

Laure SONNIER
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier

**TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE
(RAPD-PCR, PCR Allèle Spécifique)
APPLIQUEES A LA CARACTERISATION D'UN VECTEUR
DU PALUDISME EN ASIE DU SUD-EST, *ANOPHELES DIRUS***

Stage Ingénieur
Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles
IRD Montpellier
Juillet- Août 1999

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur Jean Marc HOUGARD pour m'avoir accueillie au laboratoire LIN et m'avoir permis de réaliser ce stage.

J'adresse également un merci tout particulier à Madame Sylvie MANGUIN pour son encadrement et ses conseils, ainsi qu'à Monsieur Pierre KENGNE pour sa confiance, et la gentillesse avec laquelle il a su me faire partager ses connaissances.

Je suis très reconnaissante envers tous les membres du laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles de l'IRD pour la chaleur de leur accueil et leur soutien.



22 AVR. 2002

Ø52
ANOPALØ1
SON

MF



010059181

SOMMAIRE

PRESENTATION DE L'IRD

- 1/ De l'ORSTOM à l'IRD
- 2/ L'IRD à Montpellier

GENERALITES

A/ LE PALUDISME

- 1/ Introduction
- 2/ L'agent pathogène : *le Plasmodium*
- 3/ Cycle et biologie des *Plasmodiums*
 - 3.1/ Le cycle chez l'homme
 - 3.2/ Le cycle chez le moustique
- 4/ Le paludisme en chiffres
- 5/ Les moyens de lutte contre le paludisme
 - 5.1/ Lutte contre le parasite
 - 5.2/ Lutte contre le vecteur

B/ L'ANOPHELE : UN VECTEUR MAJEUR DU PALUDISME

- 1/ Introduction
- 2/ Critères de définition d'un vecteur
- 3/ Les principales espèces vectrices
- 4/ Cycle biologique de développement de l'anophèle
- 5/ Les techniques de lutte anti vecteur

C/ METHODES D'IDENTIFICATION DES ANOPHELES

- 1/ Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction)
- 2/ les différentes méthodes moléculaires
- 3/ La technique RAPD-PCR. (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR)
 - 3.1/ Introduction
 - 3.2/ Principe
 - 3.3/ Propriétés des marqueurs RAPD
 - 3.4/ Utilisation de la RAPD-PCR
- 4/ La technique ASPCR (Allele Specific- PCR)
 - 4.1/ Principe
 - 4.2/ Les amorces ASPCR

D/ OBJECTIFS DU TRAVAIL

MATERIEL ET METHODES

A/ MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE

- 1/ Echantillons utilisés
 - 1.1/ Les spécimens de Thaïlande
 - 1.2/ Les spécimens du Vietnam
- 2/ Préparation des échantillons d'ADN
- 3/ Méthodes de dosage d'ADN extrait

B/ METHODES

- 1/ La technique RAPD-PCR
 - 1.1/ Les différentes amorces testées
 - 1.2/ Protocole RAPD-PCR
 - Les réactifs
 - Quantité Nécessaire
 - Manipulation
 - Cycle d'amplification
- 2/ La technique ASPCR
 - 2.1/ Le complexe *An.dirus* en Asie du Sud-Est
 - 2.2/ Analyse de la Séquence du gène ITS2
 - 2.3/ Les amorces ASPCR
 - 2.4/ Protocole ASPCR
 - Les réactifs
 - Quantité Nécessaire
 - Manipulation
 - Cycle d'amplification
- 3/ Analyse des produits PCR sur gel d'agarose
- 4/ Transfert des produits d'amplification RAPD

RESULTATS ET DISCUSSION

- 1/ Dosage de l'ADN extrait
 - 1.1/ Spectrophotométrie
 - 1.2/ Électrophorèse sur gel d'agarose

2/ Résultats RAPD

2.1/ Les amorces testées sur les échantillons de référence

2.2/ Résultats amplification et homogénéité des profils

2.3/ Sélection des amorces discriminantes

a/ Résultat amorce F8

b/ Résultat amorce F6

c/ Résultat amorce A5

d/ Résultat amorce P14

2.4/ Différentiation des familles *d'An.dirus* par RAPD-PCR

a/ Amorce F8

b/ Amorce F6

c/ Amorce A5 et amorce P14

2.5/ Conclusion RAPD

3/ Résultats ASPCR

3.1/ ASPCR sur les échantillons testés en RAPD

a/ Collection 3C

b/ Collection IMPE

c/ Echantillons ES, EP, ET

3.2/ ASPCR sur de nouveaux échantillons

3.3/ Problème courants rencontrés avec l'ASPCR, solutions

3.4/ Conclusion ASPCR

4/ Comparaison ASPCR et RAPD

CONCLUSION GENERALE

Bibliographie

Annexe

PRESENTATION DE L'IRD

AU COMMENCEMENT L'ORSC

C'est en 1943, par la loi du 11 octobre qu'est créé l'Office de la recherche scientifique coloniale (ORSC). Placé sous l'autorité du secrétaire d'Etat à la Marine et aux Colonies et présidé par le directeur du CNRS, l'Orsc avait pour objet d'orienter, coordonner et contrôler les recherches scientifiques dans les territoires relevant du secrétariat d'Etat. A la Libération, l'ordonnance du 22 novembre 1944

reconfirme les objectifs

un corps de chercheurs prêts à

formation scientifique de

monde tropical, mettre en

recherche polyvalents

colonies françaises, en

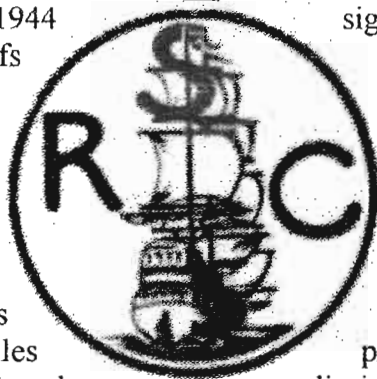
équatoriale française, à

Pacifique. Dès 1946, sans

structures scientifiques, les

l'Office et appartenant à des

disciplines fort diverses (entomologie, botanique, phytopathologie, pédologie, hydrologie, sociologie, géographie) partirent sur le terrain pour accomplir leurs missions d'exploration et de mise en valeur de ces terres tropicales demeurées jusqu'alors souvent vierges de toute investigation scientifique.



signée par Charles de Gaulle,

premiers de l'Office : constituer

travailler outre-mer, créer une

haut niveau spécialisée dans le

place un réseau de centres de

capables de rayonner sur les

Afrique occidentale et

Madagascar et dans l'océan

attendre la mise en place de ces

premiers chercheurs recrutés par

disciplines fort diverses (entomologie,

L'ORSTOM AUTREFOIS

De 1949 à 1953, l'Office changea deux fois d'appellation: l'Orsc se mua tout d'abord en Orsom (Office de la recherche scientifique outre-mer), puis en Orstom (Office de recherche scientifique et technique outre-mer) à la suite du décret du 17 novembre 1953 qui rattachait directement l'Office au ministère de la France d'outre-mer, nouvellement créé, et étendait ses compétences aux départements d'outre-mer, aux Etats associés, aux protectorats, enfin l'autorisait à apporter son concours sous forme d'assistance technique aux pays étrangers et aux organisations internationales. En 1957, à la veille des indépendances, l'Orstom avait ainsi la responsabilité de l'ensemble de la recherche scientifique (soit une quinzaine de disciplines scientifiques, exception faite de l'agronomie appliquée) dans la France d'outre-mer, bénéficiait d'un corps scientifique de trois cent cinquante chercheurs pour l'essentiel formés au sein de l'Office et disposait d'une quinzaine de centres de recherche et de formation, successivement ouverts à Bondy en métropole, en Afrique de l'Ouest et du Centre, en Guyane, en Nouvelle Calédonie, en Polynésie Française et à Madagascar.

En 1958, l'adoption de la nouvelle constitution de la République française entraîna la disparition du ministère de la France d'outre-mer, sous la tutelle duquel se trouvait l'Orstom depuis 1953, et deux ans plus tard, les colonies françaises d'Afrique et de Madagascar obtinrent leur indépendance. Dans ce contexte de profonds bouleversements institutionnels et géopolitiques, l'Office fut placé par décret (9 août 1960) sous la tutelle conjointe du ministère

de l'Education Nationale et du Secrétariat d'Etat aux Relations avec les Etats de la Communauté. Renforçant ses liens avec les milieux scientifiques et universitaires français et étendant son champ d'intervention à l'ensemble des nations situées hors des régions tempérées, cette réforme conféra à l'Office une responsabilité de porte-parole et de catalyseur de la recherche française dans l'ensemble de la zone tropicale, en Afrique mais également en Asie et en Amérique latine.

Par ailleurs, si la décolonisation ne modifia pas la nature des activités de l'Office, qui dès lors poursuivit ses programmes scientifiques dans le cadre d'accords de coopération passés avec les nouveaux Etats, le décret d'août 1960 en réorienta les finalités, lui assignant la nouvelle vocation d'entreprendre des recherches fondamentales en vue du développement des pays tropicaux, une vocation qui se substitua aux objectifs de mise en valeur des colonies et à la « mission civilisatrice » prônés à l'origine par les tenants de la science coloniale.

Prémisse de la politique de coopération scientifique et technique avec les pays du tiers-monde qui sera mise en œuvre au cours des décennies suivantes et s'affirmera en 1982, cet objectif d'aide au développement fut réaffirmé en 1964 dans le cadre d'une réorganisation de l'Office. Celle-ci institua seize comités techniques correspondant à autant de disciplines scientifiques et au sein desquels allaient désormais être définis les programmes de recherche. Au-delà de leur grande diversité, les activités de l'Orstom s'ordonnaient désormais autour de trois principes majeurs : entreprendre des recherches fondamentales orientées vers la connaissance des milieux naturels et l'utilisation de leurs ressources ; développer un réseau scientifique permettant la conduite de ces recherches ; participer à la formation d'un personnel spécialisé en matière de recherche hors des régions tempérées. L'Orstom a participé par la suite, en collaboration avec d'autres instituts de recherche, à la mise en place d'un réseau de documentation et d'information scientifique et technique répertoriant les différents travaux publiés par les chercheurs: rapports internes, ouvrages ou articles édités, communications a des colloques...Parallèlement, s'esquissait une politique d'édition avec la publication de revues et de collections d'ouvrages destinés a la communauté scientifique nationale et internationale.

L'IRD ACTUELLEMENT

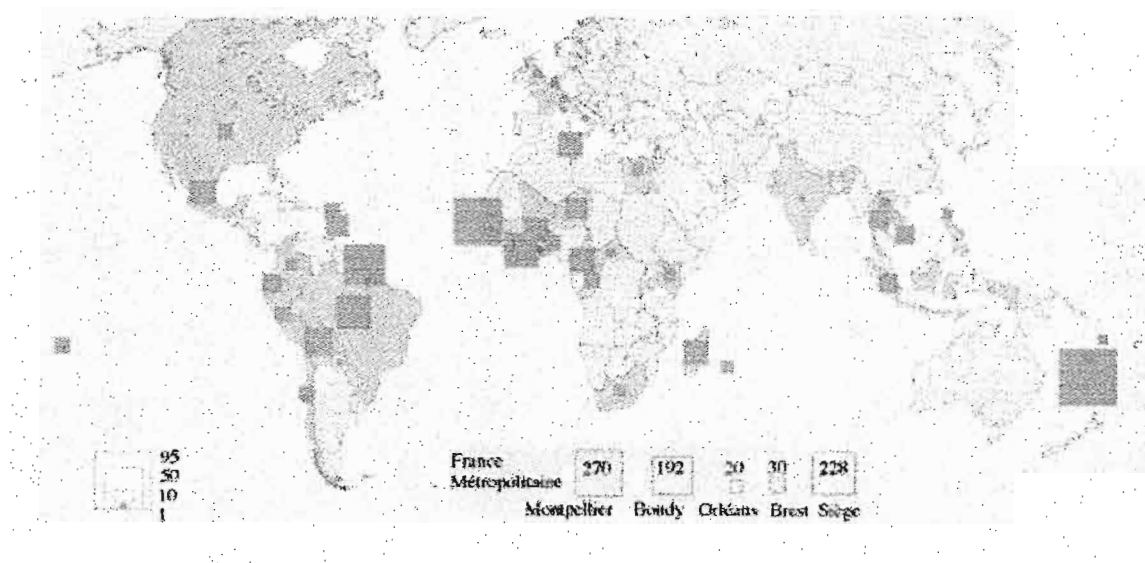
L'ORSTOM est devenu depuis Janvier 1999 l'IRD, ***l'Institut de recherche pour le développement***. C'est un établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST) placé sous la double tutelle des ministères chargés de la recherche et des affaires étrangères.

- *Un budget de 1,1 milliard de francs*
- *Un effectif de 2500 agents dont 800 chercheurs, 750 ingénieurs, techniciens et administratifs et des personnels locaux.*

L'IRD remplit 3 missions fondamentales : *la recherche, l'expertise et la formation*. Pour se faire, l'IRD conduit des programmes scientifiques centrés sur les relations entre l'homme et son environnement.

UN DISPOSITIF DE RECHERCHE EN FRANCE ET A L'ETRANGER

L'IRD conduit des activités de recherche finalisées vers le développement dans une trentaine de pays des régions chaudes de la planète : en Afrique, en Amérique latine, dans le Pacifique et, plus récemment, en Asie tropicale, ainsi que dans les Dom-Tom. Il dispose pour se faire de 36 implantations dont 5 en France métropolitaine (Paris, Bondy, Montpellier, Brest, et Orléans) cinq dans les collectivités territoriales d'outre-mer (Guyane, Nouvelle-Calédonie, Polynésie Française, Martinique, La Réunion) et dans 26 pays situés essentiellement dans la zone tropicale.



- répartition des effectifs de l'IRD dans le monde au 31 Décembre 1999 -

UNE RECHERCHE EN COLLABORATION

L'IRD mène des recherches en liaison avec les institutions d'enseignement supérieur et de recherches françaises et avec ses partenaires du Sud. 40 % de ses agents travaillent hors métropole, 600 de ses techniciens sont originaires du Sud et ses programmes de recherche associent directement des chercheurs étrangers.

L'IRD est engagé dans une centaine d'opérations soutenues par l'Union Européenne et participe à de nombreux programmes scientifiques internationaux.

**LES ACTIVITES SCIENTIFIQUES DE L'IRD S'ORGANISENT EN CINQ
DEPARTEMENTS**

- Le département Milieux et Environnement développe des recherches sur la variabilité climatique tropicale, les interactions entre l'océan et l'atmosphère, les milieux littoraux et terrestres (*sols, couverture végétale*) et les ressources en eau, les risques naturels (*éruptions, séisme, inondations...*), les ressources minérales et les impacts des activités humaines sur l'environnement.
- Le département Ressources Vivantes se consacre à l'étude de la biodiversité, des écosystèmes aquatiques (*marins, littoraux, continentaux*) et des agrosystèmes tropicaux (*amélioration génétique, défense des plantes cultivées, biotechnologies...*) afin d'assurer la viabilité de leur exploitation par une gestion appropriée.
- Le département Sociétés et Santé conduit des programmes de recherche sur la santé, (*paludisme, sida et autres maladies parasitaires et virales, malnutrition, santé publique*), sur les questions urbaines, les dimensions économiques, sociales et culturelles du développement et sur l'état des sciences en Afrique.
- Le département Expertise et Valorisation réalise des expertises collégiales à vocation opérationnelle et valorise le savoir-faire de l'IRD vers les organismes publics et privés, français et internationaux.
- Le département Soutien et Formation des communautés scientifiques du Sud à pour mission de contribuer au renforcement de leur capacité de recherche, notamment des jeunes équipes, et à leur meilleure insertion à un niveau international.

B/ L'IRD A MONTPELLIER

L'IRD dispose à Montpellier de sa principale base scientifique en France. Programmé en 1983 dans le cadre de la décentralisation et inscrit dans le premier contrat de plan État-Région, le Centre de Montpellier, ouvert en 1988, a connu une croissance rapide du nombre de ses effectifs propres (de moins de 100 à plus de 300) et des stagiaires accueillis.

Dans le même temps, le Centre a organisé ses principales fonctions : point d'appui scientifique pour les équipes et les programmes outre-mer, base logistique regroupant les équipements lourds, lieu d'accueil pour la formation à la recherche, centre de mémoire et de référence internationale, carrefour d'échanges et de rencontres...

Les collaborations avec la communauté scientifique régionale s'organisent à travers de multiples relations institutionnelles : partenariat d'Agropolis, laboratoires communs ou mixtes, réseaux et groupes thématiques, échanges de chercheurs ou d'équipes, formations doctorantes...

Par son double réseau de relations avec les établissements régionaux et avec les partenaires scientifiques du sud, l'IRD contribue largement à l'ouverture internationale de la recherche languedocienne.

