

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES MOUSTIQUES DU COMPLEXE *ANOPHELES GAMBIAE* À MAYOTTE ET À GRANDE COMORE

LÉONG POCK TSY J.M.*, ELISSA N.**, OULEDI A.***, ARIEY F.*, DUCHEMIN J.B.* & ROBERT V.*****

Summary: MOLECULAR CHARACTERISATION OF *ANOPHELES GAMBIAE* COMPLEX MOSQUITOES FROM MAYOTTE AND GRANDE COMORE

The mosquitoes of the *Anopheles gambiae* complex have been characterised at specific and sub-specific levels in two islands of the Comoros archipelago: the island of Mayotte (French departmental collectivity) and the island of Grande Comore (Comoros Union). Results are similar in the two islands and are presented together. The species *An. gambiae* s.s. was observed alone (determination performed on 149 specimens by PCR product of IGS of rDNA). The molecular form observed alone was S, and corresponds in this geographic area to the chromosomal form Savanna (determination performed on 123 specimens by another PCR product of IGS of rDNA). The haplotype IB was observed alone (determination performed on ten specimens, by sequencing the ITS of rDNA, with special attention at the position 871 of ITS), as previously observed by other authors in East Africa. Finally, in Mayotte and Grande Comore the *An. gambiae* complex is only composed by *An. gambiae* s.s. from the molecular form S/type IB.

KEY WORDS : Mayotte, Grande Comore, *Anopheles gambiae*, molecular form, ITS type IB.

Résumé :

Les moustiques du complexe *Anopheles gambiae* ont été caractérisés sur le plan spécifique et sub-spécifique dans deux îles de l'archipel des Comores : l'île de Mayotte (collectivité départementale française) et l'île de Grande Comore (Union des Comores). Les résultats sont semblables pour les deux îles et sont présentés groupés. Seule l'espèce *An. gambiae* s.s. a été observée (détermination sur 149 spécimens par PCR sur un amplicon d'IGS de l'ADNr). Seule la forme moléculaire S, assimilable dans cette zone géographique à la forme chromosomique Savane, a été observée (détermination sur 123 spécimens par PCR sur un autre amplicon de l'IGS de l'ADNr). Enfin, seul le sous-type IB, rencontré en Afrique de l'Est, a été trouvé (détermination sur dix spécimens, par séquençage d'une zone amplifiée de l'ITS de l'ADNr, et observation de la position 871). En conclusion, à Mayotte et à Grande Comore, le complexe *An. gambiae* comprend uniquement des *An. gambiae* s.s. de la forme moléculaire S/type IB.

MOTS CLÉS : Mayotte, Grande Comore, *Anopheles gambiae*, forme moléculaire, ITS type IB.

Le complexe *Anopheles gambiae* regroupe des espèces anophéliennes dont certaines sont bien connues pour présenter une capacité vectrice exceptionnellement élevée dans le domaine de la transmission du paludisme humain. On considère actuellement que le complexe *Anopheles gambiae* regroupe huit espèces. Les deux dernières en date proviennent de l'éclatement du taxon *An. gambiae* s.s., les deux formes moléculaires M et S correspondant chacune à une espèce (Wondji *et al.*, 2001). Ces deux formes moléculaires diffèrent par une portion d'ADN non codante, localisée sur le chromosome X, et située dans

l'IGS ("intergenic spacer") des séquences répétées d'ARN ribosomique (ADNr) (Della Torrè *et al.*, 2001). Ces deux formes moléculaires diffèrent également, dans la plupart des sites testés, par une portion d'ADN à proximité de la précédente sur le génome, également non codante, située dans les portions ITS1 et ITS2 ("internal transcribed spacer") du gène codant l'ADNr (Gentile *et al.*, 2001).

La présence d'au moins un représentant du complexe *An. gambiae* est certifiée dans chacune des quatre îles principales de l'archipel des Comores (Brunhes, 1978), que ce soit à Grande Comore, Anjouan, Mohéli (relevant de l'Union des Comores) ou à Mayotte (ayant le statut de Collectivité Départementale Française).

