Khanh Hoa (Vietnam) ; 5, Binh Thuan (Vietnam) ; 6, Rattanakiry (Cambodge) ; 7, Vientiane (Laos).

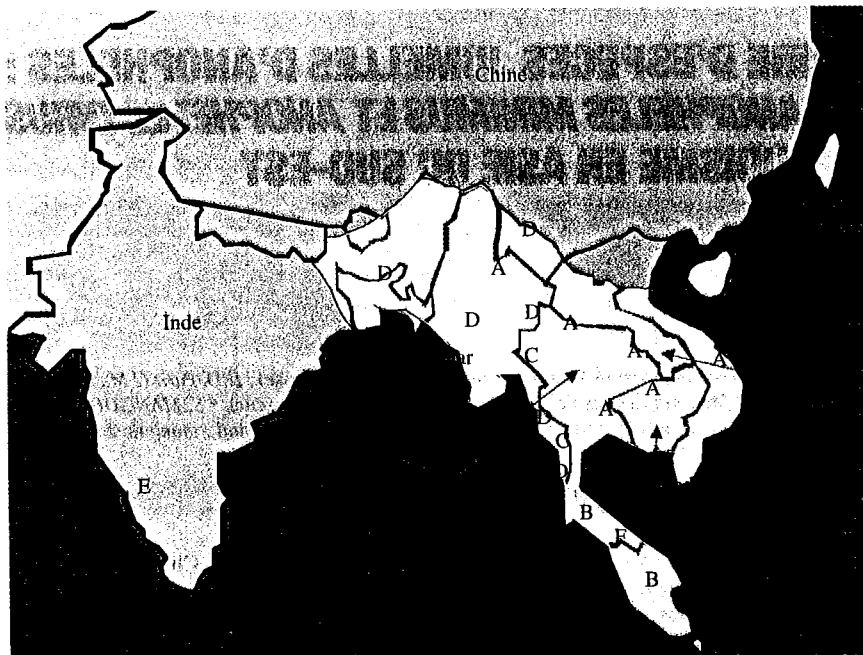


Figure 1b - Répartition des 7 espèces du complexe *Anopheles dirus* (Espèces A, B, C, D, E, F et *Anopheles takasagoensis*, mentionnée par la lettre ou le nom correspondant).

fication de son comportement ont été observées. En effet, des populations d'*Anopheles minimus* piquaient plus tôt dans la nuit, quittaient rapidement les lieux où elles s'étaient nourries pour rechercher des abris extérieurs, et le pourcentage de spécimens se nourrissant sur animaux, hors des habitations, a progressivement augmenté (15, 18, 19).

Anopheles minimus appartient au groupe Minimus qui réunit 8 espèces en Asie et une en Afrique (20). Six de ces 8 espèces, *Anopheles aconitus*, *Anopheles filipinae*, *Anopheles flavirostris*, *Anopheles minimus*, *Anopheles pampanai* et *Anopheles varuna*, occupent le Sud-Est du continent asiatique et peuvent se retrouver en sympatrie. Ces espèces, dont les capacités vectorielles sont très différentes, sont difficiles à différencier au stade adulte car les caractéristiques morphologiques ne sont pas fixes (21); de ce fait, la distribution précise de chaque espèce n'est pas connue. De plus, les différences de comportement observées suggèrent l'existence d'un complexe au sein d'*Anopheles minimus* (22), ce qui fut confirmé par l'identification d'au moins 2 espèces A et C en Thaïlande (23), puis au Viêt-nam (13). L'espèce A, endophile et anthropophile, correspond au comportement d'*Anopheles minimus* classiquement décrit avant les campagnes de lutte antivectorielle. L'espèce C est cinq fois moins endophile, plus exophage et zoophile que l'espèce A (13). Les 2 espèces ont été trouvées en sympatrie en Thaïlande et au Viêt-nam, mais les études sur leur distri-

bution, leur écologie et leur rôle vecteur ne font que débiter.

D'autres questions restent posées, comme la description de deux formes A et B provenant de deux provinces (Yunnan, Guangxi) de Chine du Sud (10) et de l'île d'Hainan (24) dont on ignore la correspondance avec les espèces *Anopheles minimus* A et C de Thaïlande et du Viêt-nam. Il en est de même avec l'espèce *Anopheles minimus* D de Thaïlande suggérée par Baimai (25) ou l'espèce E décrite dans l'Archipel Ryukyu au Japon (26).

Du groupe Minimus, seuls *Anopheles aconitus* et *Anopheles minimus* espèces A et C sont des vecteurs du paludisme. D'après les informations les plus récentes, il semble qu'*Anopheles minimus* A présente une capacité vectorielle supérieure à l'espèce C en Thaïlande (27). Dans le centre du Viêt-nam, où n'est présent qu'*Anopheles minimus* A, des indices sporozoïtiques de 3,6%, très voisins de ceux que l'on avait avant l'éradication, ont été observés, associés à une forte anthro-endophilie (28). Bien que les larves d'*Anopheles minimus* occupent généralement les ruisseaux des régions collinaires, des populations ont aussi été récoltées dans les eaux stagnantes de citernes à la périphérie d'Hanoi, au Nord du Viêt-nam (1, 16). Cette population qui, dans ce contexte précis, n'a été associée à aucune transmission de paludisme, a été identifiée par marqueurs isoenzymatiques et moléculaires, comme appartenant à l'espèce *Anopheles minimus* A. Une évaluation précise de la compétence vectorielle de leur

distribution géographique et du niveau de résistance aux insecticides des espèces A et C s'impose.