L'IRD DE MONTPELLIER EN QUELQUES CHIFFRES

- 1 centre principal (9000 m²) dont 1500 m² de serres tropicalisées
- 5 implantations dans le campus de Lavalette
- 21 laboratoires
 - dont 2 unité mixte CNRS
 - dont 1 laboratoire commun avec le Cirad
 - dont 3 laboratoires collaborateur ou de référence OMS/WHO
 - dont 7 laboratoires inter-organisme
- 5 unités techniques et
- 1 service d'administration et de gestion
- 370 chercheurs, ingénieurs, techniciens, administratifs dont 14 chercheurs d'autres organismes en accueil
- 110 étudiants en formation à la recherche (DEA et thèse) pour un flux annuel de 260
- 22 formations doctorales en accueil
 - dont 10 régionales (4 universités, 2 écoles d'ingénieurs)
- 134MF de budget consolidé

L'IRD EN LANGUEDOC-ROUSSILLON ET SES PARTENAIRES

THEMES	UM I INSERM	UM II	CNRS	INRA ENSAM	CIRAD	CEMAGREF ENGREF	IFREMER	<i>projet</i>
Sciences de l'eau								Gerffeu-MSE
Haliéutique								Pôle mer lagune
Aquaculture								Prog. Gamet
Téledétection								Maison Télédét.
Biologie populatio								IFR-CBGP
Phyto-virologie								Labo. LPRC
Nutrition								Isna
Parasitologie								IFR
Rétrovirus								Pôle Sida
Génétique tropicale								UR-9926

Partenaires locaux :

- Université de Montpellier I (UM I)
- Université de Montpellier II (UM II)

Partenaires nationaux :

- CNRS (Centre Nationale de Recherche Scientifique)
- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)
- CIRAD (Centre Institutionnel de Recherche Agronomique pour le Développement)
- CEMAGREF ()
- IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer)
- INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)

LES CHAMPS DE RECHERCHE DE L'INSTITUT A MONTPELLIER

Variabilité climatique tropicale et impacts régionaux

Approche géodynamique des ressources minérales et des risques naturels

Dynamique et usages des ressources en eau

Dynamique et usages des milieux terrestres

Dynamique et usages des milieux aquatiques, marins, littoraux et continentaux

Bases biologiques de la valorisation agricole et agro-industrielle de la biodiversité

Santé et politique de développement

Questions urbaines et politiques de développement

Développement social et économique

GENERALITES

A/ LE PALUDISME

1/ Introduction : Qu'est ce que le paludisme ?

Le paludisme (du latin *pattes*, marais) est provoqué par un parasite hématozoaire des globules rouges du sang du genre *Plasmodium*. Ce parasite est transmis du sujet malade au sujet sain par l'intermédiaire de moustique du genre *Anophèle* ; il subit dans l'organisme du malade comme dans le corps du moustique un certain nombre de transformations obligatoires, de métamorphoses qui constituent son cycle évolutif.

Le paludisme se traduit essentiellement par des crises, c'est à dire des accès fébriles violents et de courte durée se succédant en général selon un rythme régulier ainsi que des sueurs, des frissons et des courbatures, s'accompagnant d'une augmentation du volume de la rate (splénomégalie) et d'une destruction intense des globules rouges (anémie). La maladie a une tendance spontanée aux rechutes.

Le paludisme est une maladie liée à la pauvreté. Il arrive souvent que les populations pauvres soient marginalisées et reléguées à proximité de terres dégradées, vivant dans des conditions favorables à la reproduction des moustiques. Ces populations ne disposent pas de moyens tels que les moustiquaires pour se protéger et n'ont ni l'éducation, ni les ressources leurs permettant d'avoir accès à des soins adéquats. Cependant en Afrique les risques de contamination touchent toutes les couches de la population, et si les moustiquaires protègent efficacement, il existe des moustiques qui piquent à l'extérieur avant que la population aille dormir.

2/ L'agent pathogène : le plasmodium

Le paludisme est provoqué par des protozoaires intracellulaires du genre *Plasmodium*. Il existe quatre espèces plasmodiales parasites de l'homme :

- *P. vivax*
- *P. falciparum*
- *P. malariae*
- *P. ovale*

Seul *P. falciparum* est responsable des formes encéphaliques potentiellement mortelles du paludisme. Classiquement *P. falciparum* provoque la fièvre tierce maligne, *P. ovale* et *P. vivax* provoquent la fièvre tierce bénigne, enfin *P. malariae* provoque la fièvre quarte. Les plasmodiums humains sont d'origine africaine et ont coévolué avec les préhominiens puis les hommes plusieurs milliers d'années, ainsi qu'avec le vecteur particulièrement bien adapté. Il faut noter que *P. malariae* se retrouve chez l'homme et le chimpanzé, que *P. falciparum* est très voisin de *P. reichenovi* du chimpanzé, et que *P. vivax* est proche de *P. schewtzi* parasite du chimpanzé et des gorilles. Les espèces *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale*, sont les mieux tolérés par l'homme, l'organisme humain s'y est adapté au cours des siècles, les parasites peuvent survivre très longtemps dans l'organisme et les crises qu'ils provoquent ne sont généralement pas mortelles. Au contraire *P. falciparum* est très mal toléré, le parasite survit rarement plus de 2 mois dans l'organisme et il est responsable de la plupart des décès causés par le paludisme.

3/ Cycle et biologie des plasmodiums

- Lors du cycle du paludisme, la multiplication des plasmodies est asexuée ou schizogonique chez l'homme et sexuée ou sporogonique chez le moustique vecteur, l'anophèle femelle. Au cours de leur cycle biologique, les plasmodies changent sans cesse d'aspect, de taille, par suite de l'alternance de phases de croissance et des phases de divisions (nucléaire et cytoplasmique).

Différentes étapes du cycle des plasmodies

	ETAPE ANOPHELIENNE	ETAPE HUMAINE	
Stade du cycle	Cycle sexué (sporogonie)	Cycle asexué (schizogonie)	Amorce du cycle sexué (gamétocytogénèse)
Lieu de déroulement	Estomac Glandes salivaires	Hépatique Erythrocytaire	Erythrocytaire

• 3.1/ Le cycle chez l'homme

Au cours de la piqûre, l'anophèle infesté injecte à l'homme, avec sa salive et dans un vaisseau sanguin la quasi-totalité de ses sporozoïtes. Ces derniers restent dans la circulation sanguine environ une demi-heure et gagnent rapidement le foie

La phase hépatique

Après sa pénétration dans l'hépatocyte, le sporozoïte s'arrondit et se transforme en un schizonte hépatique de plusieurs milliers de cellules uninuclées appelées mérozoïtes. Ensuite on observe une évolution immédiate ou retardée de ce schizonte.

Evolution immédiate

Le schizonte immature se divise, formant entre six et seize jours un schizonte mature, volumineuse cellule 'plasmodiale' contenant quelques milliers de cellules, déformant l'hépatocyte hôte et repoussant son ou ses noyaux en périphérie. A maturité le schizonte hépatique ou corps bleu éclate, libérant des mérozoïtes qui iront infecter les hématies (début de la phase érythrocytaire). Dans les infections dues à *P.falciparum* et *P.malariae*, les schizontes éclatent en même temps et aucun ne persiste dans le foie.

Evolution retardée

En ce qui concerne les espèces *P.vivax* et *P.ovale*, certains schizontes hépatiques grossissent légèrement mais restent sous forme uninucléé. Ces formes dormantes appelées hypnozoïtes, seront activées à des époques différentes, donnant lieu à une schizogonie hépatique 'classique' qui est à l'origine des rechutes. Ces rechutes à

distance avec des accès de fièvre peuvent survenir plusieurs mois voir plusieurs années après.

La phase sanguine

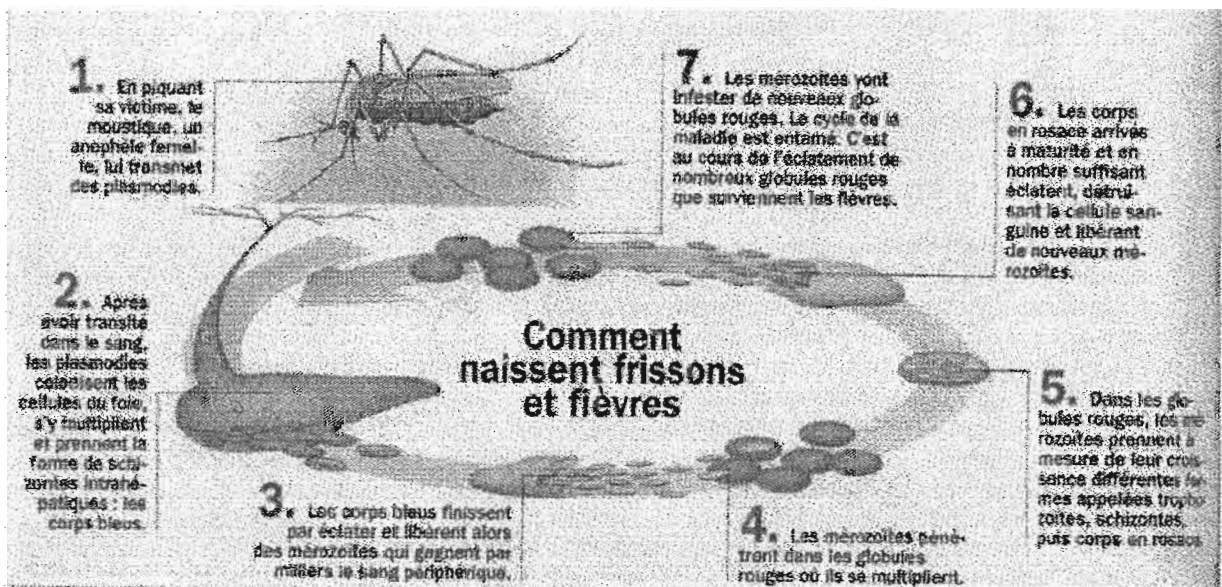
Dans le sang, chaque mérozoïte pénètre dans une hématie, cette pénétration est active et se fait en 3 étapes non détaillées ici.

Le mérozoïte se déplace ensuite vers le centre du globule rouge, où il se transforme en une forme en anneau le trophozoïte qui est caractéristique de chaque espèce de plasmodium. Il y grossit se transformant en schizonte, dégradant l'hémoglobine ce qui peut engendrer l'apparition de granulations de Schüffner. L'hématie finit par éclater et dans le sang sont libérés des mérozoïtes qui envahissent d'autres globules rouges ou qui se différencient en gamétocytes. Ainsi s'amorce le cycle sexué ou sporogonique. Les gamétocytes mâles et femelles apparaissent au bout de quelques cycles. Et c'est dans le moustique lors d'un repas de sang sur un paludéen que se poursuit le cycle.

• 3.2/ Le cycle chez le moustique

Le cycle sexué s'effectue chez les femelles de certaines espèces d'Anophèles. En prenant son repas de sang sur un paludéen, le moustique absorbe les différents stades du parasite, mais seuls les gamétocytes continueront leur développement. La fécondation donnera naissance à un œuf mobile qui gagnera rapidement la paroi de l'estomac. Une fois l'œuf mûr, il éclatera pour libérer les sporozoïtes qui gagneront avec prédilection les glandes salivaires de l'*anophèle*.

Cycle biologique du paludisme



Cycle biologique des plasmodiums

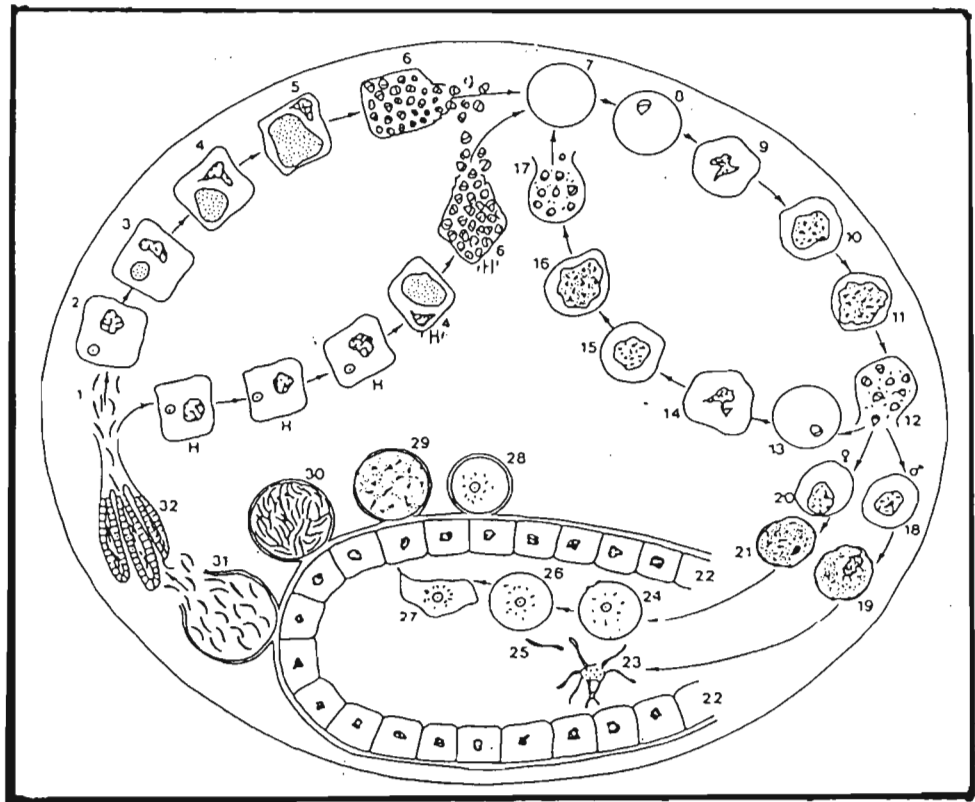


Figure 1: Cycle biologique des Plasmodiums
 1: Sporozoïtes; 2-5: Formes exoérythrocytaires hépatiques; H: Formes hypnozoïtes dans les hépatocytes; 6: Schizontes hépatiques matures relargant des mérozoïtes dans le sang; 7: Globule rouge; 8-9: Développement des trophozoïtes; 10-11: Développement des schizontes; 12: Schizonte mature relargant des mérozoïtes; 13-17: Répétition du cycle érythrocytaire; 18-21: Développement des microgamétocytes et des macrogamétocytes; 22: Moustique ayant des gamétocytes dans son tube digestif; 23: Exflagellation du microgamétocyte; 24: Développement du macrogamétocyte en macrogamète; 25: Microgamète; 26-27: Zygote et ookinète; 28-30: Développement de l'oocyste; 31: Oocyste relargant des sporozoïtes; 32: Sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique.
 (source: Garnham, 1988)

4/ Le paludisme en chiffres

Le paludisme est une des maladies qui cause le plus de décès dans le monde. Il est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans les pays en voie de développement.

- Selon l'OMS, on dénombre chaque année, entre 300 à 500 millions de cas de paludisme. Cette maladie cause la mort de 1.5 à 2.7 millions de personnes chaque année.
- Environ 40% de la population mondiale (soit 2 milliards d'individus) vivant dans quelques 90 pays et territoires sont à risque. Entre 80 et 90% des décès attribuables au paludisme surviennent en Afrique subsaharienne où vivent 90% des personnes infectées.
- Les enfants de 1 à 4 ans sont les plus susceptibles de contracter le paludisme et d'en mourir. Près de 50% des décès chez les enfants de moins de 5 ans en Afrique sont attribuables au paludisme. La maladie tue plus d'un million d'enfant par an (2800 enfants par jour) sur ce continent seulement.

5/ Les moyens de lutte contre le paludisme

Il y a deux lignes de conduite différentes en ce qui concerne la lutte contre le paludisme : lutte contre le parasite (chimio prophylaxie et traitements) et lutte contre les vecteurs : la femelle *Anophèle*.

5.1/ Lutte contre le parasite

- La chimio prophylaxie

Cette ligne de défense n'empêche pas l'impaludation mais empêche de faire des crises. C'est une méthode curative et non préventive.

- Les traitements

Il existe 3 types de traitements : présomptif, curatif, et radical.

- Le traitement présomptif consiste au traitement systématique des accès fébriles.
- Le traitement curatif consiste en le traitement de la crise de paludisme confirmé par les résultats de laboratoires. Cependant il y a de plus en plus de cas de résistance aux traitements, or *P. faciparum* peut tuer en quelques heures.
- Le traitement radical consiste à traiter les formes de paludisme qui se cache dans l'organisme. Cependant, il n'existe pas aujourd'hui de traitement qui soit efficace tout en étant non toxique.

- Un vaccin ?

Le problème vient du fait qu'au cours de son développement, le parasite du paludisme présente des morphologies et des antigènes différents. Ainsi des vaccins n'utilisant des antigènes que contre certaines formes du parasite ne peuvent déclencher qu'une réponse partielle de l'immunité et s'avèrent donc inefficaces.

5.2/ Lutte contre le Vecteur

La lutte contre le Vecteur a un aspect plus préventif. Il s'agit de diminuer les risques de piqûres et donc de transmission du paludisme.

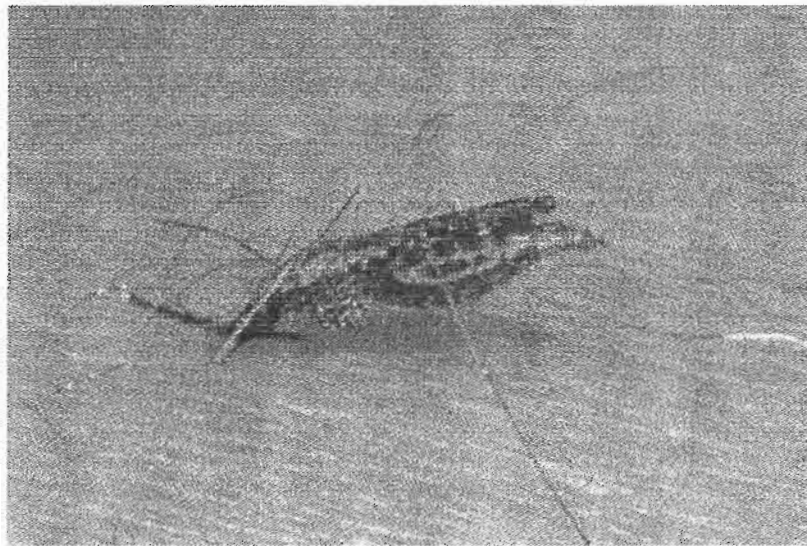
Elle peut être chimique (utilisation d'insecticides, de moustiquaires imprégnées), biologique (utilisation de toxines bactériennes s'attaquant aux larves d'Anophèles) ou génétique 5 développement de moustiques transgéniques.