Selon Brunhes (1978), Mayotte et Grande Comore sont les deux îles de l'archipel dont la faune culicidienne est la mieux connue. Grande Comore possède la faune culicidienne la moins diversifiée, à l'inverse de Mayotte qui possède la plus variée.

À Grande Comore, le sol est formé de laves jeunes si perméables qu'aucun cours d'eau permanent ne dévale les pentes pourtant très arrosées du mont Kartala (2 361 m). Il n'existe pas non plus de marécage ou

* Groupe de recherche sur le paludisme, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, Antananarivo 101, Madagascar.

** DASS, Service de lutte antivectorielle, BP 104, 97600 Mamoudzou, Mayotte, France.

*** Projet Santé III/Comores/IDA/Banque Mondiale, BP 228 Moroni, Comores.

**** Institut de recherche pour le développement, UR 77 - Paludisme Afro-tropical.

Correspondance : Jean-Michel Léong Pock Tsy.
Tél. : 261 20 22 412 72 – Fax : 261 20 22 415 34.
E-mail : pocktsy@pasteur.mg

étang permanent qu'affectionnent de nombreuses espèces de moustiques. L'île de Mayotte est plus ancienne et ses sols sont décomposés et imperméables. Les torrents permanents y sont fréquents et pendant la saison des pluies, les plaines côtières se couvrent de flaques et de marécages.

Les gîtes larvaires d'*An. gambiae* s.l. à Grande Comore sont réalisés par l'homme et constitués par les citernes et les bassins cimentés, à ciel ouvert, pour le stockage de l'eau domestique. À Mayotte, les gîtes sont plus classiques, tels que les flaques temporaires, les prairies inondées, les trous de prélèvements de terre, les fossés mal drainés, les estuaires bouchés par une dune littorale.

An. gambiae s.l. a probablement été introduit à Grande Comore vers 1920, alors que sa présence dans les trois autres îles de l'archipel est plus ancienne (Brunhes, 1978; Julvez & Blanchy, 1988).

Sur la seule base de critères morphologiques ou d'une forte teneur en sel des gîtes larvaires, la présence d'*An. merus* a été rapportée à Grande Comore (Davidson, 1964; Grjebine, 1966). Cependant, ces critères étant soumis à de nombreuses exceptions, cette observation n'a pas été formellement établie. Chaque fois que des techniques absolument fiables ont été utilisées, seule la présence d'*An. gambiae* s.s. a été certifiée dans les trois îles principales de l'Union des Comores (Hunt & Coetzee, 1986; Sabatinelli *et al.*, 1988a et 1988b; Petrarca *et al.*, 1990). À notre connaissance, une telle détermination au niveau de l'espèce n'a jamais été réalisée à Mayotte.

Nous avons actualisé les connaissances sur le complexe *An. gambiae* à Mayotte et à Grande Comore, en précisant la détermination moléculaire à deux niveaux, spécifique et subspécifique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'échantillonnage à Mayotte a concerné des stades larvaires ou nymphal récoltés en janvier et avril 2002 (figure 1 et tableau I); les spécimens sont issus des émergences (109 femelles). Les spécimens de Grande Comore ont été collectés en mars 2001 au pyrèthre dans les maisons (sept femelles) et sur hommes volontaires (33 femelles). Chaque spécimen a été conservé individuellement dans des tubes TREFF de 1,5 ml contenant du silicagel et maintenu au laboratoire à -20°C .