Toutefois, cette évaluation ne peut être faite qu'avec des méthodes précises et fiables d'identification des espèces. La différenciation morphologique des adultes de chaque espèce peut être utile, cependant elle ne permet pas la distinction des deux espèces du complexe *Anopheles minimus*. L'analyse isoenzymatique, basée sur les produits des gènes Mdh et Odh, a longtemps constitué la technique de référence pour l'identification des espèces du groupe *Anopheles minimus* (13, 29), mais cette méthode présente l'inconvénient majeur de ne s'appliquer que sur des spécimens congelés. Différentes méthodes moléculaires, telles que RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) (30), ASA (amplification allèle spécifique), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) (31) et RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) (32) permettent d'identifier jusqu'à 7 espèces, *Anopheles minimus* A et C, *Anopheles aconitus*, *Anopheles pampanai*, *Anopheles varuna*, *Anopheles jeyporiensis* et *Anopheles culicifacies* s.l. Mais une méthode plus simple et plus robuste est nécessaire pour des études épidémiologiques de terrain (32).

Complexe dirus

Anopheles (Cellia) dirus s.l. représente un complexe d'espèces dont certaines sont des vecteurs majeurs du paludisme en Asie du Sud-Est, du fait de leur forte anthropophilie (33). Leurs indices sporozoïtiques peuvent atteindre 13% selon le lieu et la saison (34). Ce complexe est composé d'au moins 7 espèces jumelles distribuées dans la région Orientale (Fig. 1b), telle qu'*Anopheles dirus* s.s. (A), les espèces B, C, D, et E, ainsi qu'*Anopheles nemophilous* (F) et *Anopheles takasagoensis* (35). Ces 7 espèces aux capacités vectorielles très différentes, sont essentiellement isomorphiques, c'est-à-dire indifférenciables morphologiquement, et certaines d'entre elles peuvent être sympatriques. Les stades immatures vivent dans de petites mares d'eau douce, ombragées et temporaires des sous-bois, mais aussi dans des creux d'arbre, voire des puits (17). L'espèce A possède la distribution la plus vaste (Fig. 1b) puisqu'elle couvre la région du Mékong, de la frontière Thai-Myanmar au Viêt-nam et au Sud de la Chine (Ile de Hainan) (36). Les espèces B et *Anopheles nemophilous* (F) sont circonscrites à la Péninsule Thai-Malaise (36). L'espèce C occupe la partie orientale de la Péninsule