Or l'élaboration d'une bonne stratégie de lutte antivectorielle va dépendre d'une bonne connaissance des anophèles vecteurs présents dans les régions concernées.

B/ L'anophèle : vecteur du paludisme

1/ Introduction

Les vecteurs du paludisme humain appartiennent au genre *Anopheles* qui fait partie de la famille des *Culicidae* de l'ordre des Diptères. On a dénombré environ 400 espèces d'anophèles dans le monde, mais seulement une soixantaine d'espèces sont vecteurs du paludisme.



2/ Critères de définition d'un vecteur

Un anophèle sera considéré comme vecteur potentiel de plasmodies humaines et donc de paludisme s'il y a compatibilité génétique entre le parasite et son vecteur, si sa longévité est égale ou supérieure à celle des plasmodies ou correspond au moins à un cycle sporogonique du parasite, et finalement s'il est anthropophile.

Compatibilité vecteur- parasite

Au sein de la famille des anophèles il existe des espèces qui sont réfractaires à certaines plasmodies. Ainsi *An. atroparvus* est réfractaire au développement de *P.falciparum* en Afrique Tropicale.

Longévité des Anophèles

En admettant que l'anophèle s'infecte au cours de son premier repas de sang, il devra pour atteindre un âge épidémiologiquement dangereux, survivre pendant une durée au moins égale à celle du cycle sporogonique du parasite. Les très bons vecteurs du paludisme se caractérisent par une longévité supérieure à deux semaines dans un climat tropical où le cycle sporogonique est court (10 jours pour *P.falciparum*).

Anthrophilie

La prise de repas de sang sur l'homme est la condition *sine qua non* de la transmission du paludisme. Une anthropophilie stricte constitue la situation la plus favorable à la transmission.

3/ Les principales espèces vectrices

Sur 450 espèces d'anophèles répandus dans le monde, seulement une soixantaine sont vecteurs du paludisme, et une vingtaine sont à l'origine de la majorité des cas. Les biogéographes ont divisé la planète en 6 régions, d'après la répartition des espèces animales et végétales, et ils ont été amenés à créer des sous régions pour rendre compte des différences au sein de certaines régions. La plupart des anophèles vecteurs se rencontrent dans une région, ou une partie d'une région, il existe cependant parfois des débordements.

Répartition des vecteurs du paludisme

Région	Sous région	Vecteurs principaux	Vecteurs secondaires
Néarctique	Amérique Au nord du Mexique	<i>An.quadrimaculatus</i> <i>An.freeborni</i>	<i>An.alloimanus</i>
Néotropicale	Amérique centrale et Caraïbes Amérique du sud	<i>An.darlingi</i> <i>An.albimanus</i> <i>An.pseudopunctipennis</i> <i>An.aquasalis</i> <i>An.argyritarsis</i>	<i>An.aquasalis</i> <i>An.aztecus</i> <i>An.punctimacula</i> <i>An.bellator</i> <i>An.cruzi</i>
Paléarctique	Eurasie septentrionale et tempérée Méditerranée orientale	<i>An.atroparvus</i> <i>An.sacharovi</i> <i>An.sergenti</i>	<i>An.sinensis</i> <i>An.messae</i>

	Asie mineure Nord de la peninsule arabique	<i>An.sacharovi</i> <i>An.superpictus</i> <i>An.stephensi</i>	<i>An.pulcherrimus</i> <i>An.multicolor</i>
	Afrique du nord et Sahara septentrional	<i>An.labranchiae</i> <i>An.sergenti</i>	<i>An.multicolor</i>
	Plateau iranien	<i>An.sacharovi</i> <i>An.culicifacies</i> <i>An.stephensi</i> <i>An.superpictus</i>	<i>An.annularis</i>
Orientale	Péninsule indienne	<i>An.culicifacies</i> <i>An.stephensi</i> <i>An.fluviatilis</i> <i>An.dirus</i> <i>An.philippiniensis</i> <i>An.minimus</i>	<i>An.annularis</i> <i>An.varuna</i>
Péninsule indochinoise et malaise	Péninsule indochinoise et Malaisie	<i>An.sundaicus</i> <i>An.minimus</i> <i>An.dirus</i> <i>An.maculatus</i> <i>An.letifer</i>	<i>An.sinensis</i> <i>An.jeyporiensis</i>
	Chine centre et sud	<i>An.minimus</i> <i>An.dirus</i> <i>An.anthropophagus</i> <i>An.sinensis</i>	<i>An.jeyporiensis</i> <i>An.pattoni</i>
	Indonésie (sauf Nelle- Guinée et Molluques)	<i>An.aconitus</i> <i>An.balabacensis</i> <i>An.sundaicus</i>	<i>An.barbistrotris</i>
	Philippines	<i>An.flavistrotris</i>	<i>An.littoralis</i>
Australienne	Australie Nelle-Guinée Moluques Vanuatu, Mélanésie	<i>An.farauti</i> <i>An.punctulatus</i>	<i>An.koliensis</i>
Afrotropicale	Afrique au sud du Sahara, Madagascar, sud-ouest de la péninsule arabique	<i>An.gambiae</i> <i>An.arabiensis</i> <i>An.funestus</i> <i>An.moucheti</i> <i>An.nili</i>	<i>An.pharoensis</i> <i>An.coustanti</i> <i>An.paludis</i> <i>An.hargreavesi</i> <i>An.melas</i> <i>An.merus</i>

An.dirus

Notre travail a porté sur l'étude de spécimens du complexe *An.dirus* collectés au Vietnam et en Thaïlande. Ces travaux de biologie moléculaire entrent dans le cadre général de caractérisation génétique des populations vecteurs du paludisme en Asie du Sud- Est développée par le LIN (Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, IRD, Montpellier), et plus particulièrement par Mme S.Manguin responsable d'un projet financé par la commission européenne.

An.dirus se développent dans les mares temporaires en sous bois, ce qui constitue une exception parmi les anophèles vecteurs. Les femelles sont très anthropophiles, mais aussi très exophiles, ne séjournant pratiquement pas dans les maisons où elles se sont nourries.

Ecologie humaine et transmission

Le contact homme-moustique est modulé directement par les activités humaines et indirectement par les modifications de l'environnement.

- Ainsi plus on s'éloigne des gîtes larvaires des anophèles vecteurs plus on constate que le taux d'inoculation diminue.
- L'absence de murs dans les habitations favorise l'accès des anophèles aux dormeurs. Ainsi en Asie du sud-est, *An.dirus* qui est fortement hexophile s'attaque aux défricheurs de forêt dont l'abri est un simple toit. L'absence de murs est, en outre, un obstacle aux traitements intradomiciliaires d'insecticides.
- Les modifications anthropiques du milieu ont également une influence sur la transmission du paludisme. (destruction de la forêt, création de lacs de barrages, l'urbanisation croissante).

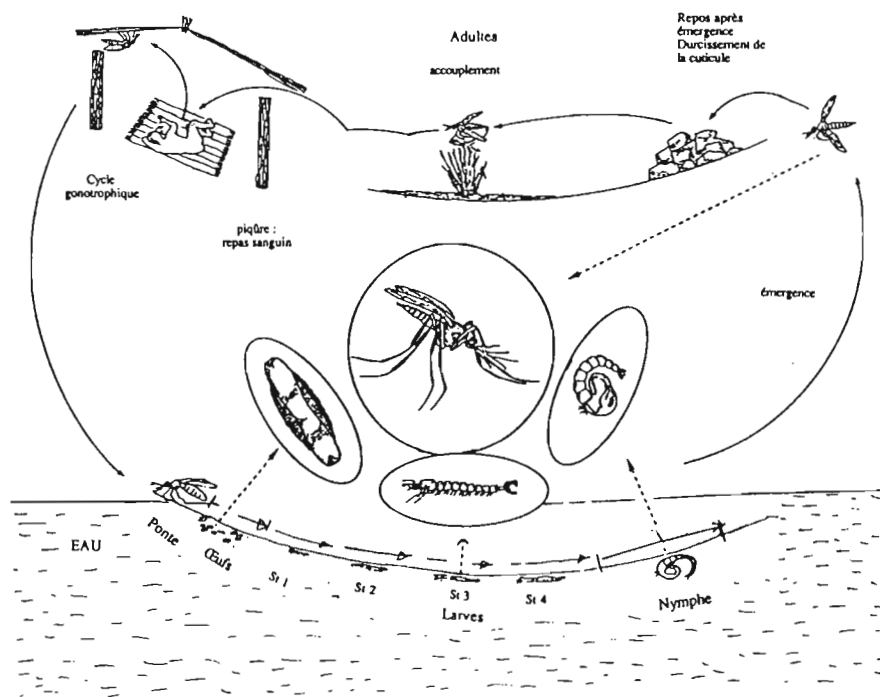
4/ Cycle biologique de développement de l'anophèle

Au cours de la vie des anophèles on distingue quatre stades différents ; les trois premiers ; œuf, larve et nympe sont aquatiques tandis que le stade adulte est aérien.

- Les œufs sont pondus isolément par les femelles en amas flottant ou sur un support. L'anophèle vit 1 mois environ, elle pond tous les deux à trois jours environ 150 œufs en surface des eaux stagnantes.
- La durée du stade larvaire est de 8 à 10 jours, les gîtes larvaires sont aquatiques.
- Le stade de nympe est aquatique et dure 1 à 5 jours.
- A l'âge adulte mâle et femelle se différencient facilement par la présence d'antennes plumeuses chez le mâle ou gabres chez la femelle.

Les mâles se nourrissent de jus sucré, de nectar de fleurs et ne piquent pas alors que les femelles ont besoin de protéines sanguines pour assurer le développement de leurs ovaires. C'est à cette occasion qu'elles peuvent transmettre des germes pathogènes (type plasmodies). Ainsi seules les femelles piquent et peuvent transmettre le paludisme. Il y a jusqu'à la mort du moustique femelle alternance entre repas de sang et ponte.

Cycle biologique de l'Anophèle



C/ METHODE D'IDENTIFICATION DES ANOPHELES

La caractérisation et l'identification des vecteurs du paludisme a toujours été une préoccupation importante dans la lutte contre les vecteurs. En identifiant plus précisément la cible, on peut améliorer l'efficacité de lutte.

Nous pouvons distinguer quatre types de techniques différentes d'identification des anophèles.

- techniques morphologiques : un premier tri a lieu sur le terrain après la capture de nuit des spécimens, puis l'identification plus poussée a lieu au laboratoire d'analyse.
- techniques cytotaxonomiques : études des inversion chromosomiques.
- techniques d'analyses isoenzymatiques.
- technique moléculaire : certaines de ces techniques seront détaillées par la suite. Elles constituent la majorité du travail de recherche effectué sur l'identification des vecteurs du paludisme en Asie du Sud- Est. Elles reposent toutes sur le même principe : celui de la Polymerase Chain Reaction (PCR), c'est à dire une réaction d'amplification en chaîne de séquences cibles d'ADN.

1/ Principe de la PCR

La **Polymerase Chain Reaction (PCR)** est une méthode *in vitro* d'amplification de séquences spécifiques d'ADN. la première PCR a été décrite par K.Leppe et al. En 1971. Il a fallu ensuite attendre 1983 pour voir reparaître la PCR dans les travaux de Kary Mullis qui en a décrit les principes ce qui lui a valu le prix Nobel en 1993. Tout le monde s'accorde à dire aujourd'hui que la PCR est une technique biologique des plus puissantes et utiles. La PCR est aujourd'hui une technique standard de laboratoire.

1.1/ Les réactifs de la PCR

La PCR permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN dans un mélange réactionnel approprié (Mix).

Le mélange contient :

- Une enzyme permettant la synthèse des nouveaux brins d'ADN lors de l'amplification. L'enzyme utilisée est la *Thermus Aquaticus polymerase*

(Taq), protéine de 94 kiloDaltons, isolée de la bactérie *Thermus Aquaticus* . La Taq polymérase est une ADN polymérase thermostable. Elle résiste à des températures répétées pouvant atteindre jusqu'à 95°C..

- Les dNTP (deoxynucleotide triphosphate), ce mélange contient les différentes bases A, T, G, C sous la forme ATP, TTP, CTP, GTP.
- MgCl₂, les ions magnésium sont importants dans la PCR, ils influent sur l'activité enzymatique de la Taq, ne pas mettre de MgCl₂ augmente l'astringence de la réaction.
- Les amorces ou oligonucléotides (primers), ce sont des polymères nucléotidiques, de 10 à 30 paires de base, de séquences spécifiques du gène à amplifier.. Lors de la PCR, les amorces se fixent spécifiquement sur l'ADN dénaturé par chauffage et l'ADN compris entre les amorces est amplifié. Leur choix est très important , ils déterminent les caractéristiques de l'ADN amplifié (longueur, spécificité et nature).
- Un tampon :le tampon 10X est souvent utilisé, il contient en général du Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ (15mM), pH8.7.

Une fois le Mix distribué dans les tubes appropriés, les échantillons d'ADN sont ajoutés individuellement. Leur mode de préparation est donné ci-après.

1.2/ Principe de l'amplification

Phase 1 : Séparation des brins de l'échantillon d'ADN par chauffage entre 90°C et 95°C.

Phase 2 : les amorces se fixent sur l'ADN monobrin à la température d'annealing ou d'hybridation requise(entre 55°C et 68°C).

Phase 3 : La Taq polymérase va synthétiser le brin complémentaire à partir de l'amorce en utilisant les dNTP, ce qui permet de doubler l'ADN cible. Cette étape se déroule à 72°C.

Chaque cycle ainsi répété permet d'aboutir à un ADN cible multiplié exponentiellement par 2ⁿ. (n= nombre de cycles)

Un exemple classique de programme PCR

Dénaturation initiale	3mn	94°C
Dénaturation } Annealing } cycle Extension }	0.5-1mn 0.5-1mn 1mn	94°C 55°C-68°C 72°C
Nombre de cycle	25-35	
Extension finale	10mn	72°C

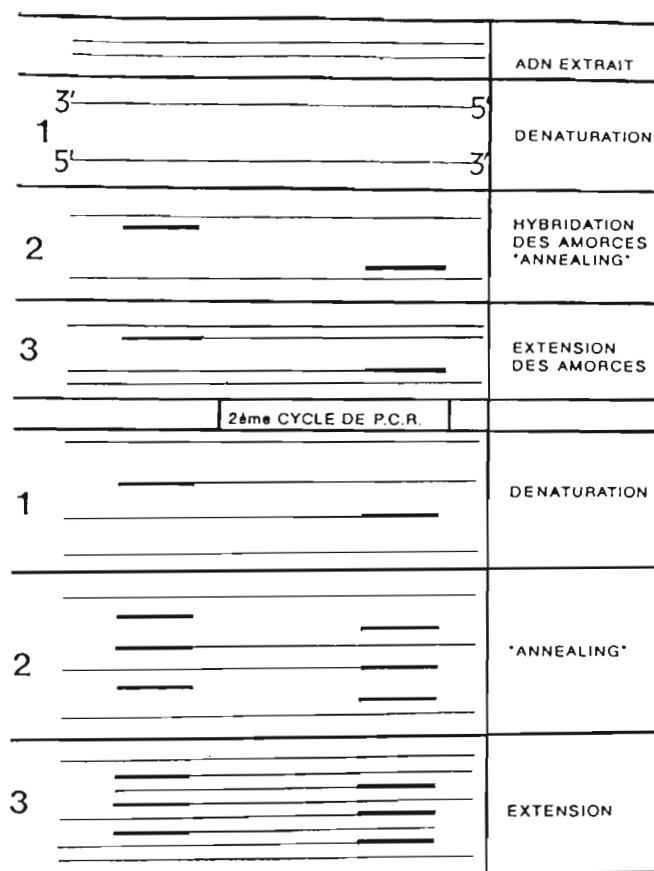


FIG.1. — Principe général de la P.C.R.

1.3/ L'analyse des produits PCR

Lorsque la PCR est terminée, les produits amplifiés sont étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose. La révélation se fait sous UV, pour cela il est nécessaire d'introduire dans le gel du bromure d'éthidium (BET).

Les bandes observées sur le gel sont censées être spécifiques des fragments d'ADN des échantillons encadrés par les amorces, maintenant amplifiés.