L'extraction de l'ADN génomique a été faite en suivant le protocole de Cornel *et al.* (1987), modifié de la façon suivante. Les pattes ou les ailes ont été broyées individuellement avec un tampon de lyse (Tris 0,1M pH 9, NaCl 0,08M, EDTA 0,06M, Sucrose 0,16M, SDS 10%). Après incubation à 65°C pendant 30 mn, on a ajouté 13 μl d'acétate de Potassium 8M. La solution a ensuite été placée à 0°C pendant 30 mn. Après centrifugation à 14000 tr/mn pendant 15 mn, le surnageant a été placé dans 200 μl d'éthanol absolu. Après centrifugation, on a retiré le surnageant et on a lavé le culot d'ADN avec 100 μl d'éthanol 70%. Après séchage, l'ADN a été suspendu avec 100 μl d'eau distillée sté-

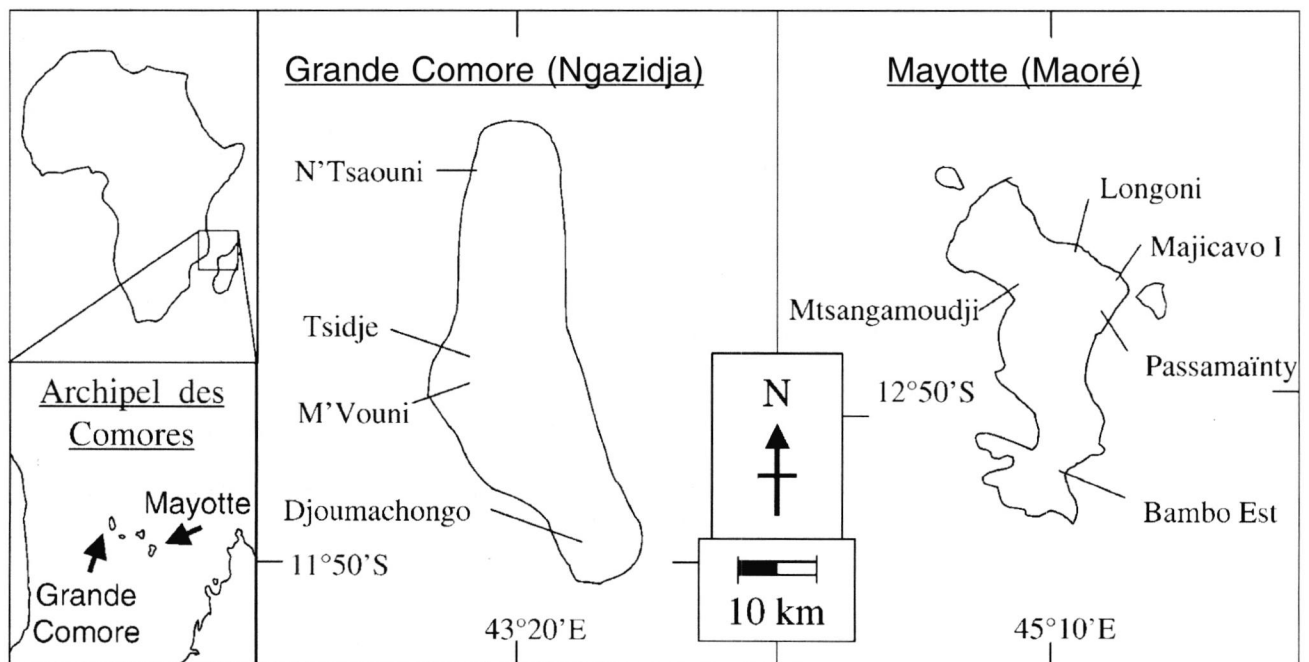


Fig 1. – Localisation de l'archipel des Comores avec mention des localités citées dans le texte pour les îles de Grande Comore et Mayotte.