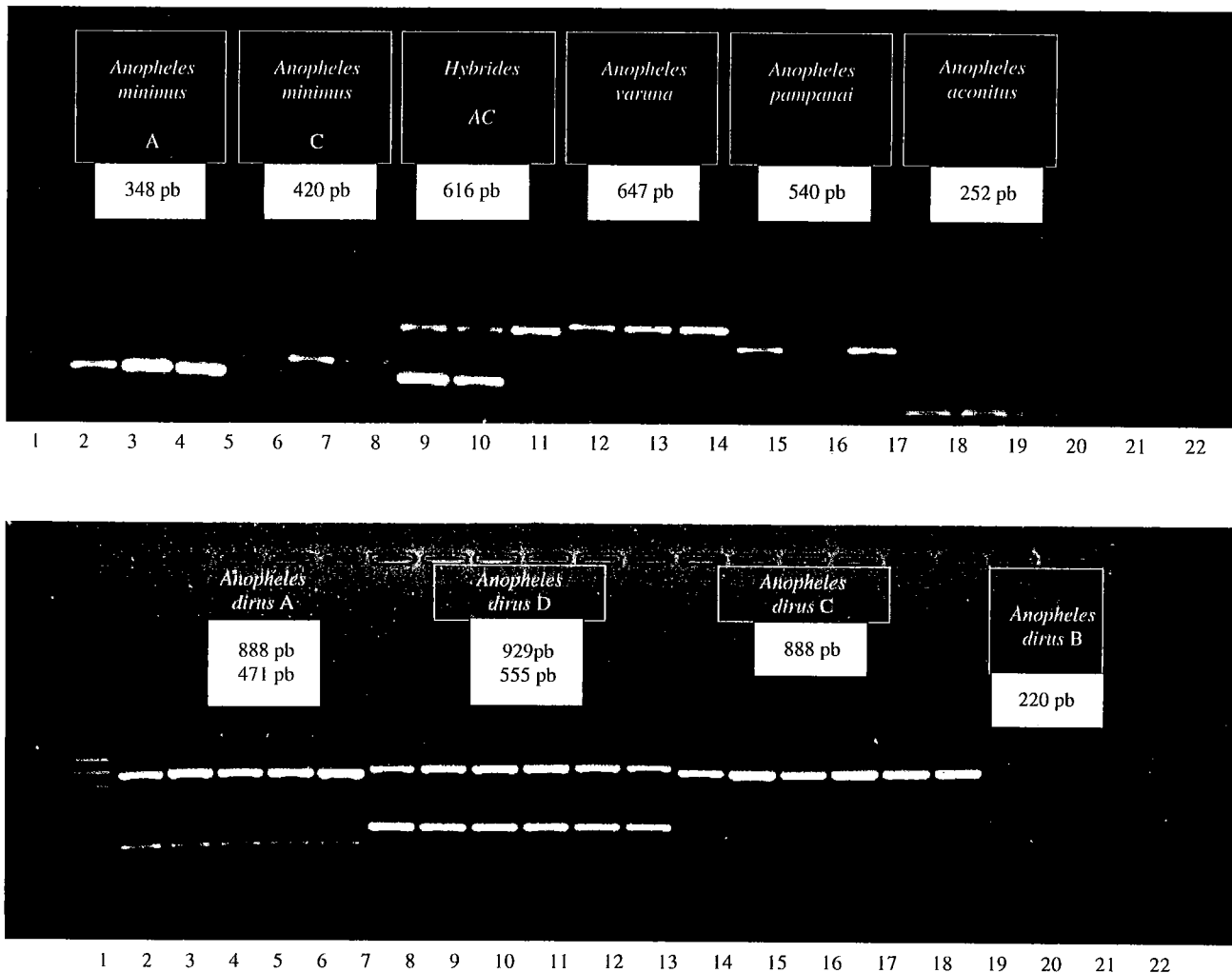


Figure 2 - a). PCR multiplexe d'identification chez *Anopheles minimus* s.l., avec les espèces A (profils 2-4) et C (profils 5-7), hybrides AC (profils 8-10), *An. varuna* (profils 11-13), *An. pampanai* (profils 14-16) et *An. aconitus* (profils 17-19), b) PCR multiplexe d'identification chez *Anopheles dirus* s.l., avec les espèces A (profils 2-6), D (profils 7-12), C (profils 13-18), B (profils 19-20). Profils 1 et 22, marqueurs de poids moléculaires (100-bp ladder).

Thaïlandaise jusqu'à la frontière Thai-Myanmar (Province Kanchanaburi) (36). L'espèce D a également une aire de distribution importante couvrant le Myanmar, le Bangladesh, le Nord-Est de l'Inde et éventuellement la Chine du Sud (Province de Yunnan) où son identification n'a pas été confirmée (12, 34, 37-39). L'espèce E n'est connue que du Sud-Ouest de l'Inde (40) et *Anopheles takasagoensis* que de Taiwan (41).

La distribution précise et le degré d'implication de ces espèces dans la transmission du paludisme sont encore mal connus, quelle que soit la région d'Asie du Sud-Est considérée. *Anopheles dirus* A, C et D sont des vecteurs efficaces de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* (12, 34, 42-48). La capacité vectorielle des espèces B, E, *Anopheles nemophilous* et *Anopheles takasagoensis* n'a pas encore été bien étudiée, on suspecte seulement qu'elle est faible du fait

de leur tendance zoophile.

Les espèces du complexe *Anopheles dirus* ont été essentiellement différenciées sur la base de caractères cytotoxonomiques, et plus particulièrement sur les différences observées au niveau des chromosomes polytènes et mitotiques (38, 40, 49-52). Comme pour le complexe *Anopheles minimus*, d'autres techniques, basées sur des marqueurs isoenzymatiques (53) ou moléculaires (54-59) ont également été développées. Cependant, à l'usage, ces méthodes ont révélé des inconvénients majeurs qui rendent difficiles leur application généralisée (58), à cause de la nécessité d'acquisition de compétences techniques spécifiques (cytotoxonomie), ou de la congélation du matériel (isozymes), ou du mauvais rendement de la technique. De ce fait, il nous a semblé indispensable de développer une méthode moléculaire plus simple à utiliser, plus efficace et moins coûteuse.

Principe du développement des deux méthodes moléculaires d'identification d'espèces

Dans une première phase, des amplifications au hasard de nombreux fragments d'ADN génomique ont été réalisées par PCR avec différents oligonucléotides RAPD (10 bases). Les profils d'amplifications obtenus pour chaque amorce RAPD ont été comparés entre les populations d'un même complexe afin de différencier les espèces (60, 61). Sur un total de 46 amorces RAPD testées dans chacun des deux complexes, 9 (20 %) mettent en évidence un polymorphisme entre espèces, c'est-à-dire qu'il y a des variations dans les profils de bandes amplifiées d'une population à l'autre. Parmi ces 9 oligonucléotides, 4 (9 %) permettent de

discriminer les espèces jumelles au sein de chaque complexe grâce à des profils de bandes spécifiques et reproductibles. Pour chacun des 2 complexes, les 4 amorces sélectionnées comme marqueurs d'espèces sont, d'une part, A1, A5, F2, F4 pour *Anopheles minimus* s.l. (60) et, d'autre part, A5, F6, F8, P14 pour *Anopheles dirus* s.l. (61).

