

PROGRAMME PAL+

Développement d'une PCR (polymerase chain reaction) spécifique d'espèces du complexe *Anopheles nili* (Théobald) 1904 au Cameroun.

P. Kengne (1)*, H. P. Awono-Ambene (2), C. Antonio-Nkondjio (2) & D. Fontenille (1)

(1) Laboratoire de lutte contre les insectes nuisibles (LIN), Institut de recherche pour le développement (IRD), 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

*Tél.: 33 (0)4 67 04 32 24; fax: 3 (0)4 67 54 20 44; E-mail: kengne@mpl.ird.fr

(2) Lab. de l'Institut de recherche pour le développement (IRD), Organisation de coordination pour la lutte contre les grandes endémies en Afrique Centrale (OCEAC), Yaoundé, Cameroun.

Manuscrit n°Dk/81. 6ème congrès international francophone de médecine tropicale "Santé et urbanisation en Afrique" (Dakar, octobre 2001). Accepté 12 août 2002.

Summary: Development of a specific PCR (polymerase chain reaction) of species complex *Anopheles nili* (Théobald) 1904 in Cameroon.

The objective of this study was to develop new molecular tools for the identification of members of *An. nili* group, a malaria vector in Africa. Our strategy was based on the sequence analysis of portions of the rDNA. The ITS2 fragment of *An. nili* collected in Cameroon was sequenced and compared. The analysis of these sequences has revealed a great variability of ITS2 sequence. Three molecular forms: *An. nili* typical form, *An. nili* Oveng form and *An. carnevalei* were observed within the six morphological types. Specific primers were selected on ITS2 sequence to develop an allele-specific PCR giving 3 size bands. 169 specimens of *An. nili* collected in Cameroon were successfully tested. This method has been validated on specimens collected in others localities of tropical Africa. The multiplex PCR developed was very sensitive practical and applicable on large scale.

Résumé :

Des nouveaux outils moléculaires pour l'identification des espèces du groupe *An. nili* ont été développés. Ils sont basés sur l'analyse des séquences de différents fragments d'ADN ribosomique des membres de ce complexe. Le fragment ITS2 a montré une grande hétérogénéité de séquences. À partir de six types morphologiques, trois groupes génétiques ont été révélés: *An. nili* forme typique, *An. nili* forme Oveng et *An. carnevalei*. Des amorces nucléotidiques spécifiques de ces trois formes moléculaires ont été sélectionnées permettant l'identification par amplification spécifique d'allèle. La technique a été testée avec succès sur 169 *An. nili* en provenance du Cameroun et a été validée sur des spécimens de plusieurs localités de pays d'Afrique tropicale. La PCR multiplexe développée est très sensible, pratique et utilisable à grande échelle.

Anopheles nili
species complexe
malaria
ITS2
PCR

Anopheles nili
complexe d'espèces
paludisme
ITS2
PCR

Introduction

En Afrique au sud du Sahara, les paludismes humains sont transmis par trois vecteurs majeurs: deux espèces du complexe *Anopheles gambiae* (*Anopheles gambiae* s.s. et *Anopheles arabiensis*) et *Anopheles funestus* (9). Le long des cours d'eau, *Anopheles nili* s.l. peut également jouer un rôle prépondérant (4, 10). *An. nili* est un complexe d'espèces qui présente d'importantes différences morphologiques, biologiques, comportementales et de capacité vectorielle (7, 8). Sur la base des seuls critères morphologiques, trois espèces, *An. nili* (8), *An. somalicus* (16), *An. carnevalei* (3) et la "forme Congo", ont été décrites au sein de ce complexe. *An. somalicus* est morphologiquement identique à *An. nili* au stade adulte. Ces espèces peuvent se trouver en sympatrie.

L'identification précise des membres du complexe *An. nili* est souvent difficile, voire impossible, dans les conditions de ter-

rain, en raison de différences morphologiques mineures, rendues peu visibles lorsque les spécimens ont perdu des écailles suite à leur capture. De ce fait, la distribution de chaque forme et/ou espèce, ainsi que leur degré d'implication dans la transmission du paludisme, sont mal connus.

Depuis les années 1990, les outils génétiques et moléculaires ont permis le développement de techniques d'identification alternatives. La plupart d'entre elles ne sont cependant pas utilisables à une large échelle en raison des compétences techniques spécifiques qu'elles requièrent (cytotaxonomie), de contraintes strictes sur la conservation de spécimens capturés (isozymes), de la quantité importante de matériel nécessaire (restriction fragment length polymorphism) ou du manque de reproductibilité de résultats (random amplified polymorphic DNA). Pour pallier ces inconvénients, nous avons développé une PCR allèle spécifique (allele specific polymerase chain reaction, ASPCR) qui permet d'identifier les formes et espèces du complexe *An. nili* au Cameroun.