Île	Localité	Date collecte	Effectif testé PCR <i>gambiae</i> *	Effectif testé M vs S**	Effectif séquencé ITS ADNr***
Mayotte	Majicavo I	22 janvier 2002	1	1	1
	Passamaïnty	10 avril 2002	26	20	1
	Bambo Est	9 avril 2002	20	20	1
	Mtsamgamouji Lambiqua	17 avril 2002	30	10	1
	Mtsamgamouji Embato	17 avril 2002	12	12	1
	Longoni	16 avril 2003	20	20	1
Grande Comore	Tsidje	15 au 17 mars 2001	18	18	1
	Djoumachongo	20 au 22 mars 2001	7	7	1
	N'Tsaouni	24 au 26 mars 2001	7	7	2
	M'Vouni	26 au 28 mars 2001	8	8	1
Total			149	123	10

* PCR *gambiae* = détermination par PCR de l'espèce du complexe *An. gambiae*.

** PCR M vs S = détermination par PCR de la forme moléculaire M ou S.

*** séquençage de l'espace intergénique de l'ADN ribosomique.

Tableau I. – Site de capture des larves d'*An. gambiae* s.l. à Mayotte et Grande Comore et effectifs testés.

rile et mis à + 4° C pendant une nuit. Cet extrait a ensuite été conservé à – 20° C.

Le diagnostic d'espèces a été réalisé selon le protocole de Scott *et al.* (1993). On a utilisé quatre amorces de 20 nucléotides, issus de séquences des gènes ribosomiques (IGS de l'ADNr localisé dans l'hétérochromatine du chromosome X) spécifiques des espèces *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. merus*.

La détermination des formes moléculaires a été faite selon le protocole de Favia *et al.* (2001). Quatre amorces, correspondant à des séquences des gènes ribosomiques (IGS de l'ADNr), ont été utilisées : R5, R3, Mopint, B/Sint (séquence et concentration des amorces, ainsi que programme d'amplification in Favia *et al.*, 2001).

Le séquençage a été fait en utilisant les sondes et la méthode de Gentile *et al.* (2001). Le séquençage du gène ITS de l'ADNr, dans l'hétérochromatine du chromosome X, (\pm 900 PB) a été réalisé avec un séquenceur 3730XL de chez Applied Biosystems (96 capillaires) en utilisant un kit Big Dye Terminator version 3.3.1.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La détermination de l'espèce, la détermination de la forme moléculaire, et le séquençage portent respectivement sur 149, 123 et 10 moustiques femelles (tableau I). Tout ce travail, sans exception, a fourni des résultats exploitables.

La seule espèce échantillonnée est *Anopheles gambiae* s.s. La seule forme moléculaire échantillonnée est la forme S (telle que définie par Della Torre *et al.*, 2001), assimilable (en Afrique de l'Est et dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien) à la forme chromosomique Savane. Les séquences de l'ITS de l'ADNr sont homogènes pour tous les spécimens étudiés (cinq de la Grande Comore et cinq de Mayotte) et caractéristique

du type I. On a observé uniquement la base G en position 847 (selon la nomenclature de Gentile *et al.* (2002), qui correspond à la position 871 selon le code de séquence de Gentile *et al.* (2001) (accès GenBank X67157), qui correspond lui-même à la position 891 selon Paskewitz *et al.*, 1993) ; la présence de cette base à cette position définit le sous-type IB.

La détermination de tous nos moustiques échantillonnés comme appartenant à l'espèce *An. gambiae* s.s. de la forme moléculaire S : type IB dans l'archipel des Comores constitue, à notre connaissance, la première mention des niveaux spécifique et subsppécifique à Mayotte, et du niveau subsppécifique à Grande Comore. Nos observations confirment par une méthode moléculaire les déterminations indiquant l'espèce *An. gambiae* et la forme chromosomique Savane, précédemment effectuées par la méthode cytogénétique dans l'Union des Comores (Petarca *et al.*, 1990).

De part sa position géographique, l'Archipel des Comores est à peu près à égale distance du continent africain (300 à 450 km) et de Madagascar. Il n'est pas surprenant d'observer la forme moléculaire S/type IB, déjà observée en Tanzanie (Gentile *et al.*, 2001) et à Madagascar (Léong Pock Tsy *et al.*, data non publiées). De façon plus spéculative, des déplacements de moustiques liés au vent, sont envisageables sans intervention humaine. Mais il semble plus probable, pour un moustique aussi lié à l'homme qu'*An. gambiae*, à la suite de Julvez & Mouchet (1994), d'envisager un rôle de l'homme dans sa dissémination parmi les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien.