2/ Les différentes méthodes moléculaires

Une liste non exhaustive des différentes techniques PCR est :

- la DAF-PCR (DNA amplification fingerprinting) : cette technique utilise une unique et courte amorce (environ 5 paires de base) de séquence arbitraire, elle permet d'obtenir des spectres d'ADN de complexité variable constituant l'empreinte digitale génétique d'un spécimen donné.
- l'Inverse PCR : elle permet l'amplification d'une séquence inconnue d'ADN lorsqu'elle encadre une région de séquence connue.
- la RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR) : amplification suivie par une coupure faite par des enzymes de restriction

- la RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) : elle utilise une paire d'amorces identiques d'environ 10 paires de bases choisies au hasard
- L'AS-PCR (Allele Specific-PCR) : elle est à rapprocher de la PCR spécifique standard. Elle utilise l'amplification particulière de séquences du gène ITS2 situé sur l'ARN ribosomal. C'est une PCR multiplexe, où plusieurs amorces spécifiques de différentes familles sont introduites en même
- Microsatellite

Nous allons maintenant détailler le principe de la RAPD-PCR et de l'AS-PCR, car nous avons utilisé ces deux techniques de biologie moléculaire pour étudier des spécimens d' *An dirus*, vecteur majeur du paludisme en Asie du sud-est.

3/ La technique RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)

3.1/ Introduction

La technique RAPD-PCR a été mise au point en 1990 par William et al., Welsh et Mc Clelland. Elle est basée sur la réaction d'amplification en chaîne (PCR) de séquences prises au hasard d'ADN génomique.

Elle constitue un moyen rapide et efficace pour réaliser des 'screenings' en génétique moléculaire en s'appuyant sur la technique PCR. C'est une technique pour l'analyse de la diversité génétique.

3.2/ Principe de la RAPD-PCR

Comme la PCR, la RAPD est basée sur la réplication d'ADN double brin. Alors que la PCR classique nécessite deux amorces oligonucléotidiques dont les séquences sont complémentaires des segments encadrant le fragment, la RAPD-PCR nécessite seulement la présence d'une amorce unique choisie au hasard (at random). Cette amorce joue à la fois le rôle d'amorce sens et antisens.

Dans ce dernier cas les amorces PCR sont des oligonucléotides d'environ une dizaine de bases ayant un G+C% compris entre 60 et 70%, et ne possédant pas de séquences palindromiques.

Il existe donc un nombre très important d'amorces qui peuvent être utilisées en RAPD, et permettant d'amplifier simultanément différentes parties d'un génome.

3.3/ Propriétés des marqueurs RAPD

La séquence amplifiée est flanquée par deux sites d'hybridation théoriquement parfaitement complémentaires de l'amorce unique choisie, séparés par une distance généralement comprise entre 300 et 3000 paires de bases.

Cela suggère que les sites d'hybridation des amorces sont des séquences inversées répétées. La RAPD-PCR repose donc sur l'amplification de ces régions redondantes dans le génome, cependant des régions uniques sont également amplifiées.

La RAPD-PCR est une technique extrêmement sensible. Elle est susceptible de détecter de faibles différences entre des génomes d'insectes d'une même espèce. Ainsi plusieurs modifications du génome utilisé peuvent entraîner la perte d'une bande :

- une mutation d'une seule paire de base dans le site d'hybridation
- une insertion longue séparant les deux sites d'hybridation de l'amorce d'une distance trop importante

D'autres causes de polymorphisme peuvent également être envisagées :

- réduction du nombre de copies génomiques d'une séquence cible
- insertion changeant la taille du produit amplifié
- compétition avec un nouveau site d'amplification plus efficace

3.4/ Utilisation de la RAPD-PCR

a/ Caractérisation globale des génomes : typage et relations génétiques entre individus

En utilisant un grand nombre d'amorces, les RAPDs permettent d'obtenir un sondage théoriquement aléatoire du génome et donc de caractériser les individus et d'estimer les relations génétiques globales entre individus, espèces ou genres.

Cette technique a été mise à profit dans la suite de mon travail pour tenter de caractériser les espèces *d'Anophèles dirus* issus de différents villages d'Asie du sud-est (Vietnam, Thaïlande).

La RAPD a permis grâce à sa grande finesse et à la complexité des bandes obtenues, de mettre en évidence chez de très nombreuses espèces, une variabilité interpopulatuionnelle jamais obtenue encore par d'autres techniques.

Ainsi la technique RAPD permet d'obtenir rapidement un nombre très important de marqueurs polymorphes, ce qui rend plus robustes les analyses phylogénétiques.

b/ Développement d'outils moléculaires à partir de fragments RAPD

Il est possible d'utiliser les fragments RAPD amplifiés et spécifiques d'un groupe d'individus, d'une espèce, comme marqueurs de ces groupes.

- Les fragments sont purifiés à partir du gel, clonés, et utilisés comme sonde par marquage radioactif pour tester leur hybridation sur l'ADN génomique total.
- ou
- Les fragments RAPD sont clonés et séquencés et les séquences sont utilisées pour définir des amorces PCR spécifiques, plus longues en règle générale que les amorces RAPD.

Tout au long de cette étude, les transferts de gels (Southern Blot) ont été réalisés pour des familles d'*An. dirus*, en vue de réaliser des hybridations avec des sondes radioactives.

c/ Sensibilité de la technique RAPD-PCR

Le problème de la technique RAPD-PCR, vient du fait qu'elle est particulièrement sensible à la concentration initiale d'ADN lors de l'amplification. Ainsi il peut facilement y avoir des variations d'intensité entre bandes même si elles sont présentes chez différents individus.

Par ailleurs si cette technique semble simple, la reproductibilité entre résultats ne peut être atteinte que si une attention toute particulière est accordée à la standardisation du protocole.

4/ La technique AS-PCR (Allele Specific –PCR)

Cette technique diffère peu sur le principe de la PCR spécifique. Elle utilise des séquences d'ADN ribosomal pour l'étude de la diversité génétique. Elle fait référence à la publication de l'équipe de recherche anglaise de C. Walton et al., 1999.

4.1/ Principe de l'AS-PCR

L'AS-PCR repose sur l'amplification de séquences spécifiques d'ADN ribosomal du gène ITS2, en utilisant des amorces qui diffèrent par une seule base.

L'ADN ribosomal est une région du génome codant pour des sous-unités variables et conservées qui sont répétées. L'ubiquité et la conservation des amorces définies dans le rDNA au sein d'une espèce, ont fait de cette région d'ADN un important outil pour la caractérisation génétique des individus.

L'ADN ribosomal est organisé en unités répétées codant chacune pour un gène. Ces unités sont séparées par des séquences d'ADN : les spacers.

Il a été montré récemment par l'étude de leur séquence d'ADN que l'un de ces éléments de séparation appelé ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) pourrait permettre de différencier des espèces données d'anophèles.

Cette technique a d'ailleurs été utilisée pour distinguer les espèces du complexe *An. gambiae* (Scott et coll., 1993) et le complexe *An. punctulatus* (Beed et Saul, 1995).

4.2/ Les amorces AS-PCR

Le gène ITS2 a été séquencé pour différentes espèces du complexe *Anopheles dirus* en Asie du sud-est. Ceci a permis de déterminer un certain nombre d'amorces spécifiques. Ensuite il a été possible d'utiliser pour la différenciation des espèces, une technique PCR dite multiplexe, en ce sens qu'elle regroupe pour un échantillon d'ADN donné l'ensemble des amorces spécifiques sélectionnées .

D/ OBJECTIF DU TRAVAIL

Anopheles dirus est le vecteur majeur du paludisme dans les zones de forêt et de clairière des régions centrales et sud du Vietnam.

Le complexe *dirus* comprend les sept espèces suivantes : *An.dirus* (s.s) A, B, C, D, E, *An.nemophilus* (F), et *An.takasagoensis*. L'identification des espèces est basée sur les différences d'inversions chromosomiques, les techniques iso enzymatiques et les sondes d'ADN. Ces techniques parfois lourdes à mettre en œuvre, ne permettent pas toujours d'expliquer complètement les différences biologiques observées.

L'objectif de ce travail est la caractérisation de populations d'*Anopheles dirus* provenant du Vietnam et de Thaïlande par utilisation de techniques de biologie moléculaire, basées sur l'amplification en chaîne d'acides nucléiques (PCR).

Ce travail a consisté à rechercher des marqueurs génétiques des populations d'*An dirus* à partir de la méthode de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) et à mettre en œuvre une technique d'ASPCR pour la caractérisation de ces mêmes populations.

MATERIEL ET METHODES

A/ Matériel biologique utilisé

1/ Echantillons utilisés

Nous avons à disposition toute une série de spécimens d'*Anophèles dirus* venus de Chine du sud, de Thaïlande et du Vietnam. Nous avons mené nos expériences sur l'ensemble des échantillons suivants.

L'ensemble des spécimens arrivent au laboratoire conservés soit dans des tubes secs (silica gel) ou dans de l'azote liquide. Les échantillons y sont répertoriés puis conservés dans le congélateur à -80°C , avant d'en extraire l'ADN.

1.1/ Spécimens de Thaïlande

Avant leur arrivée au laboratoire ces échantillons ont déjà été classés grâce à des critères morphologiques juste après leur capture sur le terrain. Il y a 3 familles différentes ES, EP, ET. Les échantillons ES sont censés appartenir à l'espèce A, les EP à l'espèce D, et les ET à l'espèce C. Les études par PCR spécifique et RAPD permettront de vérifier ces hypothèses.

Echantillons ES (provenant de Sakhon Nakhon, Tao Ngoy District, Nord Thaïlande)

Boîte I. *An dirus* (ES) : 16 échantillons ES 132, ES 264, ES 134, ES 147, ES 343, ES 249, ES 102, ES 157, ES 277, ES 285, ES 137, ES 142, ES 241, ES 323, ES 165

Boîte II. *An dirus* (ES+ET) : 15 échantillons ES 230, ES236, ES 317, ES 341, ES 276, ES 250, ES 272, ES 229, ES 307, ES 151, ES 129, ES 240, ES 262, ES 152, ES 254

Boîte IV. *An dirus* (ES+EP) : 12 échantillons ES 128, ES 311, ES 137, ES 255, ES 334, ES 119, ES 313, ES 399, ES 187, ES 167, ES 264, ES 212

Boîte V. *An dirus* (ES) : 15 échantillons ES 327, ES 176, ES 218, ES 106, ES 299, ES 203, ES 259, ES 163, ES 298, ES 330, ES 146, ES 223, ES 240, ES 109

Echantillons ET (provenant de Trang, Ratchada District, Nord Thaïlande)

Boîte II. *An dirus* (ET+ES) : 16 échantillons ET 92P, ET 87P, ET 65P, ET 51P, ET 13P, ET 60P, ET 78P, ET 32P, ET 35P, ET 149P, ET 92C, ET 87C, ET 65C, ET 51C, ET 13C, ET 60C

Boîte III. *An dirus* (ET) : 38 échantillons

ET 141, ET 129A, ET 91, ET 113,
ET 31, ET 123A, ET 114, ET 107,
ET 26, ET 145, ET 18, ET 100, ET 135,
ET 73A, ET 111, ET 136A, ET 115, ET 6,
ET 124, ET 33A, ET 142, ET 57, ET 64,
ET 69, ET 146, ET 85, ET 4, ET 49,
ET 75, ET 90, ET 58, ET 9, ET 125,
ET 12, ET 140, ET 71A, ET 132, ET 5

Echantillons EP (provenant de Phangnga, Tabpud District, Sud Thaïland)

Boîte IV. *An dirus* (ES+EP) : 8 échantillons

EP 12, EP 6A sang, EP 10A sang, EP 9,
EP 3, EP 4A, EP 11A sang, EP 2A sang

1.2/ Spécimens du Vietnam

Nous avons étudié 3 populations venues de localités de Thaïlande différentes.

Collection 3C

Collection 3C. *An dirus*. Province de Binh Thuan, centre Vietnam : 60 échantillons

3C 523, 3C 524, 3C 529, 3C 531, 3C 532, 3C 533, 3C 534,
3C 535, 3C 536, 3C 537, 3C 539, 3C 540, 3C 542, 3C 561,
3C 563, 3C 565, 3C 566, 3C 567, 3C 568, 3C 569, 3C 586,
3C 587, 3C 590, 3C 591, 3C 596, 3C 598, 3C 599, 3C 600,
3C 601, 3C 603, 3C 604, 3C 605, 3C 606, 3C 607, 3C 608,
3C 609, 3C 610, 3C 612, 3C 613, 3C 614, 3C 616, 3C 617,
3C 618, 3C 620, 3C 621, 3C 623, 3C 624, 3C 625, 3C 626,
3C 627, 3C 628, 3C 630, 3C 631, 3C 632, 3C 633, 3C 634,
3C 635, 3C 636, 3C 638, 3C 652

Collection 1B

Collection 1B. *An dirus*. Province de Hoa Binh, nord Vietnam : 12 échantillons

1B-299, 1B-307, 1B-452, 1B-453, 1B-466, 1B-467, 1B-468, 1B-473
1B-474, 1B-475, 1B-529

1.3/ Spécimen de Chine du sud

Collection IMPE

Souche de laboratoire maintenue au NIMPE (Institut National de Malariologie, Parasitologie et Entomologie) de Hanoï. *An dirus*. Ile de Hainan. Chine du sud :
20 échantillons

1,2 ,3, 4 ,5 ,6 ,7 ,8 ,9 ,10 ,11 ,12 ,13 ,14 ,15 ,16 ,17 ,18 ,19 ,20

I.2/ Préparation des échantillons d'ADN

Le protocole d'extraction est le suivant :

1/ Mettre à refroidir dans la glace des tubes Eppendorfs stériles

2/ Mettre un moustique par tube, ajouter 100µl de solution 1 par tube (solution 1 : Tris-HCl 10mM, NaCl 60mM, Sucrose 5%, EDTA pH 8 10mM, solution gardée à 4°C), broyer à l'aide d'un potter (changer de potter entre chaque échantillon).

3/ Ajouter 125 µl de solution 2 (solution 2 : SDS 1.25%, Tris-HCl 300mM, Sucrose 5%, EDTA pH8 10mM, solution gardée à température ambiante), vortexer et mettre à incuber au bain-marie à 65°C pendant 30mn.

4/ Pré refroidir la centrifugeuse à 4°C.

5/ Ajouter 38ml d'acétate de potassium 3M dans chacun des tubes, vortexer puis mettre les tubes 10mn à -20°C. Centrifuger 15mn, 4°C, 15000 rpm.

6/ Transférer la totalité du surnageant dans un autre Eppendorf froid et ajouter 530ml d'éthanol absolu froid (conservé à -20°C), vortexer et laisser sur glace. Puis mettre 10mn au congélateur à -20°C.

7/ Centrifuger 10mn à 4°C et à 15000rpm

8/ Jeter le surnageant puis laver le culot à l'éthanol 70% froid (500µl), ne pas vortexer.

9 / Centrifuger à 4°C, jeter le surnageant et sécher le culot au Speed-Vac.

10/ Reprendre le culot sec dans 20µl de LTE ou H2O mQ stérile, laisser au moins 2H à 4°C, conserver ensuite l'ADN à -20°C.

le moustique est broyé avec un potter dans une solution qui contient un détergent (SDS), ceci pour éliminer la paroi, la membrane cellulaire et autres déchets.

L'acétate de sodium permet la solubilisation de l'ADN et la précipitation de la majorité des protéines.

L'éthanol absolu permet un bon lavage de l'ADN.

Le précipité d'ADN obtenu est lavé à l'éthanol 70% pour éliminer tous les déchets et nucléases qui pourraient détruire l'ADN extrait.

I.3/ Méthode de dosage de l'ADN extrait

Spectrophotométrie à 260nm et 280nm

Une fois l'extraction effectuée pour connaître de manière exacte la quantité d'ADN extraite par échantillon, il est nécessaire de réaliser des mesures spectrophotométriques.

Les protéines absorbent vers 280nm alors que les acides nucléiques absorbent vers 260nm. Une unité de densité optique correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. La valeur de l'absorbance à 280nm permettra de déterminer toute contamination protéique. L'ADN sera considéré comme pur si le rapport A260/A280 est compris entre 1.8 et 2.

Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour avoir un ordre de grandeur relatif de la quantité d'ADN extraite, il est possible de faire migrer sur un gel d'agarose 9 µl de chaque échantillon d'ADN extrait en étudiant l'intensité des bandes, il est possible de juger si l'extraction est satisfaisante ou non.

B/ METHODES

1/ Random Amplified Polymorphic DNA- PCR

En testant tout une série d'amorces choisies au hasard, nous avons essayé de mettre au point une technique RAPD-PCR de classification des espèces du complexe *An.dirus*, vecteur majeur du paludisme en Asie du sud-est. L'ensemble des PCR sont réalisées avec le Mastercycler gradient- Eppendorf.

1.1/ Les différentes amorces testées

Le screening a été effectué avec 25 amorces différentes, qui ont été synthétisées par EUROGENETEC et qui sont jumelles des amorces proposées dans les Kit d'amorces OPERON.