Matériel et méthodes

Zones d'étude

Les anophèles (n =164) ont été échantillonnés dans cinq villages du Cameroun: 4 en zones forestières, Afan-Esokie (2°20'N, 10°00'E), Mbebe (4°00'N, 11°02'E), Oveng (2°24'N, 10°22'E), Simbock (3°55'N, 11°30'E) et un en zone de savane arborée, Tibati (6°28'N, 12°37'E). Quinze spécimens du Burkina Faso, de Côte d'Ivoire et du Sénégal ont servi à tester la technique sur des échantillons hors Cameroun. Les stations de capture sont situées en bordure de cours d'eau permanents. Les sites de capture dans les autres pays sont localisés en zone de savane soudanienne.

Échantillons

Les anophèles ont été obtenus lors de séances de capture de femelles agressives pour l'homme, réalisées à l'intérieur et à l'extérieur des habitations, de 19 heures à 6 heures, entre mars et novembre 2000. Les spécimens du complexe *An. nili* ont été séparés des autres espèces à l'aide de critères morphologiques (8). La caractérisation à l'intérieur du complexe, basée sur la présence ou non de taches pâles sur les nervures et les franges alaires, a permis d'identifier 6 formes morphologiques au Cameroun: les formes *An. nili* typique et Congo décrites par GILLIES et DE MEILLON en 1968 (9), ainsi que les formes A, B et Oveng observées par notre équipe sur la base de critères non décrits dans la littérature, et *An. carnevalei* (3). Après leur détermination selon ces critères morphologiques, les spécimens ont été placés individuellement dans des tubes contenant du silicagel et conservés à -20°C.

Techniques moléculaires

Extraction d'ADN, amplification et séquençage de la région ITS2

L'ADN des moustiques a été extrait selon le protocole de CORNEL et COLLINS, publié en 1996 (6). La région ITS2 (internal transcribed spacer 2) de l'ADN ribosomique a été amplifiée par PCR avec les mêmes amorces consensus et les mêmes conditions d'amplification que celles utilisées pour les membres du complexe *An. punctulatus* et du complexe *An. funestus* (2, 12).

Après séparation des produits de PCR sur gel d'agarose, la taille des fragments amplifiés a été évaluée, les bandes issues de l'amplification d'ITS2 de chaque forme ont été photographiées et découpées sous ultraviolet. L'éluion de l'ADN a été réalisée avec le kit Qiaquick Gel Extraction de Qiagen (France) selon la procédure indiquée par le fabricant. Les produits d'amplification de cinquante spécimens (4 de chacune des formes A, B et Congo, 20 *An. nili* typique, 6 *An. nili* forme Oveng et 12 *An. carnevalei*) ont été séquencés. Les séquences obtenues ont été alignées et comparées grâce au programme Clustal (11) développé par Infobiogen.

PCR allèle spécifique du complexe

Une amorce universelle (ANU), définie dans une région conservée, commune à tous les spécimens séquencés, et trois amorces antisens ANT, ANO et ANC spécifiques respectivement d'*An. nili* typique, d'*An. nili* forme Oveng et d'*An. carnevalei* ont été déterminées. Les réactions PCR ont été réalisées en utilisant 0,4 µl de chaque matrice ADN. Le mélange réactionnel de 25 µl contenait 0,625 U de Taq DNA polymerase (Qiagen, France), 200 µl de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 20 picomoles de l'amorce ANU et 10 picomoles de chaque

amorce ANT, ANO et ANC. Les séquences des amorces ont été les suivantes:

22mer-Primer ANU: 5'GATGCACACATTCTTGAGTGCC3'
23mer-Primer ANO: 5'AGCACGGTCACCTACGGTTCTCC3'
23mer-Primer ANC: 5'CTGGTGGGGTTCTTCTCTCTCG3'
20mer-Primer ANT: 5'TGGCTGCTTCTCGTGGCGCG3'

Après une dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 minutes, les amplifications ont été faites aux températures de 94 °C, 30 secondes (dénaturation), 63 °C, 30 secondes (hybridation), et 72 °C, 1 minute (élongation) pendant 30 cycles, avec une extension finale à 72 °C pendant 10 minutes. Les produits amplifiés ont été visualisés et photographiés sous ultraviolet.