A partir de cette sélection de 4 marqueurs RAPD, démarre la deuxième phase. En effet, la technique RAPD-PCR présente souvent un problème de reproductibilité des résultats qui peut être provoqué par tout changement de manipulation, même mineur, (origine des réactifs, thermocycleur, manipulateur, etc.), ce qui peut entraîner des variations dans les profils d'amplification, rendant ainsi difficile son transfert dans d'autres laboratoires. Pour pallier cet inconvénient, des couples d'amorces spécifiques sont développées à partir du clonage et séquençage des produits d'amplification RAPD caractéristiques des espèces jumelles. Ces couples d'amorces permettent l'amplification par PCR d'un seul locus spécifique. Le fragment d'ADN génomique généré de cette façon est appelé SCAR (« Sequence Characterized Amplified Region »).

Pour le groupe *Anopheles minimus*, le marqueur RAPD-F2 est celui qui nous a permis de développer 8 couples d'amorces permettant la discrimination des 5 espèces étudiées (60). Ces couples d'amorces (F2p/F2q, Aco3/Aco4, Pam3/Pam4, Var3/Var4) se combinent 2 à 2 pour amplifier respectivement des fragments situés à 252 pb pour *Anopheles aconitus*, à 348 pb pour l'espèce *Anopheles minimus* A et 420 pb pour C, à 540 pb pour *Anopheles pampanai* et à 647 pb pour *Anopheles varuna* (Fig. 2a). Pour les hybrides *Anopheles minimus* AC du Nord-Viêt-nam (Province de Hoa Binh), préalablement identifiés par analyse isoenzymatique (13) et PCR-RFLP (32), l'amplification met en évidence un fragment à 616 pb, au lieu des deux fragments spécifiques des espèces A et C comme attendu (60). La spécificité de ces amorces a été confirmée en les testant sur d'autres espèces du sous-genre *Cellia*, telles que *Anopheles dirus*, *Anopheles funestus*, *Anopheles jeyporiensis*, *Anopheles maculatus*, *Anopheles subpictus* et *Anopheles sundaicus* (60), avec lesquelles aucune amplification a été obtenue.

Dans le cas du complexe *Anopheles dirus*, le marqueur RAPD-F8 a permis le développement de 6 amorces (ET1, ET2, ES1, ES2, APS1, APS2) qui, en se combinant 2 à 2, amplifient 2 fragments à 471 et 888 pb pour l'espèce A, un seul fragment à

220 pb caractéristique de l'espèce B et un seul à 888 pb pour l'espèce C (partagé avec l'espèce A), et 2 fragments à 555 et 929 pb spécifiques de l'espèce D (Fig. 2b) (61). Pour tester la spécificité de ces amorces, nous les avons utilisées sur 7 espèces d'anophèles du sous-genre *Cellia*, telles que *Anopheles minimus* espèces A et C, *Anopheles aconitus*, *Anopheles pampanai*, *Anopheles varuna*, *Anopheles subpictus* et *Anopheles sundaicus*. Les PCR ont produit soit aucune amplification, soit des bandes de faible intensité et de tailles différentes des fragments définis ci-dessus.

Ces couples d'amorces propres à chaque complexe peuvent être utilisés soit individuellement, soit groupés en une PCR multiplexe (Fig. 2a, b). La combinaison des amorces dans une PCR multiplexe produit les mêmes profils d'amplification que ceux obtenus à partir des PCR n'utilisant qu'une seule paire d'amorces. Les deux PCR multiplexes ont été testées et validées sur un échantillon de 956 spécimens pour le complexe *Anopheles minimus* et 498 spécimens pour le complexe *Anopheles dirus* (60, 61).

Sympatrie dans les sites d'étude du Viêt-nam, Laos et Cambodge

Grâce aux PCR multiplexes, nous avons pu confirmer la présence des deux espèces *Anopheles minimus* A et C à l'Ouest de la Thaïlande (site n° 1, Province de Kanchanaburi) et au Nord-Viêt-nam (site n° 2, Province de Hoa Binh) avec, dans ce dernier site la présence d'hybrides AC et d'*Anopheles aconitus* (Fig. 1a). Aucun spécimen d'*Anopheles minimus* C, ni d'hybride AC n'a été identifié dans nos autres sites d'étude du Centre et Sud Viêt-nam (sites n° 4 et 5, Provinces de Khanh Hoa et Binh Thuan), du Cambodge (site n° 6, Province de Rattanakiry) et du Laos (sites n° 7, Province de Vientiane). Seule l'espèce *Anopheles dirus* A a été identifiée au centre du Viêt-nam, au Cambodge et au Laos (sites n° 4-7). Au centre du Viêt-nam (sites n° 4 et 5), nous avons montré qu'*Anopheles dirus* A vit en sympatrie avec 4 espèces du groupe *Anopheles minimus*, qui sont *Anopheles minimus* A, *Anopheles aconitus*, *Anopheles pampanai* et *Anopheles varuna*. Au Cambodge (site n° 6), *Anopheles dirus* A, *Anopheles minimus* A, *Anopheles aconitus* et *Anopheles pampanai* sont sympatriques ; et au Laos (site n° 7), *Anopheles dirus* A, *Anopheles minimus* A et *Anopheles aconitus* se trouvent également en sympatrie (60).