Leur séquence, le nombre initial de moles, les dilutions effectuées pour avoir 6pmol dans le mélange PCR sont présentées dans le tableau suivant :

Amorce	Quantité (nmol)	[sol. Mère] (pmol/μl)	Dilution au 10 ^{ème} (pmol/μl)	Quantité prélevée (μl) n _{finale} =6pmol	Séquence
F2	152	304	30.4	0.197	CAG GAT CCC T
F4	54	108	10.8	0.55	GGT GAT CAG G
F5	71	142	14.2	0.422	CCG AAT TCC C
F6	88	176	17.6	0.341	GGG AAT TCG G
F8	143	286	28.6	0.209	GGG ATA TCG G
F7	137	274	27.4	0.219	CCG ATA TCC C
F11	143	286	28.6	0.2097	TTG GTA CCC C
F13	124	248	24.8	0.242	GGC TGC AGA A
F17	114	228	22.8	0.263	AAC CCG GGA A
F20	73	146	14.6	0.411	GGT CTA GAG G
P4	101	202	20.2	0.594	GTG TCT CAG G
P2	151	302	30.2	0.400	TCG GCA CGC A
P5	447	894	89.4	0.134	CCC CGG TAA C
P14	427	854	85.4	0.14	CCA GCC GAA C
P37	155	310	31	0.387	TCA CGA TGC A
B7	120	240	24	0.5	GGT GAC GCA G
B10	235	470	47	0.255	CTG CTG GGA C

M8	571	571	57.1	0.105	TCT GTT CCC C
M12	576	576	57.6	0.104	GGG ACG TTG G
M13	408	408	40.8	0.147	GGT GGT CAA G
M15	233	233	23.3	0.257	GAC CTA CCA C
M17	373	373	37.3	0.16	TCA GTC CGG G
M20	470	470	47.0	0.127	AGG TCT TGG G
A5	118	236	23.6	0.254	
A10	95	190	19	0.316	

1.2/ Protocole pour les RAPD-PCR

Les réactifs

- La Taq polymérase de QIAGEN est une protéine recombinante de 94 kDa, isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* et clonée dans E.Coli.
Une unité de Taq correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 10 nmoles de dNTP en matériel acide insoluble.
La concentration de la Taq QIAGEN est de **5unités/µl**.
- Le tampon d'enzyme 10X QIAGEN, contient 15mM de MgCl₂.
- Le solution de MgCl₂ QIAGEN est à 25mM.
- La solution de dNTP d'EUROGENTEC est à une concentration de 10mM pour chaque dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
- L'eau recommandée pour la PCR doit être de qualité ultrapure. Pour nos expériences, nous utilisons l'eau mQ autoclavée.

Quantité de réactifs nécessaire

Le Taq PCR Handbook de QUIAGEN propose le protocole de PCR standard suivant :

Composant	Volume/Reaction	Concentration finale/reaction
10X	10µl	1X
MgCl ₂ 25mM	Variable- cf table ci-après	cf table
dNTP mix (10mM chaque)	2µl	200µM pour chaque dNTP
Amorce	variable	0.1 à 0.5µM
Taq polymerase	0.5µl	2.5 unités
H ₂ O	qsp 100µl	
ADN	variable	<1µg/reaction

Volume final 100µl

CONCENTRATION FINALE EN MG ²⁺	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Volume nécessaire de 25mM MgCl₂ par réaction (µl)	0	2	4	6	8	10	12	14

Ces conditions ont été adaptées pour nos propres expériences en s'inspirant de RAPD-PCR déjà réalisées par Pierre Kengne, notamment celles faisant intervenir les amorces A5 et A10, que j'ai ensuite retesté pour avoir une idée de la reproductibilité de la RAPD-PCR.

Réactif	Concentration ds la solution mère	Concentration ds le Mix	Volume prélevé
Tampon 10X	10X	1X	2.5µl
MgCl₂	25mM	2mM	0.5µl
dNTPmix	10mM chaque	200mM chaque	1
Amorce	variable	6pmol ds 25µl	Variable
Eau	-	-	qsp 25µl
ADN		25mg<x<40mg	2.5µl
Taq	5U/µl	4Unités	0.2

Volume final : 25µl

Le tableau ci-après donne l'ensemble des conditions opératoires pour les différentes amorces utilisées pour un volume final de 25µl

amorce	F2	F4	F5	F6	F7	F8	F11	F13	F17	F20
volume (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
tampon 10X (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl2 (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
dNTP (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
volume amorce (µl)	0,197	0,55	0,422	0,341	0,219	0,209	0,209	0,242	0,263	0,411
ADN (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Taq (µl)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
eau (µl)	18,103	17,75	17,878	17,959	18,081	18,091	18,091	18,058	18,037	17,889

amorce	P2	P4	P5	P14	P37		B7	B10
volume (µl)	25	25	25	25	25		25	25
tampon 10X (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5		2,5	2,5
MgCl2 (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5	0,5
dNTP (µl)	1	1	1	1	1		1	1
volume amorce (µl)	0,4	0,594	0,134	0,14	0,387		0,5	0,255
ADN (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5		2,5	2,5
Taq (µl)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2
eau (µl)	17,9	17,706	18,166	18,16	17,913		17,8	18,045

amorce	M8	M12	M13	M15	M17	M20		A5	A10
volume (µl)	25	25	25	25	25	25		25	25
tampon 10X (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5		2,5	2,5
MgCl2 (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5	0,5
dNTP (µl)	1	1	1	1	1	1		1	1
volume amorce (µl)	0,105	0,104	0,147	0,257	0,160	0,127		0,254	0,316
ADN (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5		2,5	2,5
Taq (µl)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2
eau (µl)	18,195	18,196	18,153	18,043	18,14	18,173		16,546	18,284

Manipulation

L'ensemble de la manipulation RAPD-PCR s'effectue sous la hotte à flux laminaire, avec des gants, afin d'être dans un environnement le plus propre possible.

Le Mix est tout d'abord réalisé en introduisant dans l'ordre et en vortexant : le tampon 10X, MgCl₂, le dNTP mix, l'amorce. La Taq est sortie du congélateur à -20°C et ajoutée à la dernière minute (dès qu'elle est sortie du congélateur, elle est immédiatement placée dans la glace), il ne faut plus vortexer sous risque d'inactiver la Taq. Finalement, l'eau est introduite et le Mix mélangé doucement grâce au pipetman.

Le Mix est ensuite répartie de façon homogène dans les différents tubes Eppendorfs de 0.2ml.

En dernier lieu, l'ADN est ajouté tube par tube, en veillant bien à changer de cône entre chaque tube.

Tout au long de la manipulation, il faut veiller à limiter les risques de contaminations en manipulant avec soin et sérieux.

Cycle d'amplification

Le cycle PCR utilisé est le suivant (cycle F7 du mastercycler-Eppendorf) :

Etape du cycle	Température du thermocycleur en degré	Temps en mn
Dénaturation initiale	94°C	5mn
44 cycles d'amplification		
-dénaturation	94°C	1mn
-annealing	35°C	1mn
-extension	72°C	2mn
Extension finale	72°C	10mn

2/ Technique d'amplification de l'ADN par Allele Specific-PCR (AS-PCR)

2.1/ Le complexe *An dirus* en Asie du sud-est

- Le complexe *An.dirus* en Asie du sud- est comprend plusieurs vecteurs du paludisme les plus importants. Sept espèces du complexe *An.dirus* sont connues, et cinq ont été identifiées en Thaïlande : ce sont les espèces *An.dirus* A, B, C, D et F.

2.2/ Analyse de la séquence du gène ITS2

- Le gène ITS2 a été séquencé pour un nombre déterminé de spécimens appartenant aux espèces A, B, C, D, F, sa longueur varie de 733 à 801 paires de bases. Cela a permis de sélectionner des portions de gènes spécifiques des espèces du complexe, et de déterminer des amorces spécifiques de ces gènes.

2.3/ Les amorces AS-PCR

Il existe une amorce universelle D-U qui s'accroche à l'extrémité 5' du gène ITS2, de séquence : CGC CGG GGC CGA GGT GG, et qui est spécifique du complexe *An.dirus*.

Les autres amorces sélectionnées sont spécifiques des différentes familles du complexe et se fixent sur des portions différentes du gène ITS2. Pour les spécimens A et C l'amorce est identique et se nomme D-AC, pour B : D-B, pour D : D-C, et pour F : D-F. Leur séquence et la longueur du gène amplifié sont données ci-après.

Amorces AS-PCR

Espèces <i>An.dirus</i>	Séquences amorces (5'-3')	Paires de bases du produit PCR	Nom amorce
A et C	CAC AGC GAC TCC ACA CG	562 et 349(ou353)	DAC
B	CGG GAT ATG GGT CGG CC	514	DB
D	GCG CGG GAC CGT CCG TT	306	DD
F	AAC GGC GGT CCC CTT TG	223	DF
U	CGC CGG GGC CGA GGT GG	-	DU

Les amorces ont été synthétisées par EUROGENTEC. Elles arrivent sous forme de lyophilisée. Les solutions mères sont réalisées par dilution dans 1000 μ l d'eau mQ.

Amorce	Quantité (nmol)	[sol. Mère] (μ mol/l)	Dilution au 10 ^{ème} (μ mol/ μ l)	Concentration finale désirée (μ M)	Quantité prélevée (μ l)
DAC	277	277	27.7	2.5	0.9
DB	159	159	15.9	0.5	0.786
DD	217	217	21.7	0.5	0.576
DF	286	286	28.6	0.5	0.435
DU	173	173	17.3	0.5	0.7225

2.4/ Protocole pour l'AS-PCR

Cette PCR fait intervenir les 5 amorces D-U, D-AC, D-B, D-D, D-F simultanément, ce qui permet de déterminer rapidement à quelle espèce du complexe appartient les fragments d'ADN amplifiés. C'est une PCR multiplexe.

Les réactifs

- Taq polymerase QIAGEN
- Tampon PCR 10X QIAGEN : Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 5mM, pH 8.7 (20°C)
- Q solution QIAGEN : tampon PCR 5X concentré
- Solution de dNTP EUROGENTEC
- Eau mQ autoclavée.

Quantité de réactifs utilisés

Les conditions optimales retenues avec les différents produits et tampons QIAGEN sont :

Produit	Concentration finale	Quantité par échantillons d'ADN (μ l). $V_{total}=25\mu$ l
10X	1X	2.5
Q solution	1X	5
DNTP	200 μ M pour chaque dNTP	1
Taq	2.5 unités	0.125
DU	0.5 μ M	0.723
DB	0.5 μ M	0.786
DD	0.5 μ M	0.576
DF	0.5 μ M	0.435
DAC	2 μ M	0.9
H2O	(qsp 25 μ l)	10.955
ADN	<1 μ g/réaction	2

Manipulation

Elle est identique à celle présentée pour la technique de RAPD. La Taq polymérase est sortie au dernier moment et ajoutée au Mix en avant dernier. L'ADN est ajouté tube par tube après la répartition du Mix.

Cycle d'amplification

Étape du cycle	Température du thermocycleur en degré °C	Temps en mn
Dénaturation initiale	94°C	5mn
32 cycles d'amplification		
-dénaturation	94°C	15s
-annealing	55°C	15s
-extension	72°C	30s
Extension finale	72°C	10mn

3/ Analyse des produits PCR sur gel d'agarose

Lorsque la PCR est terminée, les produits amplifiés sont étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Préparation des gels

Les gels réalisés sont à une concentration de 15% (1.5g d'agarose pour 100ml du tampon TBE1X qui contient du Tris, de l'acide borique, et du Na₂EDTA).

La révélation se fait sous UV, il est nécessaire d'introduire dans le gel du bromure d'ethyidium (BET). Pour un petit gel à 15% réalisé à partir de 1.5 g d'agarose et de 100ml de TBE1X, la quantité de BET ajoutée se situe entre 4 et 6 µl.

Produits utilisés : TBE10X dilué au 10ème
TBE10X : 162g de TRIS, 27.5g d'acide borique, 9.5g Na₂EDTA

Agarose : molecular biology grade, eurogenetec.

BET : Life Technologies

Le BET est à manipuler avec précautions car il peut endommager l'ADN humain. Port de gants obligatoires.

Préparation et dépôt des ADN amplifiés

A chaque échantillon d'ADN amplifié, est additionné 2µl de 10X Blue Loading Buffer, Life Technologie. Puis, on dépose 9µl de chaque mélange dans un puit correspondant du gel.

Dans les deux puits à l'extrémité du gel, on dépose les marqueurs de poids moléculaire, qui permettront de donner l'ordre de grandeur du poids moléculaire des portions de gènes amplifiés.

Les deux marqueurs utilisés sont :

- Le ladder100 de *GenSura*
- Le smart ladder d'EUROGENTEC

Produits utilisés : 10X Blue Loading Buffer : 65% (w/v) sucrose
10mM Tris HCl pH 7.5
10mM EDTA
0.3% bromophénol bleu

Migration

La migration est réalisée 170V, 200A pour une durée d'environ 1H30.

Observation sous UV

Une fois la migration achevée, les gels sont observés sous UV. Chaque fragment d'ADN amplifié donne une bande sur le gel. Une photo du gel est réalisée grâce à l'analyseur d'image BIO-PROFIL. Ensuite le gel pourra éventuellement être analysé grâce au logiciel BIO-1D++ de Vilber Lourmat.

II.4/ Transfert des produits d'amplification par RAPD

Lorsqu'une amorce RAPD donne un profil électrophorétique intéressant, le gel correspondant est transféré (Pocket Blotting) en vue de réaliser des sondes radioactives.

Matériel nécessaire

Membrane Nylon Hybond N+ RPN 303N Amersham
Papier Whatman 3MM
Papier absorbant
Plaque de verre ou de plexiglas
Sac plastique à autoclave
Robonet
Soudeuse
Trompe à vide

HCl 0.25N, 200ml qsp 1 gel
NaOH 0.5M+NaCl 1.5M, 200ml qsp 1 gel

SSPE 2X, 100ml qsp 1 gel

Procédure

Traitement du gel

- *Faire tremper dans HCl 0.25N pendant 10 mn sous agitation.*
- *Changer le bain d'HCl et laisser environ 10mn en fait jusqu'à ce que les colorations bleues deviennent jaunes.*
- *Rincer une fois avec H₂O mQ*
- *Faire tremper le gel sous agitation 2*20mn dans NaOH+NaCl : les colorations redeviennent bleues.*

Transfert

- *sur la plaque de verre poser 2 feuilles de papier Whatman dans NaOH+ NaCl puis la membrane humidifiée dans le même tampon et enfin le gel à l'endroit.*
- *sur une plaque de plexiglas déposer une bonne épaisseur de papier absorbant sec.*
- *Transférer l'ensemble papier Whatman, membrane et gel sur le plexiglas recouvert de papier absorbant*
- *Placer l'ensemble dans le sac en plastique au fond duquel a été introduit le robinet.*

- *Sceller le sac*
- *Mettre le vide puis fermer le robinet*
- *Laisser à RT jusqu'à ce que le gel soit bien retracts*

Conservation de la membrane

- *Récupérer la membrane et la rincer deux fois avec SSPE 2X.*
- *Laisser sécher la membrane sur Kimwipes.*
- *La conserver à RT en scellofrais.*

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1/ Dosage de l'ADN extrait

1.1/ Spectrophotométrie à 260nm et 280nm

Les résultats de l'extraction des 20 échantillons *d'Anophèles dirus* venus de la colonie du NIMPE de l'île d'Hainan, Chine du sud sont les suivants, les échantillons sont dilués au $10^{\text{ème}}$ dans de l'eau mQ pour l'analyse avec le spectrophotomètre :

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A260	0.0754	0.2234	0.091	0.1430	0.1539	0.2811	0.1596	0.2478	0.2009
A280	0.0415	0.1199	0.052	0.0936	0.0974	0.1782	0.0847	0.1417	0.1122
A260/A280	1.81	1.86	1.75	1.53	1.58	1.57	1.88	1.75	1.79
[ADN] au $10^{\text{ème}}$ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	3.77	11.17	4.55	7.15	7.69	14.05	7.98	12.39	10.045
[ADN] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	37.7	111.7	45.5	71.5	76.9	140.5	79.8	123.9	100.45

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0.165	0.1870	0.0742	0.1555	0.1228	0.1560	0.1247	0.2029	0.1426	0.0886	0.0959
0.0956	0.101	0.0443	0.0944	0.0696	0.1050	0.0699	0.1140	0.0803	0.0508	0.0563
1.73	1.85	1.67	1.65	1.76	1.48	1.78	1.78	1.77	1.74	1.70
8.25	9.35	3.71	7.77	6.14	7.8	6.23	10.14	7.13	4.43	4.79
82.5	93.5	37.1	77.7	61.4	78	62.3	101.4	71.3	44.3	47.9

Remarque : un exemple de profil de Densité Optique est donné en annexe

Résultat : Pour cette extraction la concentration moyenne d'ADN par tube est de $75.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$, cette valeur n'est pas très élevée, et dans la majorité des tubes l'importance des protéines restantes n'est pas négligeable.

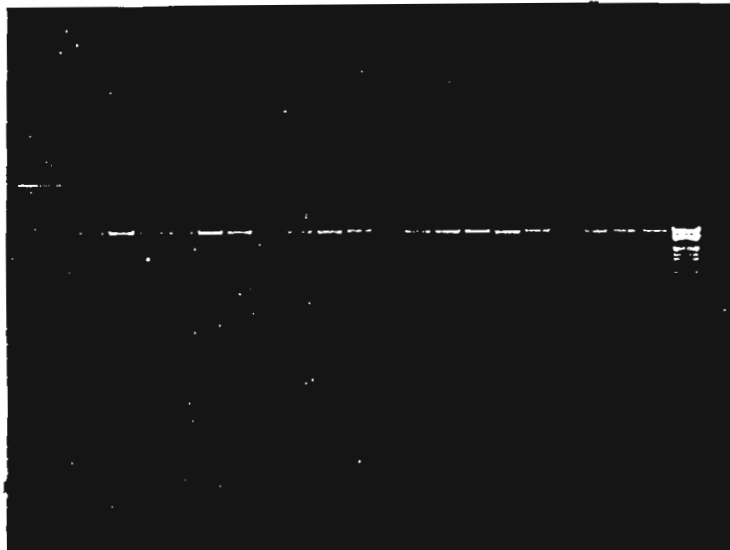
1.2/ Electrophorèse sur gel d'agarose

Nous avons comparé l'intensité relative et l'allure des bandes de migration.