Résultats

Amplification

La taille du fragment amplifié grâce au couple d'amorces consensus a varié entre 475 pb et 550 pb selon l'espèce et la forme morphologique. Trois profils distincts ont été observés: le premier correspondant aux formes morphologiques A, B, Congo et *An. nili* typique, le second correspondant à la forme morphologique Oveng et le troisième correspondant à *An. carnevalei*.

Séquençage

Le séquençage d'ITS2 a permis de confirmer les trois profils déjà observés après amplification avec les amorces consensus. La comparaison des séquences a montré 99,9 % d'identité entre *An. nili* typique et les formes A, B et Congo. Cette identité de séquence n'a été que de 78,1 % entre *An. nili* typique et la forme Oveng, et de 76,4 % entre *An. nili* typique et *An. carnevalei*. Ces séquences ont été déposées dans la banque de données EMBL aux numéros d'accès suivants: AJ429048 pour *An. nili* typique, AJ429049 pour *An. nili* forme Oveng et AJ429050 pour *An. carnevalei*.

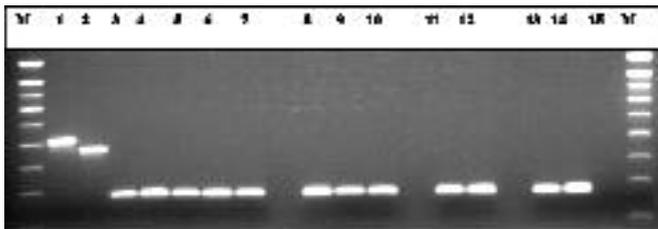
PCR allèle spécifique

Afin de pouvoir identifier *An. nili* typique, *An. nili* forme Oveng et *An. carnevalei* en une seule réaction PCR, les 4 amorces (ANU, ANT, ANO, ANC) ont été mélangées. Avec ce protocole, les spécimens d'*An. nili* typique, *An. nili* forme Oveng et *An. carnevalei* donne des bandes de taille 188 pb, 357 pb et 408 pb respectivement, correspondant aux tailles attendues par l'étude des séquences (fig. 1).

An. nili typique, *An. nili* forme Oveng et *An. carnevalei* ont été trouvés tous trois dans le sud du Cameroun. Cette PCR nous a permis de confirmer la présence d'*An. nili* typique au

Figure 1.

Migration sur gel d'agarose 2% des produits de la PCR allèle spécifique de spécimens du complexe *An. nili* suivie de la coloration au bromure d'éthidium. A photograph of 2% agarose gel of amplified products from a single PCR containing the universal primer and the three specific primers.



Ligne M: marqueur de poids moléculaire, ligne 1: *An. carnevalei* (408 pb), lignes 2: *An. nili* forme Oveng (357 pb) et lignes 3-7: *An. nili* forme typique (194 pb) du Cameroun; ligne 8-10; 11 et 12; 13 et 14: *An. nili* forme typique de Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Sénégal. Ligne 15: Témoin négatif sans ADN.

Burkina Faso, en Côte d'Ivoire et au Sénégal. Aucun hybride naturel n'a été identifié pour le moment. *An. somalicus* n'a pas encore été analysé, car aucun spécimen n'a été récolté lors de cette étude, mais des prospections larvaires sont en cours au Cameroun dans une zone où cette espèce avait été signalée par MOUCHET et GARIOU en 1961 (13).

Discussion

L'identification précise des anophèles est essentielle pour une meilleure connaissance de leur rôle dans la transmission du paludisme, de leur biologie et pour l'amélioration des stratégies de lutte antivectorielle. Dans le cas du complexe *An. nili*, les critères disponibles permettant de distinguer les espèces du complexe n'étaient, jusqu'à présent, que de type morphologique et laissaient place au doute. La nouvelle technique élaborée permet, en complément de la morphologie, de différencier et caractériser trois espèces de ce complexe dans les échantillons obtenus.

Notre stratégie a consisté à analyser les séquences de la région ITS2 de l'ADN ribosomique et à choisir des amorces spécifiques des différentes formes moléculaires. En effet, grâce à ses propriétés évolutives particulières (1), cette région du génome a été très utilisée en systématique chez un grand nombre d'organismes et en particulier chez les anophèles (5). Des PCR diagnostiques permettent ainsi d'identifier les différentes espèces au sein des complexes *An. gambiae* (6, 17), *An. maculipennis* (15) et *An. funestus* (12, 14).