Discussion

L'identification précise des anophèles reste un problème essentiel à résoudre pour une meilleure compréhension de leur rôle potentiel dans la transmission du paludisme, ainsi que pour l'amélioration de l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle. Des techniques essentiellement basées sur les différences morphologiques, biochimiques, cytotaxonomiques, moléculaires ont été développées pour séparer les espèces jumelles au sein des complexes. Les analyses isoenzymatiques et cytotaxonomiques sont encore considérées comme les méthodes de référence pour l'identification de nombreuses espèces jumelles. Toutefois, la première nécessité des spécimens congelés pour conserver intactes les protéines, ce qui demande l'utilisation de carboglace ou d'azote liquide, pas toujours disponibles en conditions de terrain ; et la deuxième repose sur une technicité pointue dont l'acquisition n'est pas aisée. Ainsi, les techniques moléculaires présentent le double avantage de pouvoir se réaliser sur des spécimens conservés à sec et, comme peu de matériel est nécessaire, telle qu'une patte de moustique, les individus peuvent également être examinés pour la recherche des parasites (ELISA, PCR pour l'identification ou pour la détection de mutations responsables de la résistance aux antipaludéens), détermination de la parité, identification des repas sanguins, détection de gènes liés à la résistance aux insecticides). Cependant, certaines méthodes moléculaires peuvent être longues, chères ou présentent un manque de reproductibilité, et de ce fait, elles ne sont pas toujours transférables dans tous les laboratoires ou applicables à l'identification de larges échantillons. A titre d'exemple, la PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) permet l'identification de 4 espèces du groupe *Anopheles minimus* (31), cependant, cette réaction nécessite 16 à 20 h et l'électrophorèse en gel d'acrylamide est onéreuse et difficile à réaliser. La PCR-RFLP possède l'avantage d'identifier 5 espèces du groupe *Anopheles minimus*, ainsi qu'*Anopheles jeyporiensis* (32) et *Anopheles culicifacies* s.l., mais cette technique nécessite une étape de digestion du produit PCR par une enzyme de restriction (BsiZI) avant la phase finale d'électrophorèse. La PCR-RAPD est une technique rapide, facile et peu onéreuse ; cependant, elle est très sensible aux changements, spécialement les variations de concentration d'ADN ou de type de Taq polymérase, ce qui peut entraîner un

manque de reproductibilité des profils d'amplification (2).

En fonction du niveau de connaissance entomologique du lieu étudié, soit tous les couples d'amorces doivent être associés en une PCR multiplexe, dans le cas où aucune étude préalable n'a été effectuée, ou lorsque toutes les espèces sont en sympatrie ; soit on n'associe que les couples d'amorces nécessaires pour identifier les espèces suspectées. Cette méthode est simple, robuste, peu coûteuse et réalisable dans tous les laboratoires possédant un équipement de biologie moléculaire élémentaire.

L'utilisation de la méthode décrite contribue à l'estimation précise de la distribution des espèces des deux complexes *minimus* et *dirus*. La vaste distribution géographique d'*Anopheles minimus* A et *Anopheles dirus* A en Asie du Sud-Est a été confirmée (60, 61). Les techniques PCR et isoenzymatiques appliquées aux populations d'*Anopheles minimus* inféodées aux eaux stagnantes des citernes de la banlieue d'Hanoi n'ont pas permis de distinguer celles-ci des autres populations d'*Anopheles minimus* A du Viêt-nam, Cambodge, Laos et Thaïlande, et ce malgré une écologie larvaire et un comportement des adultes fort différents (zoophile). Par comparaison avec les autres populations d'*Anopheles minimus* A, les faibles variations notées sur les profils RAPD ne suffisent pas à justifier l'existence d'un taxon particulier. L'espèce *Anopheles minimus* C n'a été identifiée que dans le Nord Viêt-nam (Province de Hoa Binh), le Nord-Ouest et le Nord de la Thaïlande (Provinces de Kanchanaburi et Chiang Mai) (31). Dans les régions collinaires du Nord Viêt-nam, la proportion des espèces *Anopheles minimus* A et C varie de façon importante d'un village à l'autre au sein d'un même district (13). Notre méthode d'identification devrait permettre d'estimer plus précisément la répartition de l'espèce C qui doit occuper une aire plus large que celle actuellement connue ■

Remerciements • Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un projet INCO-DC (n° ERBIC18CT970211) financé par la Commission Européenne (DG XII) et grâce au partenariat étroit développé avec 6 instituts : National Institute of Malariology, Parasitology & Entomology (NIMPE), Hanoi (Viêt-nam) ; Centre of Malariology, Parasitology & Entomology (CMPE), Vientiane (Laos) ; National Malaria Center (NMC), Phnom Penh (Cambodge) ; Université Mahidol, Bangkok (Thaïlande) ; The Natural History Museum (NHM), London (UK) ; Institut de Médecine Tropicale (IMT), Anvers (Belgique). Nous remercions chaleureusement P. Kengne pour son implication dans la partie technique