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Intensité bande	++	+++	++	+	+	+	+++	++	++	+

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+++	+	+	++	+	++	++	++	++	+

Photo du gel correspondant aux *An dirus* - Ile d'Hainan - Chine du sud



Résultat : les intensités des bandes observées sur le gel sont bien parallèles aux valeurs de concentration d'ADN extrait pour les différents échantillons.

Conclusion

La concentration en ADN varie de 37.7 à 101.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. l'intervalle de concentration est large et les valeurs de concentrations sont assez faibles. Ces écarts de concentration se justifient d'un certain point de vue, par le fait que la réussite d'une extraction dépend de plusieurs paramètres : le manipulateur, son expérience, l'état des moustiques....

2/ Résultats du Random Amplified Polymorphic DNA – PCR

2.1/ Les amorces testées sur échantillons de référence

Nous avons testé les 25 amorces présentées ci avant sur 19 échantillons d'*An dirus* de Thaïlande reçus comme référence ou que nous suspicions fortement appartenir à une espèce donnée (A,B,C,D ou F) du complexe *An dirus* de Thaïlande.

Famille du complexe <i>An dirus</i> de Thaïlande	Echantillons testés
A	<ul style="list-style-type: none">• 3 échantillons de référence• boîte V- échantillon ES 327 ES 176 ES 218
B	<ul style="list-style-type: none">• 3 échantillons B de référence
C	<ul style="list-style-type: none">• 2 échantillons C de référence• boîte III – échantillon ET 145 ET 18 ET 100
D	<ul style="list-style-type: none">• 1 échantillon D de référence• boîte IV – échantillon EP 12 EP 6A sang EP 10A sang EP 9

Remarque : les échantillons classés comme ES sont censés appartenir à l'espèce A, les ET à l'espèce C, et les EP à l'espèce D. Les échantillons de référence ont été classés par des techniques autres que celles basées sur la biologie moléculaire, telles que la morphologie, la zone géographique, etc...

2.2/ Résultats des amplifications et homogénéité des profils

Sur les 25 amorces testées , il y a 8 amorces qui n'amplifient pas ou faiblement.

Amplification faible	F5 F7 F20 P4 M15 M20
Pas d'amplification	F11 F17 M8

Mais les amorces qui ont donné un produit d'amplification ne sont pas toutes des amorces discriminantes. C'est à dire qu'elles ne permettent pas toujours d'opérer une différenciation nette entre les différentes espèces A, B, C, D du complexe.

Le tableau suivant tente de montrer quand une amorce permet de distinguer toutes les familles ou seulement certaines.

amorce	F2	F4	F5	F6	F7	F8	F11	F13	F17	F20
Amplification	+	++	-	+++	++	--	---	++	---	--
Homogénéité des profils A	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui		Oui		
Homogénéité des profils B	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui		Non		
Homogénéité des profils C	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui		Oui		
Homogénéité des profils D	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui		Oui		Oui

Amorce	P2	P4	P5	P14	P37		B7	B10
Amplification	+	-	+	+++	++		+	++
Homogénéité des profils A	Non	Non	Non	Oui	Oui		Oui	Oui
Homogénéité des profils B	Oui	Oui	Non	Oui	Oui		Non	Oui
Homogénéité des profils C	Non	Non	Oui	Oui	Oui		Non	Oui
Homogénéité des profils D	Oui	Non	Oui	Oui	Oui		Non	Oui

Amorce	M8	M12	M13	M15	M17	M20		A5	A10
Amplification	---	+++	++	--	+	-		++	++
Homogénéité des profils A			Non	Non	Oui	Oui		Oui	Oui
Homogénéité des profils B			Oui	Non	Non	Non		Oui	Non
Homogénéité des profils C		Oui	Oui		Oui	Non		Oui	Oui
Homogénéité des profils D		Oui	Oui	Non	Oui	Oui		Oui	Oui

- +++ très bonne amplification
- ++ bonne amplification
- + moyenne amplification
- amplification faible
- amplification très faible
- pas d'amplification visible

Les échantillons qui ont le plus souvent du mal à amplifier sont les échantillons B

Les échantillons D de manière générale amplifient bien quelque soit l'amorce et donnent des profils homogènes.

Les échantillons de références ont posés des problèmes. Ils amplifiaient beaucoup plus difficilement que les échantillons restants, et donnaient parfois des profils sensiblement différents. Ce résultat est étrange car tous les échantillons utilisés pour le screening des amorces RAPD sont de Thaïlande et ne devraient pas révéler de différences manifestes à l'intérieur d'une même espèce.

2.3/ Sélection des amorces discriminantes

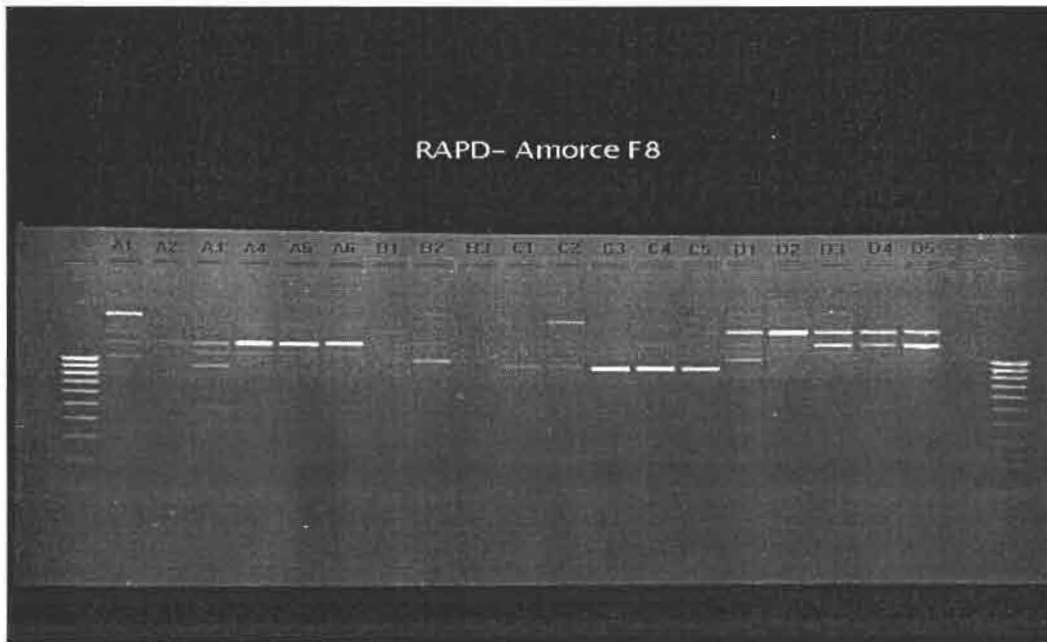
Les amorces qui donnent des résultats intéressants pour les 4 espèces simultanément sont les amorces : A5, B10, P 37, P14, F6, F8

Mais ces amorces ne sont pas toutes discriminantes. Il faut comparer les 4 profils des 4 espèces A, B, C, D entre eux pour voir s'il existe des bandes spécifiques permettant de distinguer les espèces les unes des autres.

Nous avons fini par sélectionner 4 amorces qui semblent discriminantes :

A5, F6, F8, P14

2.3.a/ résultat amorce F8



AMORCE	BANDE	ESPECE A						BANDE	ESPECE B		
F8		1	2	3	4	5	6		1	2	3
	1630 bp					5	6	1830 bp	1	2	
	1300 bp	1	2	3	4	5	6				
	1120 bp			3	4		6				

BANDE	ESPECE C					BANDE	ESPECE D				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
890 bp	1	2	3	4	5	1820 bp	1	2			
						1530 bp	1	2	3	4	5
						1300 bp	1	2	3	4	5
						1130 bp	1		3		

Résultats

L'amorce F8 est discriminante pour les 4 espèces A,B,C, D.

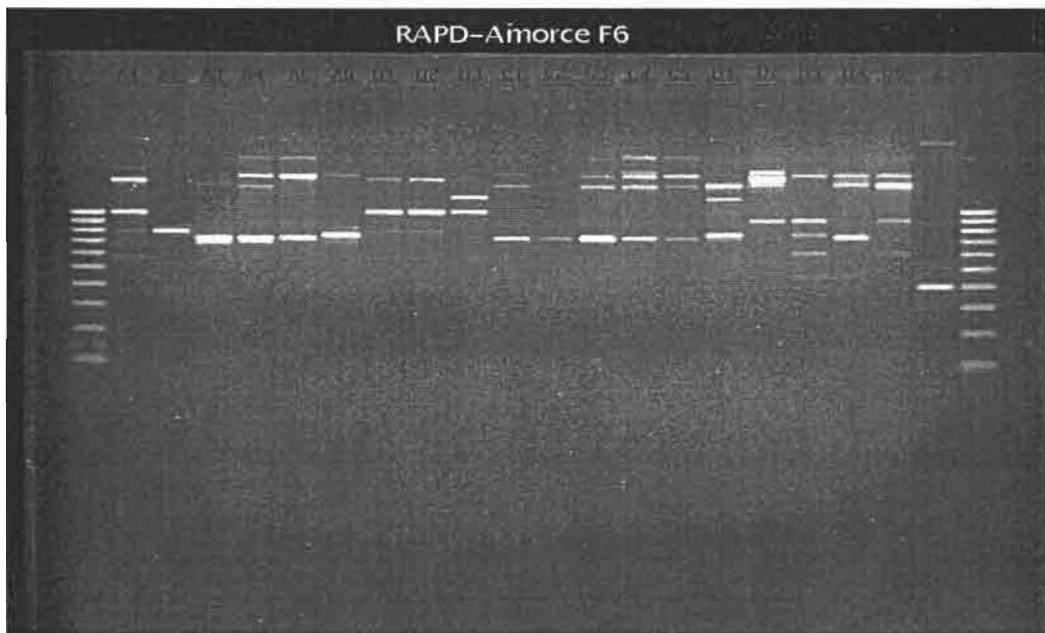
La bande à 1300 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* A.

La bande à 1830 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* B.

La bande à 890 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* C.

La bande double à 1530 bp et 1300 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* D.

2.3.b/ Résultat amorce F6



AMORCE	BANDE	ESPECE A						ESPECE B						
F6		1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
	700 bp			3	4	5	6	561 bp	1	2	3			
	1500 bp				4	5	6	770 bp	1	2				
	1729 bp				4	5		1014 bp	1	2	3			
								1443 bp	1	2				

BANDE	ESPECE C					BANDE	ESPECE D				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
720 bp	1	2	3	4	5	600 bp			3		5
1350 bp	1		3	4	5	740 bp	1		3	4	
1475 bp			3	4	5	900 bp		2	3		5
1720 bp				4	5	1480 bp	1	2	3	4	5

Résultats

L'amorce F6 est discriminante pour les 4 espèces A,B,C, D.

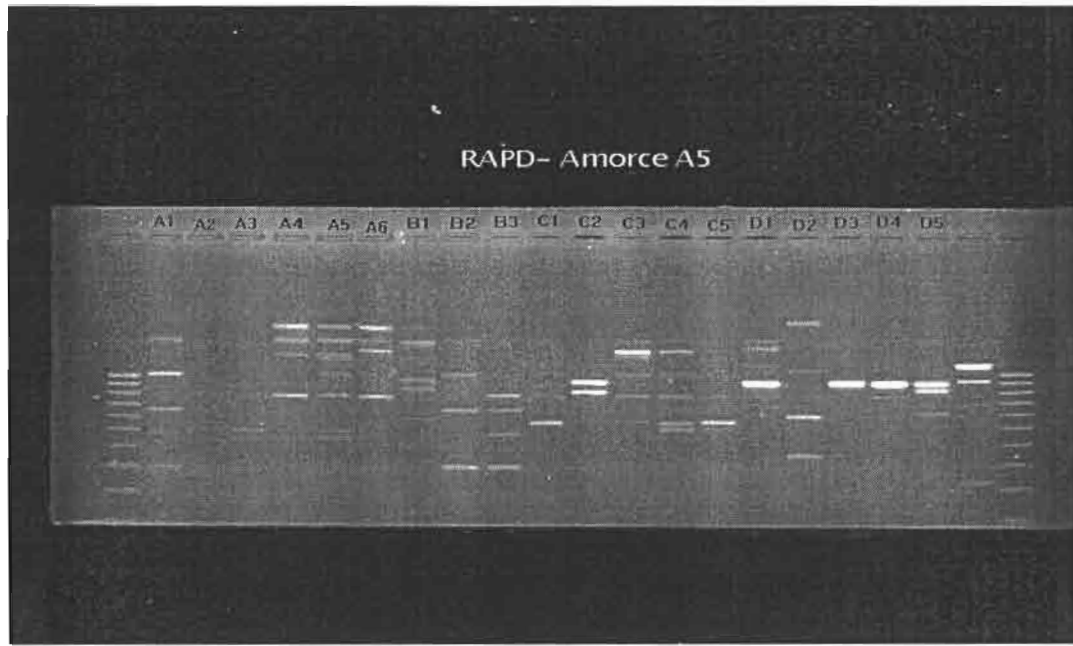
La bande à 700 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* A.

La bande à 1014 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* B.

La bande à 720 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* C.

La bande à 1480 bp est spécifique de la famille *An.dirus* D.

2.3.c/ Résultat amorce A5



AMORCE	BANDE	ESPECE A						BANDE	ESPECE B		
		1	2	3	4	5	6		1	2	3
A5	1620				4	5	6	640		2	3
	1450	1			4	5	6	463		2	3
	1280				4	5		290	1	2	3
	770		2		4	5	6				
	490			3		5					
	448			3		5					
	290	1	2								

BANDE	ESPECE C					BANDE	ESPECE D				
	1	2	3	4	5		2	3	4	5	
1300			3	4	5	880	2	3	4	5	
1020	1		3	4							
700	1	2	3	4	5						
540	1		3	4	5						

Résultats

L'amorce A5 est discriminante pour les 4 espèces A,B,C, D.
 Les bandes à 1620 bp et 1450 bp sont spécifiques de l'espèce *An.dirus* A.
 La bande à 290 bp est spécifique de la famille *An.dirus* B.
 La bande à 700 bp est spécifique de la famille *An.dirus* C.
 La bande à 880 bp est spécifique de la famille *An.dirus* D.

2.3.d/ Resultat amorce P14



AMORCE	BANDE	ESPECE A						ESPECE B			
A5		1	2	3	4	5	6		1	2	3
	1180			3	4	5	6	500	1	2	3
	950	1	2	3	4	5	6	350	1	2	3
	510	1	2	3	4		6	250	1	2	3

BANDE	ESPECE C					BANDE	ESPECE D				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
600	1	2		3		1070	1	2	3	4	5
						700			3		5
						420	1	2	3	4	5

Résultats

L'amorce P14 est discriminante pour les 4 espèces A,B,C, D.

La bande à 950 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* A.

Les bandes à 500 bp, 350 bp et 250 bp sont spécifiques de l'espèce *An.dirus* B.

La bande à 600 bp est spécifique de l'espèce *An.dirus* C.

Les bandes à 1070 bp et 420 bp sont spécifiques de l'espèce *An.dirus* D.

2.4 / Différenciation des espèces d'*An dirus* par RAPD-PCR

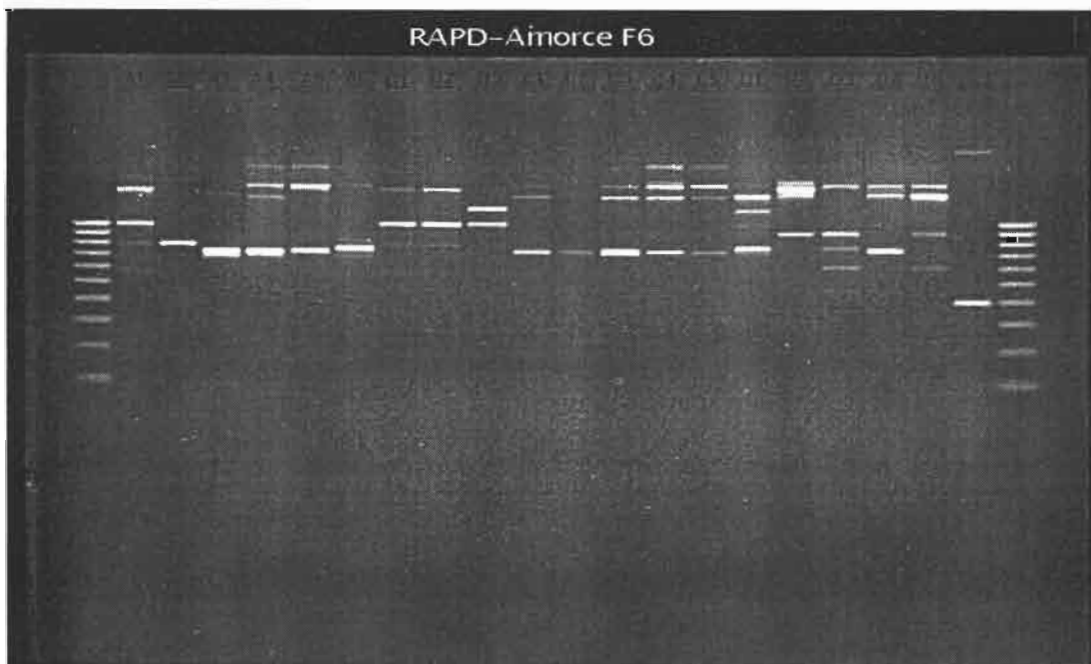
Une fois ces 4 amorces discriminantes sélectionnées , nous avons choisi parmi les échantillons ci - dessus ceux qui donnaient les profils électrophorétiques de meilleure qualité, afin de les utiliser comme référence dans la suite du travail. Nous avons choisi deux références par espèces.