La comparaison de séquences d'ITS2 des six formes morphologiques d'*An. nili* observées au Cameroun a révélé trois profils moléculaires distincts correspondant respectivement à *An. nili* forme typique, *An. nili* forme Oveng et *An. carnevalei*, tous trois vecteurs de *Plasmodium* humains. L'analyse d'autres marqueurs, notamment le domaine D3 du 28S d'ADNr et de 10 marqueurs RAPD (random amplified polymorphic DNA), a donné des résultats concordant avec le séquençage d'ITS2 (données non présentées). Les amorces choisies dans l'ITS2 ont été combinées dans une PCR multiplexe rendant cette méthode simple, sensible, robuste et utilisable à coût modéré dans tous les laboratoires possédant un équipement moléculaire de base.

La nouvelle méthode d'identification devrait permettre d'estimer plus précisément la répartition des différentes formes et espèces du complexe *An. nili* en Afrique et d'évaluer leur rôle précis dans la transmission du paludisme.

Remerciements

Nous remercions chaleureusement les personnes suivantes pour l'obtention de spécimens hors Cameroun qui ont permis de tester les amorces: I. DIA (IRD, Sénégal), A. DIABATE et T. BALDET (Centre Muraz, Burkina Faso), F. CHANDRE et A. M. ADJA (IPR, Côte d'Ivoire). Nous remercions le Programme Pal+ du Ministère français de la recherche qui a financé les travaux, incluant le salaire de

P. KENGNE, et TDR pour la bourse REG n° 990831 accordée à P. AWONO-AMBENE. Enfin, nous remercions F. SIMARD et les 2 évaluateurs pour leurs recommandations judicieuses.

Références bibliographiques

1. ARNHEIM N - Concerted Evolution of Multigene families. In: NEI M & KOEHM RK (Eds) - *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Associates inc, Massachusetts, USA, 1983, pp. 38-62.
2. BEEBE NW, ELLIS JT, COOPER RD & SAUL A - DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Mol Biol*, 1999, **8**, 381-390.
3. BRUNHES J, LE GOFF G & GEOFFROY B - Afro-tropical anopheline mosquitoes. III. Description of three new species: *Anopheles carnevalei* sp. nov., *An. hervyi* sp. nov., and *An. dua-laensis* sp. nov., and resurrection of *An. rageaui* Mattingly and Adam. *J Am Mosq Control Assoc*, 1999, **15**, 552-558.
4. CARNEVALE P, LE GOFF G, TOTO JC & ROBERT V - *Anopheles nili* as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon. *Med Vet Entomol*, 1992, **6**, 135-138.
5. COLLINS FH & PASKEWITZ SM - A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol*, 1996, **5**, 1-9.
6. CORNEL AJ & COLLINS FH - PCR of the ribosomal DNA intergenic spacer regions as a method for identifying mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Methods Mol Biol*, 1996, **50**, 321-332.
7. FONTENILLE D & LOCHOUARN L - The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia*, 1999, **41**, 267-271.
8. GILLIES MT & COETZEE M - *A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara*. THE SOUTH AFRICAN INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH (Eds), Johannesburg, 1987, pp. 1-143.
9. GILLIES MT & DE MEILLON B - *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region)*. THE SOUTH AFRICAN INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH (Eds), Johannesburg, 1968, pp. 1-343.
10. HAMON J & MOUCHET J - Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. *Méd Trop*, 1961, **221**, 643-660.
11. HIGGINS DG & SHARP PM - Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 1988, **15**, 237-244.
12. KOEKEMOER LL, WEETO MM, KAMAU L, HUNT RH & COETZEE M - A cocktail polymerase chain reaction (PCR) assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, **66**, 804-811.
13. MOUCHET J & GARIOU J - Répartition géographique et écologique des anophèles au Cameroun. *Bull Soc Pathol Exot*, 1961, **54**, 102-118.
14. MUKABAYIRE O, BOCCOLINI D, LOCHOUARN L, FONTENILLE D & BESANSKY NJ - Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol*, 1999, **8**, 289-297.
15. PROFT J, MAIER WA & KEMPEN H - Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol*, 1999, **85**, 837-843.
16. RIVOLA E & HOLSTEIN MH - Note sur une variété d'*Anopheles nili* Theo. *Bull Soc Pathol Exot*, 1957, **50**, 382-387.
17. SCOTT JA, BROGDON WG & COLLINS FH - Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, **49**, 520-529.