Résumé •

La lutte effective contre les vecteurs du paludisme doit être basée sur l'identification précise des espèces, en particulier au sein de complexes dont les membres ne peuvent se différencier morphologiquement. Deux méthodes moléculaires, de type PCR, ont été développées pour identifier d'une part, les deux espèces du complexe *Anopheles minimus* et 5 espèces du groupe *Minimus* et d'autre part, quatre espèces du complexe *Anopheles dirus*. L'association de couple d'oligonucléotides sous la forme de PCR multiplexe a permis le développement de deux PCR simples, robustes et adaptées à chacun des deux complexes d'espèces qui comprennent les vecteurs majeurs du paludisme en Asie du Sud-Est. Ces méthodes d'identification, élaborées pour répondre aux attentes des entomologistes de terrain à la recherche de technique fiable et peu onéreuse, faciliteront l'estimation de la distribution géographique de chaque vecteur afin de mieux cibler les opérations de lutte antivectorielle.

Mots-clés •

Vecteurs du paludisme - Complexes d'espèces - Identification moléculaire - PCR multiplexe - Asie du Sud-Est.

Abstract •

MOLECULAR IDENTIFICATION OF SIBLING ANOPHELES SPECIES : EXAMPLE OF THE ANOPHELES MINIMUS AND ANOPHELES DIRUS COMPLEXES, MAJOR MALARIA VECTORS IN SOUTHEAST ASIA

Effective control of malaria vectors requires precise identification of species. This is especially important within complexes of species that cannot be distinguished based on morphological features. Two methods based on polymerase chain reaction (PCR) analysis have been developed to identify 2 species in the *Anopheles minimus* complex and 5 species of the *Minimus* group as well as 4 species of the *Anopheles dirus* complex. Association of oligonucleotide couples in the form of multiplex PCR has allowed development of two simple, reliable PCR techniques adapted to each one of these species complexes that comprise the major vectors of malaria in Southeast Asia. Specifically designed to meet the needs of entomologist working in the field for reliable, cost-effective tests, these techniques will facilitate assessment of the geographical distribution of each vector. These data will help to better target vector control measures.

Keys words •

Malaria vectors - Species complexes - Molecular identification - Multiplex PCR - Southeast Asia.

REFERENCES

- 1 - MANGUIN S., FONTENILLE D., CHANDRE F. et Coll. - Anopheline population genetics. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1999; **92** : 229-235.
- 2 - HOY M.A. - Insect molecular genetics : an introduction to principles and applications. Academic Press ed., San Diego, 1994, 546 p.
- 3 - KARP A., ISAAC P.G., INGRAM D.S. - Molecular tools for screening biodiversity : plants and animals. Chapman & Hall ed., London, 1998, 498 p.
- 4 - BAIMAI V., KIJCHALAO U., RATTANARITHIKUL R. - Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: V. The *Myzomyia* Series, subgenus *Cellia* (Diptera : Culicidae). *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1996; **12** : 97-105.
- 5 - DAS S.C., BARUAH I. - Incrimination of *Anopheles minimus* Theobald and *Anopheles balabacensis balabacensis* Baisas (*A. dirus*) as malaria vectors in Mizoram. *Indian J. Malariol.* 1985; **22** : 53-55.