Puis nous avons testé ces amorces sur l'ensemble des échantillons listés dans la partie matériel et méthode, afin de tenter de les différencier par famille en les comparant aux références sélectionnées.

Espèce	Boîte	Echantillon
A	V	ES 327 ES 176
B		A1 référence B2 référence
C	III	ET 145 ET 18
D	IV	EP 6A sang EP 10A sang

Nous avons choisi A1 comme référence de la famille B, car par rapport aux résultats précédents, cet échantillon présentait un profil largement plus proche de B que de A.

Exemple : RAPD amorce F6



Comparaison des bandes caractéristiques des références A1, B1, B2, B3

A1	B1	B2	B3
1586 bp	1657 bp		
1429 bp	1443 bp	1443 bp	
1014 bp	1000 bp	1000 bp	1014 bp
800 bp	788 bp	788 bp	
569 bp	569 bp	553 bp	553 bp

Nous avons testé les 4 amorces discriminantes sur :

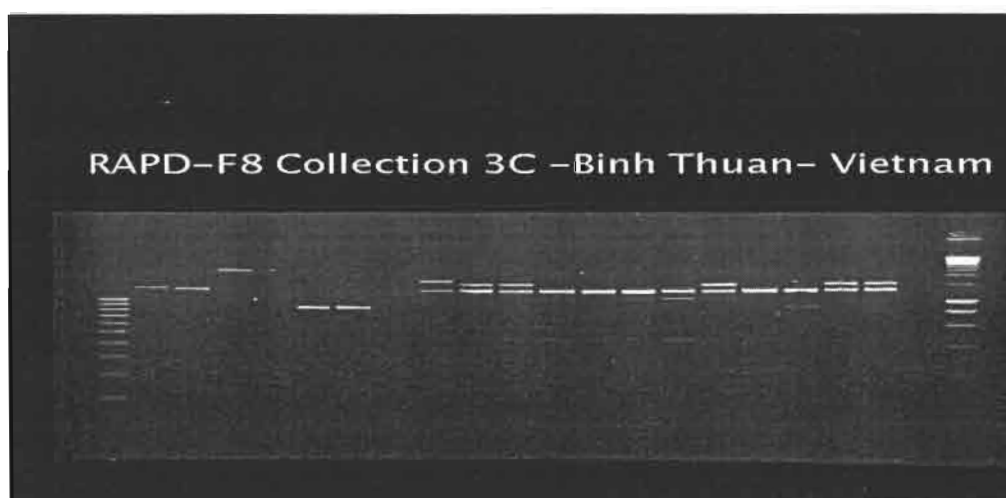
- 22 échantillons de la collection 3C du village Binh Thuan du Vietnam
- 20 échantillons de la collection NIMPE de l'île d'Hainan en Chine du sud
- 15 échantillons ES du nord de la Thaïlande
- 8 échantillons EP du sud de la Thaïlande
- 15 échantillons ET du sud de la Thaïlande

Pour les échantillons du Vietnam et de Chine du sud, nous avons utilisés les références choisies, alors que pour les échantillons de Thaïlande, au vue du peu d'amplification des échantillons de références , nous avons déposé pour une même amorce les échantillons ES, EP et ET simultanément .

Nous avons eu des problèmes avec les références sélectionnées qui amplifiaient assez mal. Dans la plupart des cas nous ne pouvions pas dire si les échantillons testées appartenaient ou non à une espèce donnée. Par contre, il est clair que les échantillons des même espèces donnent des profils très proches.

2.4.a/ Amorce F8

Collection 3C- Binh Thuan- Vietnam



E chant.	A	A	B	B	C	C	D	D	3C542
Bandes (bp)	1280	1260	1680 1020		843	829		1420 1100	1200

3C561	3C563	3C565	3C566	3C567	3C568	3C569	3C586	3C587	3C590
1180	1180	1160	1160	1160	1200	1320	1200	1220	1220

Tous les spécimens de la collection 3C donnent des profils électrophorétiques équivalents. Pour chaque spécimen 3C, il y a une bande spécifique de cette famille autour de 1200 bp. Cette bande n'est pas très éloignée de celle à 1260 bp environ des échantillons A de référence.

Collection NIMPE – Ile d'Hainan– Chine du sud

E chant.	A	A	B	B	C	C	D	D	IMPE1
Bandes (bp)		1180	1720 1280		883	866	1460 1240	1440 1240	1220

IMPE2	IMPE3	IMPE4	IMPE5	IMPE6	IMPE7	IMPE8	IMPE9	IMPE10
1200	1200	1180	1180	1160	1180	1160		1200



Cette amorce F8 est extrêmement intéressante, elle permet clairement de faire la différence entre les différents échantillons ES, EP et ET, qui sont censés appartenir aux fespèces A, B, C. chaque espèce possède au moins une bande spécifique qui permet de la distinguer des autres sans hésitation.

Echant	ES 336	ES106	ES163	ES288	ES330	ES233	ES128	ES 311	ES 133
Bande (bp)	1213	1200	1213	1213	1200	1200	1188	1200	1200

Echant	EP12	EP6A	EP10A	EP9	EP3	EP4	EP11A	EP2A
Bande (bp)	1375	1400	1398	1388	1363	1363	1375	1388

Echant	ET87 P	ET65P	ET51P	ET13P	ET78P	ET32P	ET35P	ET49P	ET65C	ET51C
Bande (bp)	919	903	903	1483 919	1524 919	1524 903	888	888	903	888

Conclusions

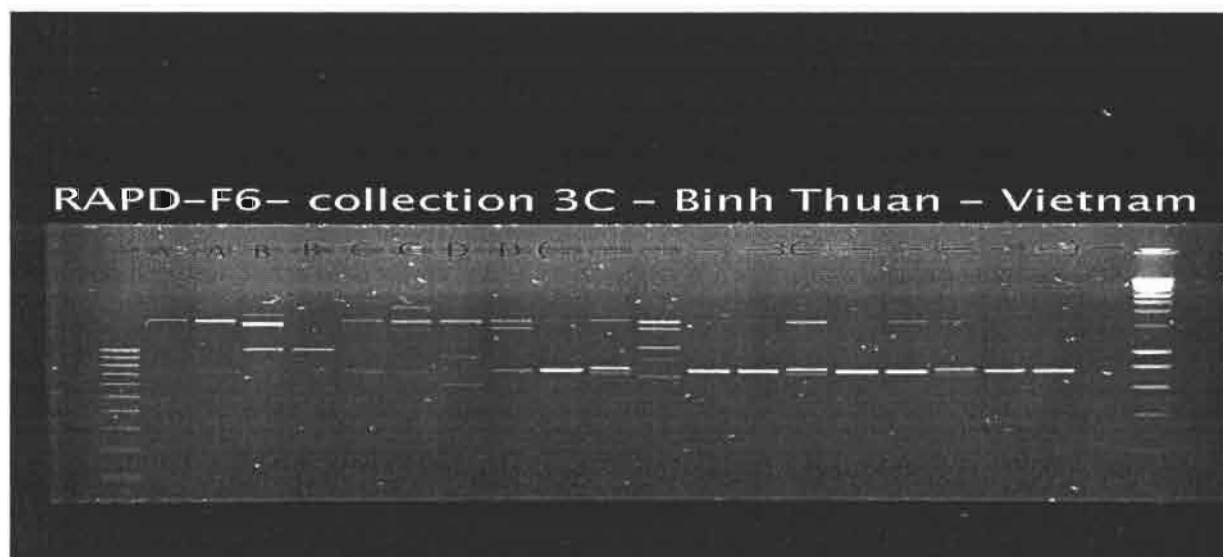
La famille A présente une bande spécifique avec l'amorce F8 située autour de 1200 bp.

La famille B présente une bande spécifique avec l'amorce F8 située autour de 1400 bp.

La famille C présente une bande spécifique avec l'amorce F8 située autour de 900 bp, parfois il y a deux bandes une à 900bp et l'autre autour de 1500 bp.

2.4.b/ Amorce F6

Collection 3C Vietnam

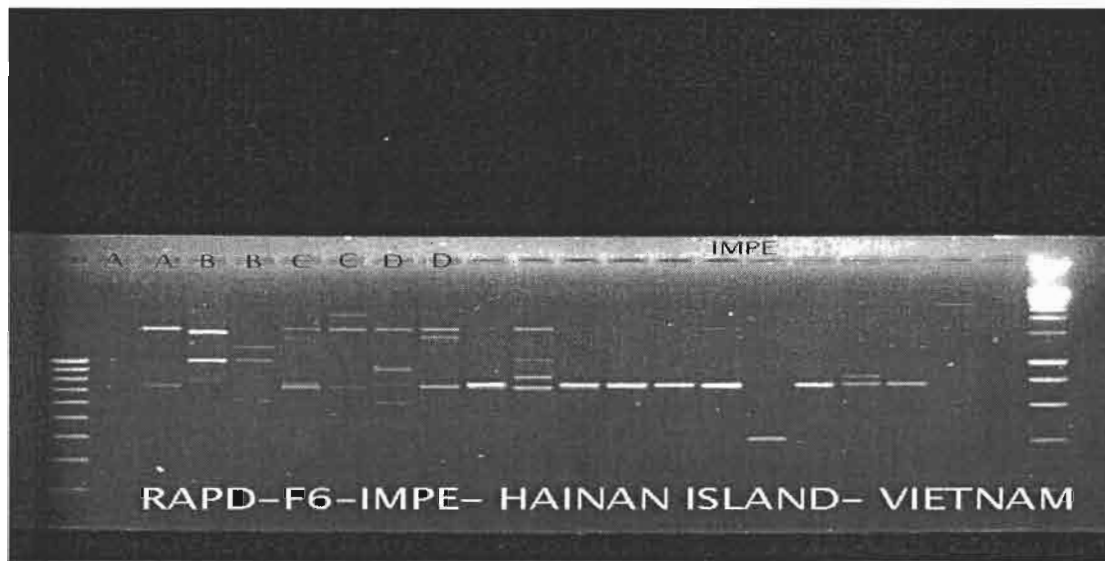


E chant.	A	A	B	B	C	C	D	D	3C542
Bandes (bp)	1457 739	1143 729	1400 1029	1400 1029	1443 1343 739	1443 1329 739	1443 914	1457 1343 749	1443 749

3C561	3C563	3C565	3C566	3C567	3C568	3C569	3C586	3C587	3C590
1457 769		1429 739	1429 739	1429 759	1429 729	1443 739	1429 759	739	739

L'amorce F6 semble également confirmer l'appartenance à la famille A des échantillons 3C. On retrouve les bandes autour de 1440 bp et 750 bp, semblables à celles des échantillons A de référence.

Collection IMPE-Ile d'Hainan – Chine du sud



E chant.	A	A	B	B	C	C	D	D	IMPE1
Bandes (bp)		1438 744	1388 1025	1188 1013	1425 1325 726	1413 1325 726	1413 900 26	1413 1325 726	1425 744

IMPE2	IMPE3	IMPE4	IMPE5	IMPE6	IMPE7	IMPE8	IMPE9	IMPE10
1425 717	1425 735	735	735	1413 735		744	754	754

Avec l' amorce F6, nous pouvons identifier les échantillons de la collection IMPE comme appartenant à l'espèce A. On retrouve les bandes caractéristiques déjà observées avec la collection 3C autour de 1425 bp et 740 bp.

2.4.c/ Amorces A5 et P14

Ces amorces n'ont pas donné de bons résultats pour les spécimens de références, il était donc impossible d'identifier l'espèce d'appartenance des échantillons. Cependant, l'homogénéité des profils observés selon les groupes de spécimen, confirme que les spécimens d'un même village semblent appartenir à une même espèce.

Les gels concernant ces amorces sont donnés en annexe.

2.5/ Conclusion

- Grâce à ces différentes amorces nous avons pu observer que les spécimens d'un même village semblaient appartenir à la même espèce.

Les amorces F6 et F8 semblent être réellement discriminantes. En analysant leur profil électrophorétique, il est possible de distinguer les espèces A, B, C.

Amorce F8

Espèce	Bandes caractéristiques
A	1200 bp
B	1400 bp
C	1500 bp 900 bp

Amorce F6

Cette amorce donne une à deux bandes caractéristiques de l'espèce A autour de 700bp et 1400bp.

- Cependant la difficulté d'interprétation de cette technique de différenciation d'espèces vient du fait qu'autour de bandes bien spécifiques, il y a d'autres bandes variables d'un spécimen à l'autre et qui compliquent la lecture. Ainsi les amorces A5 et P14 donnent des résultats trop complexes et qui ne semblent pas toujours discriminants. Cependant l'amorce F8 donne des profils assez simples et qui permettent bien de différencier les espèces A, B, C.

Transfert d'ADN amplifié par Pocket- Blotting

- L'idée suivante a donc été de transférer ces produits d'amplification sur des membranes de nylon, afin de pouvoir ensuite réaliser, à partir de fragments intéressants transférés, des sondes radioactives. En fait l'analyse du polymorphisme RAPD se fonde sur l'homologie de fragments migrant à la même position. Pour cela un fragment d'ADN de référence qui migre à la même position chez les spécimens à tester sera purifié et utilisé comme sonde marquée pour tester leur homologie de séquence.

Ainsi nous avons transféré les produits d'amplification sur membrane de nylon par pocket- blotting et les hybridations avec des sondes seront faites ultérieurement.

Mise en œuvre de la technique AS-PCR

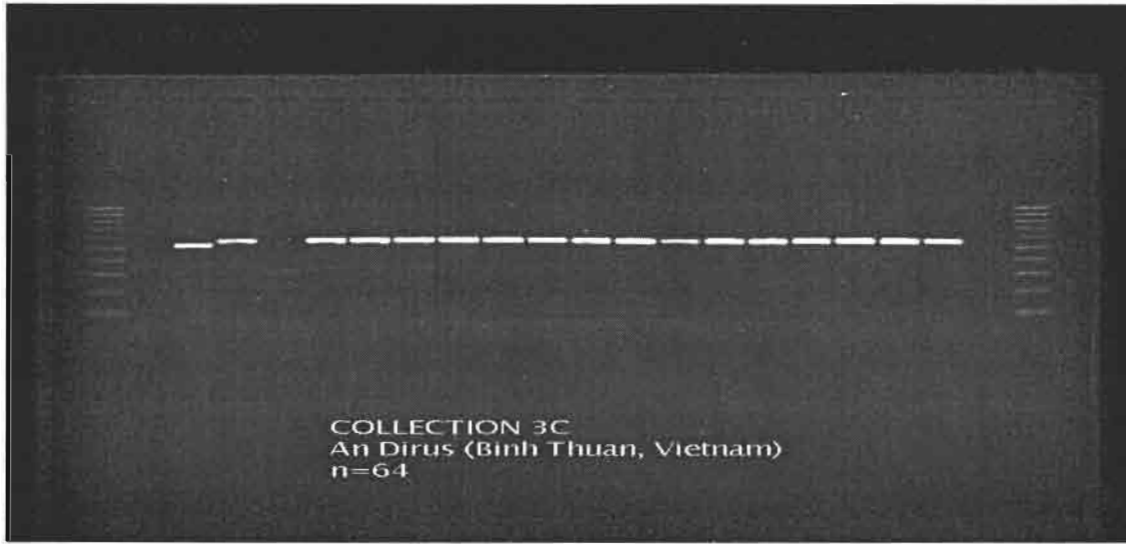
- Au vue des résultats précédents, nous avons pensé qu'il serait intéressant de confronter nos résultats à ceux donnés par une autre technique sur les mêmes échantillons. Nous avons utilisé l'AS-PCR en référence aux travaux de C.Walton et al.(1999).

3/ Résultats de l'Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR)

3.1/ AS-PCR sur les échantillons testés en RAPD

3.1.a/ Collection 3C

Nous avons testé les mêmes échantillons en AS-PCR que ceux testés en RAPD. Pour la collection 3C du Vietnam les résultats sont les suivants.



nom échantillon	pays	espèce	quantité utilisée (en µl)	Bandes (bp)	résultat electrophorèse
Ref.C	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	352	espèce C
Ref.B.	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	517	espèce B
Ref.A	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	563	espèce A
Ref.D	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	326	espèce D
3C 523	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 524	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 529	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 531	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 532	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	581	espèce A
3C 533	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	581	espèce A
3C 534	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 535	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 536	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 537	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 539	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	563	espèce A
3C 540	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 542	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 561	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	572	espèce A
3C 563	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	563	espèce A
Ref.C	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	361	espèce C
Ref.B.	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	534	espèce B
Ref.A	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	570 361	espèce A
Ref.D	Thaïlande	<i>An. Dirus</i>	2	320	espèce D
3C 565	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	564	espèce A
3C 566	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	564	espèce A
3C 567	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	576	espèce A
3C 568	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	576	espèce A
3C 569	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	576	espèce A
3C 586	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	576	espèce A
3C 587	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	576	espèce A
3C 590	Vietnam	<i>An. Dirus</i>	2	576	espèce A

Conclusion

Les spécimens de la collection 3C appartiennent tous l'espèce A, ce qui va bien dans le sens des conclusions obtenues en RAPD-PCR.