REMERCIEMENTS

L'assistance technique de Monsieur Jean-Claude Rakotoniaina a grandement été appréciée. Frédéric Simard est remercié pour sa lecture critique

d'une version précédente du manuscrit. Ce travail a bénéficié d'un financement du Ministère français de la jeunesse, de l'éducation et de la recherche, à travers le programme Pal⁺ et le réseau anophèles d'Afrique.

REFERENCES

- BRUNHES J. Les insectes hématophages de l'archipel des Comores (Diptera Culicidae, Ceratopoginidae, Simuliidae, Tabanidae, Hippoboscidae et Muscidae Stomoxyinae; Hemiptera Cimicidae), maladies transmises et méthodes de lutte. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, série A Zoologie*, 1978, 109, 193-246.
- DAVIDSON G. The five mating types in the *Anopheles gambiae* complexe. *Rivista di Malariologia*, 1964, 43, 167-183.
- DELLA TORRÉ A., FANELLO C., AKOGBETO M., DOSSOU-YOVO J., FAVIA G., PETRARCA V. & COLUZZI M. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology*, 2001, 10, 9-18.
- FAVIA G., LANFRANCOTTI A., SPANOS L., SINDÉN-KIAMOS & LOUIS C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 2001, 10, 19-23.
- GENTILE G., DELLA TORRÉ A., MAEGGA B., POWELL J.R. & CACCONE A. Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the problem of taxonomic status. *Genetics*, 2002, 161, 1561-1578.
- GENTILE G., SLOTMAN M., KETMAIER V., POWELL J.R. & CACCONE A. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 2001, 10, 25-32.
- GRJEBINE A. Insectes Diptères Culicidae Anophaelinae. *Faune de Madagascar*, 1966, 22, 487 p. Paris : ORSTOM CNRS.
- HUNT R.H. & COETZEE M. Chromosomal and electrophoretic identification of a sample of *Anopheles gambiae* group (Diptera: Culicidae) from the island of Grand Comoros, Indian Ocean. *Journal of Medical Entomology*, 1986, 23, 655-660.
- JULVEZ J. & BLANCHY S. Le paludisme dans les îles de l'archipel des Comores. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1988, 81, 847-853.
- JULVEZ J. & MOUCHET J. Le peuplement culicidien des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien : l'action de l'homme dans l'importation des espèces d'intérêt médical. *Annales de la Société Entomologique de France*, 1994, 30, 391-401.
- PASKEVITZ S.M., WESSON D.M. & COLLINS F.H. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Molecular Biology*, 1993, 2, 247-257.
- PETRARCA V., SABATINELLI G., DI DECO M.A. & PAPAKEY M. The *Anopheles gambiae* complex in the Federal Islamic Republic of Comoros (Indian Ocean): some cytogenetic and biometric data. *Parassitologia*, 1990, 32, 371-380.
- SABATINELLI G., PETRARCA V. & BAGALINO S. Notes sur les vecteurs de paludisme et de filariose de Bancroft dans les îles de la Grande Comore et de Mohéli (RFI des Comores). *Parassitologia*, 1988a, 30 (suppl. 1), 176-177.
- SABATINELLI G., PETRARCA V. & PETRANGELI G. Données préliminaires sur le complexe *Anopheles gambiae* dans la République Fédérale Islamique des Comores. *Parassitologia*, 1988b, 30 (suppl. 1), 178-179.
- SCOTT J.A., BROGDON W.G. & COLLINS F.H. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993, 49, 520-529.
- WONDJI C., SIMARD F. & FONTENILLE D. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Molecular Biology*, 2002, 11, 11-19.

Reçu le 24 avril 2003

Accepté le 4 juin 2003