- 6 - DEV V. - *Anopheles minimus* : its bionomics and role in the transmission of malaria in Assam, India. *Bull. World Health Organ.* 1996; **74** : 61-66.
- 7 - DUTTA P., BARUAH B.D. - Incrimination of *Anopheles minimus* Theobald as a vector of malaria in Arunachal Pradesh. *Indian J. Malariol.* 1987; **24** : 159-162.
- 8 - KHAN S.A., HANDIQUE R., TEWARI S.C. et Coll. - Larval ecology and mosquito fauna of upper Brahmaputra valley, northeast India. *Indian J. Malariol.* 1998; **35** : 131-145.
- 9 - KOBAYASHI J., SOMBOON P., KEOMANILA H. et Coll. - Malaria prevalence and a brief entomological survey in a village surrounded by rice fields in Khammouan province, Lao PDR. *Trop. Med. Int. Health* 2000; **5** : 17-21.
- 10 - SAWABE K., TAKAGI M., TSUDA Y. et Coll. - Genetic differentiation among three populations of *Anopheles minimus* of Guangxi and Yunnan Provinces in the People's Republic of China [corrected and republished in Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997 Jun; 28(2):440-9]. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1996; **27** : 818-827.
- 11 - TSUDA Y., TAKAGI M., TOMA T. et Coll. - Mark-release-recapture experiment with adult *Anopheles minimus* (Diptera : Culicidae) on Ishigaki Island, Ryukyu Archipelago, Japan. *J. Med. Entomol.* 1999; **36** : 601-604.
- 12 - TUN-LIN W., THU M.M., THAN S.M., MYA M.M. - Hyperendemic malaria in a forested, hilly Myanmar village. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1995; **11** : 401-407.
- 13 - VAN BORTEL W., TRUNG H.D., MANH N.D. et Coll. - Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. *Trop. Med. Int. Health* 1999; **4** : 257-265.
- 14 - ISMAIL I.A., NOTANANDA V., SCHEPENS J. - Studies on malaria and responses of *Anopheles balabacensis balabacensis* and *Anopheles minimus* to DDT residual spraying in Thailand. *Acta Trop.* 1975; **32** : 206-231.
- 15 - ISMAIL I.A., PHINICHONGSE S., BOONRASRI P. - Responses of *Anopheles minimus* to DDT residual spraying in a cleared forested foothill area in central Thailand. *Acta Trop.* 1978; **35** : 69-82.
- 16 - PHAN V.T. - Epidémiologie du paludisme et lutte antipaludique au Vietnam, Hanoi. 1998, 241 p.
- 17 - MYO-PAING, TUN-LIN W., SEBASTIAN A.A. - Behaviour of *Anopheles minimus* (Theobald) in relation to its role as vector of malaria in a forested foothill area of Burma. *Trop. Biomed.* 1988; **5** : 161-166.
- 18 - NUTSATHAPANA S., SAWADWONGPORN P., CHITPRAROP U., CULLEN J.R. - The behaviour of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. *Bull. Entomol. Res.* 1986; **76** : 303-312.
- 19 - HARBACH R.E., GINGRICH J.B., PANG L.W. - Some entomological observations on malaria transmission in a remote village in northwestern Thailand. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1987; **3** : 296-301.
- 20 - HARBACH R.E. - Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera : Culicidae) : the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull. Entomol. Res.* 1994; **84** : 331-342.
- 21 - HARRISON B.A. - The *Myzomyia* Series of *Anopheles* (Cellia) in Thailand, with emphasis on intra-specific variations (Diptera : Culicidae). Medical entomology studies - XIII. *Contr. Amer. Entomol. Inst.* 1980; **17** : 1-195.
- 22 - NUTSATHAPANA S., SAWADWONGPORN P. et Coll. - A mark-release-recapture demonstration of host-preference heterogeneity in *Anopheles minimus* Theobald (Diptera : Culicidae) in a Thai village. *Bull. Entomol. Res.* 1986; **76** : 313-320.
- 23 - SUCHARIT S., KOMALAMISRA N., LEEMINGSAWAT S. et Coll. - Population genetic studies on the *Anopheles minimus* complex in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1988; **19** : 717-723.
- 24 - YU Y. - Studies on the two forms of *Anopheles* (Cellia) *minimus* Theobald, 1901 in China (Diptera : Culicidae). *Mosq. Syst.* 1987; **19** : 143-145.
- 25 - BAIMAI V. - Speciation and species complexes of the *Anopheles malaria* vectors in Thailand., 3rd conference on malaria research, Thailand, 1989, pp 146-162.
- 26 - SOMBOON P., WALTON C., SHARPE R.G. et Coll. - Evidence for a new sibling species of *Anopheles minimus* from the Ryukyu Archipelago, Japan. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2001; **17** : 98-113.
- 27 - SOMBOON P., ARAMRATTANA A., LINES J., WEBBER R. - Entomological and epidemiological investigations of malaria transmission in relation to population movements in forest areas of north-west Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1998; **29** : 3-9.
- 28 - MARCHAND R.P., QUANG N.T., HOANH N.Q., VIEN N.T. - The Khanh Phu malaria research project. Review Meeting ed., Hanoi, 1997, 168 p.
- 29 - GREEN C.A., GASS R.F., MUNSTERMANN L.E., BAIMAI V. - Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. *Med. Vet. Entomol.* 1990; **4** : 25-34.
- 30 - SUCHARIT S., KOMALAMISRA N. - Differentiation of *Anopheles minimus* species complex by RAPD-PCR technique. *J. Med. Assoc. Thai.* 1997; **80** : 598-602.
- 31 - SHARPE R.G., HIMS M.M., HARBACH R.E., BUTLIN R.K. - PCR-based methods for identification of species of the *Anopheles minimus* group: allele-specific amplification and single-strand conformation polymorphism. *Med. Vet. Entomol.* 1999; **13** : 265-273.
- 32 - VAN BORTEL W., TRUNG H.D., ROELANTS P. et Coll. - Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex. *Insect. Mol. Biol.* 2000; **9** : 335-340.
- 33 - SCANLON J.E., SANDHINAND U. - The distribution and biology of *Anopheles balabacensis* in Thailand (Diptera : Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1965; **2** : 61-69.
- 34 - ROSENBERG R., MAHESWARY N.P. - Forest malaria in Bangladesh. II. Transmission by *Anopheles dirus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982; **31** : 183-191.
- 35 - PEYTON E.L. - A new classification for the Leucosphyrus group of *Anopheles* (Cellia). *Mosq. Syst.* 1989; **21** : 197-205.
- 36 - BAIMAI V., KIJCHALAO U., SAWADWONGPORN P., GREEN C.A. - Geographic distribution and biting behaviour of four species of the *Anopheles dirus* complex (Diptera : Culicidae) in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1988; **19** : 151-161.
- 37 - DUTTA P., BHATTACHARYYA D.R., SHARMA C.K., DUTTA L.P. - Anopheline fauna of parts of Tirap district, Arunachal Pradesh with reference to malaria transmission. *Indian J. Med. Res.* 1992; **95** : 245-249.
- 38 - BAIMAI V., THU M.M., PAING M., MAHESWARY N.P. - Distribution and chromosomal polymorphism of the malaria vector *Anopheles dirus* species D. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1988; **19** : 661-665.
- 39 - XU J.N., QU F.Y. - Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. *Med. Vet. Entomol.* 1997; **11** : 134-138.

Anopheles Anopheles Anopheles

- 40 - SAWADIPANICH Y., BAIMAI V., HARRISON B.A. - *Anopheles dirus* species E: chromosomal and crossing evidence for another member of the dirus complex. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1990; **6** : 477-481.
- 41 - PEYTON E.L., HARRISON B.A. - *Anopheles (Cellia) takasagoensis* Morishita 1946, an additional species in the Balabacensis Complex of Southeast Asia (Diptera: Culicidae). *Mosq. Systematics* 1980; **12** : 335-347.
- 42 - BISWAS H., YADAVA R.L., RAO C.K. et Coll. - Malaria transmission during post-spray period of pirimiphos-methyl in Arunachal Pradesh. *J. Commun. Dis.* 1992; **24** : 219-223.
- 43 - DUTTA P., BHATTACHARYYA D.R., DUTTA L.P. - Epidemiological observations on malaria in some parts of Tengakhat PHC, Dibrugarh district, Assam. *Indian J. Malariol.* 1991; **28** : 121-128.
- 44 - DUTTA P., BHATTACHARYYA D.R., SHARMA C.K., DUTTA L.P. - The importance of *Anopheles dirus* (*A. balabacensis*) as a vector of malaria in northeast India. *Indian J. Malariol.* 1989; **26** : 95-101.
- 45 - GINGRICH J.B., WEATHERHEAD A., SATTABONGKOT J. et Coll. - Hyperendemic malaria in a Thai village: dependence of year-round transmission on focal and seasonally circumscribed mosquito (Diptera: Culicidae) habitats. *J. Med. Entomol.* 1990; **27** : 1016-1026.
- 46 - RAHMAN W.A., CHE'RUS A., AHMAD A.H. - Malaria and *Anopheles* mosquitoes in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1997; **28** : 599-605.
- 47 - RATTANARITHIKUL R., KONISHI E., LINTHICUM K.J. - Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* circumsporozoite antigen in anopheline mosquitoes collected in southern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; **54** : 114-121.
- 48 - ROSENBERG R., ANDRE R.G., SOMCHIT L. - Highly efficient dry season transmission of malaria in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; **84** : 22-28.
- 49 - BAIMAI V. - Population cytogenetics of the malaria vector *Anopheles leucosphyrus* group. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health* 1988 ; **19** : 667-680.
- 50 - BAIMAI V., HARBACH R.E., KIJCHALAO U. - Cytogenetic evidence for a fifth species within the taxon *Anopheles dirus* in Thailand. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1988; **4** : 333-338.
- 51 - BAIMAI V., POOPITTAYASATAPORN A., KIJCHALAO U. - Cytological differences and chromosomal rearrangements in four members of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae). *Genome* 1988; **30** : 372-379.
- 52 - POOPITTAYASATAPORN A., BAIMAI V. - Polytene chromosome relationships of five species of the *Anopheles dirus* complex in Thailand. *Genome* 1995; **38** : 426-434.
- 53 - GREEN C.A., MUNSTERMANN L.E., TAN S.G. et Coll. - Population genetic evidence for species A, B, C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs for their identification. *Med. Vet. Entomol.* 1992; **6** : 29-36.
- 54 - PANYIM S., YASOTHORNSRIKUL S., TUNGPRADUBKUL S. et Coll. - Identification of isomorphic malaria vectors using a DNA probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; **38** : 47-49.
- 55 - AUDTHO M., TASSANAKAJON A., BOONSAENG V. et Coll. - Simple nonradioactive DNA hybridization method for identification of sibling species of *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) complex. *J. Med. Entomol.* 1995; **32** : 107-111.
- 56 - XU X., XU J., QU F. - A diagnostic polymerase chain reaction assay for species A and D of the *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) species complex based on ribosomal DNA second internal transcribed spacer sequence. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1998; **14** : 385-389.
- 57 - YASOTHORNSRIKUL S., PANYIM S., ROSENBERG R. - Diagnostic restriction fragment patterns of DNA from the four isomorphic species of *Anopheles dirus*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1988; **19** : 703-708.
- 58 - WALTON C., HANDLEY J.M., KUVANGKADILOK C. et Coll. - Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med. Vet. Entomol.* 1999; **13** : 24-32.
- 59 - WALTON C., CHANG M.S., HANDLEY J.M. et Coll. - The isolation and characterization of microsatellites from *Anopheles dirus* mosquitoes. *Mol. Ecol.* 2000; **9** : 1665-1667.
- 60 - KENGNE P., TRUNG H.D., BAIMAI V. et Coll. - A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. *Insect. Mol. Biol.* 2001; **10** : 427-435.
- 61 - MANGUIN S., KENGNE P., SONNIER L. et Coll. - SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. *Med. Vet. Entomol.* 2001; (sous-presse).