3.1.b/ Collection NIMPE-Ile d'Hainan – Chine du sud

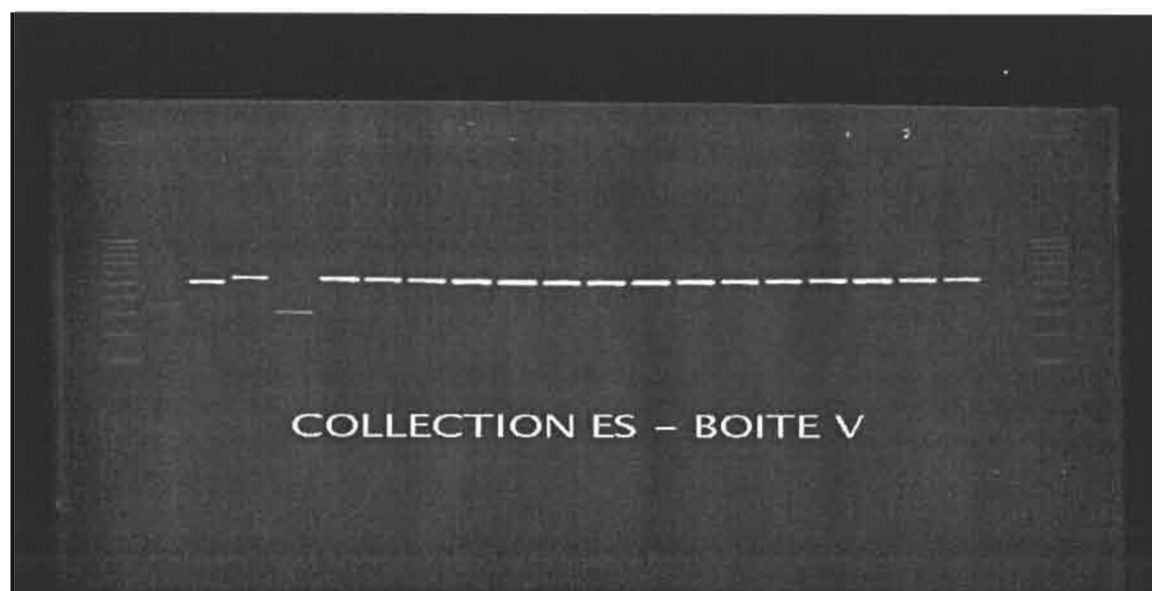
nom echantillon	pays	espèce	quantité utilisée (en µl)	résultat electrophorèse	Bandes (bp)
Ref A	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	579
Ref B	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	519
Ref C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce C	347
Ref D	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce D	315
1	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	579
2	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	561
3	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	561
4	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	541
5	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	541
6	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	541
7	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	non déposé	
8	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	561
9	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	561
10	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	520
11	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	non déposé	
12	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	541
13	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	541
14	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	561
15	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	541
16	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	561
17	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	580
18	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	580
19	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	580
20	Chine du sud	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	580

Conclusion

On retrouve que les échantillons appartiennent à l'espèce A.

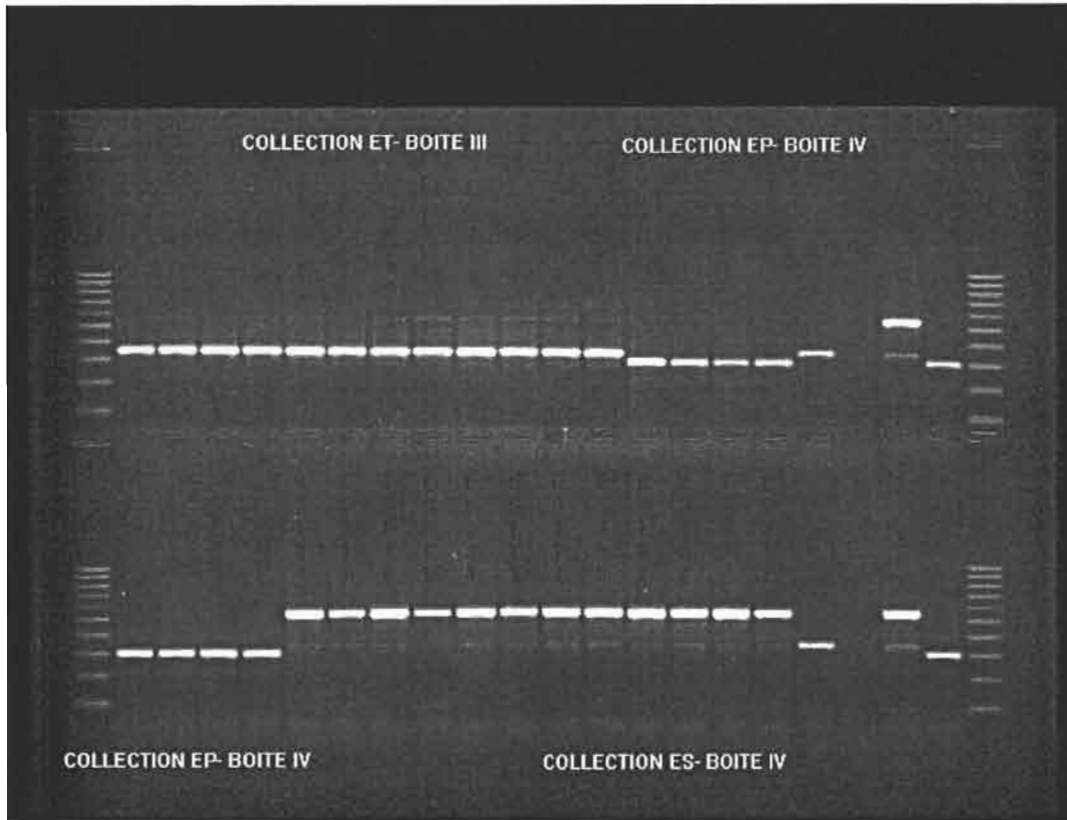
3.1.c/ Echantillon ES EP ET – Thaïlande

Collection ES – boîte V



Nom echantillon	pays	espèce	quantité utilisée (en µl)	résultat électrophorèse	Bandes (bp)
Ref A	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	563 349
Ref B	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	517
Ref C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce C	355
Ref D	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce D	305
ES-327	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	544
ES-176	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	535
ES-218	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	526
ES-336	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	517
ES-106	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	517
ES-299	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	517
ES-203	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	517
ES-259	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	526
ES-163	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	517
ES-298	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	526
ES-330	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	526
ES-146	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	526
ES-223	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	535
ES-340	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	535
ES-109	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	544

Collection ES IV, collection EP IV



Nom echantillon	Pays	Espèce	quantité utilisée (en µl)	Résultat Electrophorèse	Bandes (bp)
Ref A	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	565 348
Ref B	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	
Ref C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce C	357
Ref D	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce D	300
ES-128	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554
ES-311	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	565
ES-137	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554
ES-255	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	565
ES-334	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554
ES-119	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554
ES-313	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543
ES-399	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554

ES-187	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543
ES-167	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	521
ES-261	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543
ES-212	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543

Ref A	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 357
Ref B	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	
Ref C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce C	357
Ref D	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce D	300
EP-12	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	300
EP-6A sang	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	308
EP-10A sang	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	300
EP-9	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	308
EP-3	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	300
EP-4A	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	300
EP-11A sang	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	300
EP-2A sang	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	300

Conclusion

Les échantillons ES appartiennent à l'espèce A, les échantillons EP à l'espèce B. Ce sont les mêmes conclusions que l'on avait également obtenu en RAPD avec l'amorce F8.

Echantillon ET – boîte II

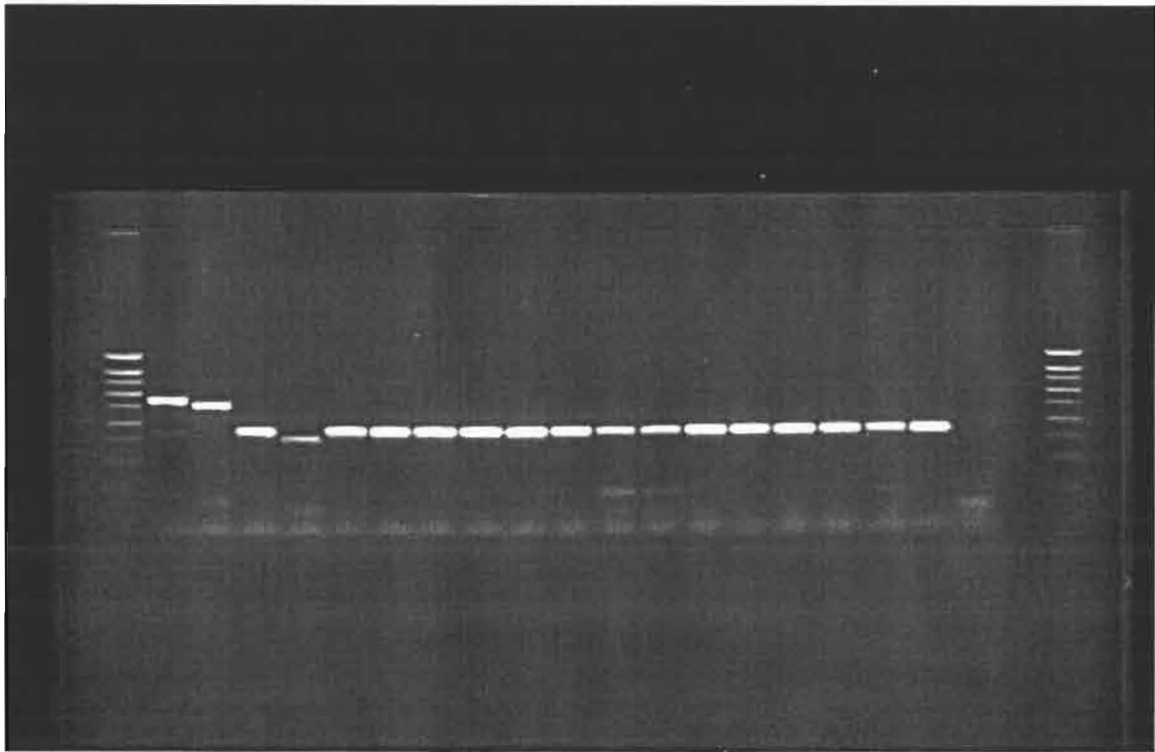


Nom échantillon	pays	espèce	quantité utilisée (en μ l)	résultat électrophorèse	Bandes (bp)
Ref A	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 334
Ref B	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce B	510
Ref C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce C	337
Ref D	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce D	293
ET92P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 329
ET87P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 337
ET65P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 337
ET51P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 329
ET13P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 329
ET60P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 329
ET78P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 337
ET32P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 337
ET35P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 337
ET149P	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	543 337
ET92C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 337
ET87C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 337
ET65C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 337
ET51C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 344
ET13C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554 352

Nous avons eu un problème avec cette PCR, car il est impossible de dire si les échantillons appartiennent à l'espèce A ou à l'espèce C.

Nous avons modifié les conditions de la PCR, en utilisant deux fois plus d'amorces (DU=1.445 μ l, DB= 1.572 μ l, DD= 1.152 μ l, DF= 0.87 μ l, DAC= 1.8 μ l) ce qui nous a permis de conclure que ces échantillons appartiennent à l'espèce A. Ce problème pouvait provenir d'une trop faible quantité d'ADN des échantillons, d'où la nécessité d'augmenter la quantité d'amorces.

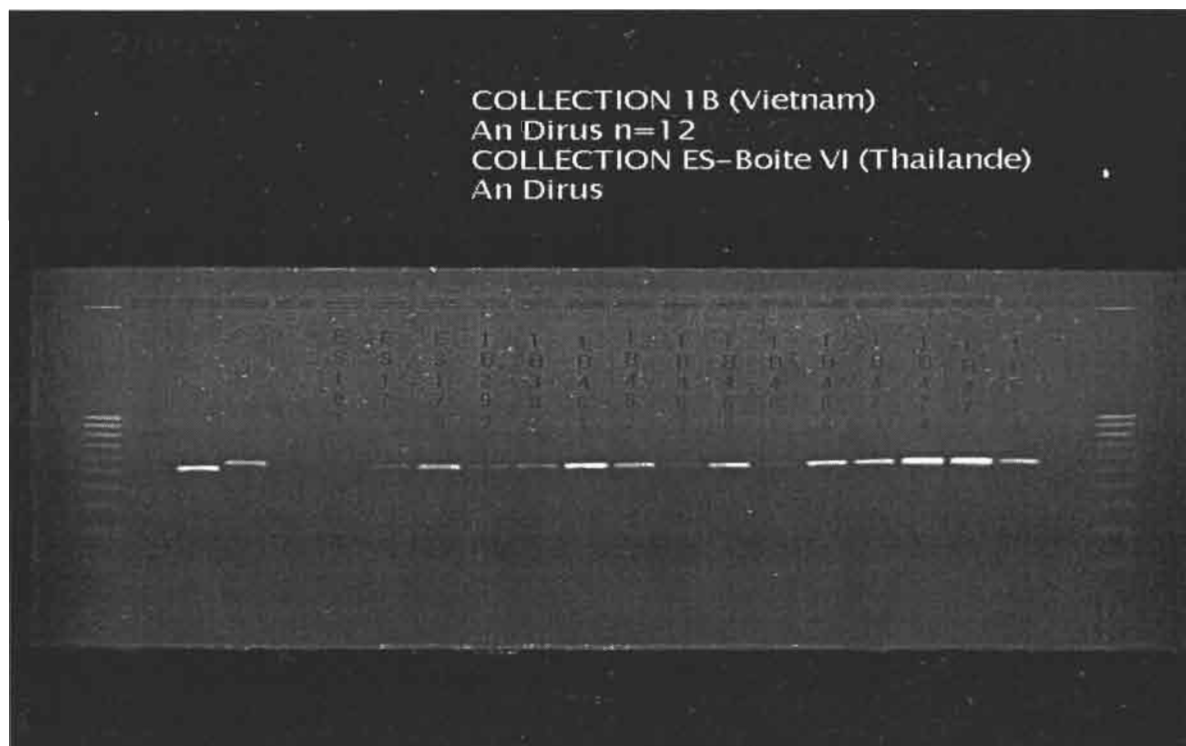
Electrophorèse échantillon ET- boîte II



Le fait d'utiliser deux fois plus d'amorces permet de différencier les spécimens, mais entraîne également ici la présence d'un front d'oligonucléotides. Les amorces qui n'ont pas été utilisées lors de la PCR forment des polymères de faible poids moléculaire qui migrent sur le gel. Ceci dit, le front d'oligonucléotides se différencie facilement des bandes étendues du fait de l'aspect flou et de faible intensité visible en bout de gel (voir photo).

3.2/ AS-PCR sur de nouveaux échantillons

Nous avons également testé cette technique sur d'autres échantillons ES EP ET, ce qui nous a donné des résultats similaires. Les échantillons ES appartiennent à l'espèce A, les échantillons EP à l'espèce D, et les échantillons ET à l'espèce C ; ainsi que sur d'autres échantillons de Thaïlande (Collection 1B).



nom échantillon	pays	espèce	quantité utilisée (en µl)	résultat électrophorèse	Bandes (bp)
Ref A	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	449
Ref B	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	510
Ref C	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554
Ref D	Thaïlande	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	288
1B-299	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	527
1B-307	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	527
1B-451	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	527
1B-452	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	536
1B-453	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	527
1B-466	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	536
1B-467	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	536
1B-468	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	536

1B-473	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	545
1B-474	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	545
1B-475	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554
1B-529	Vietnam	<i>An.Dirus</i>	2	espèce A	554

Conclusion

Ces échantillons de Thaïlande appartiennent tous également à l'espèce A.

3.3/ Problèmes courants rencontrés avec l'AS-PCR. Quelques solutions

Quelques problèmes courants

La PCR est un outil à mettre au point avant qu'elle ne soit pleinement performante. Et il a fallu ajuster les conditions pour avoir la meilleure optimisation, et également manipuler avec beaucoup de soins.

Une liste non exhaustive des surprises que l'on a observées à la fin d'une PCR :

- Il n'y a pas de produit amplifié.
- Le produit amplifié existe, mais au vue de l'intensité très faible des bandes il a été mal amplifié.
- La quantité d'amorces est trop importante, les amorces polymérisent les unes avec les autres, et au sommet du gel d'agarose se trouve un front large caractéristique : un front d'oligonucléotides.
- Des bandes non spécifiques sont présentes sur le gel. Les amorces ne se sont pas fixées uniquement autour de la séquence d'ADN spécifique à amplifier.
- Le témoin négatif est en fait positif. Il y a eu contamination des différents tubes entre eux ou par de l'ADN étranger.

Quelques solutions

Afin d'optimiser les résultats PCR, il a fallu jouer sur tous les différents paramètres (températures des cycles, durée des étapes, concentrations des réactifs).

La PCR sera dite 'optimisée' si elle vérifie les conditions suivantes :

- Sensibilité : comparaison des résultats obtenus par deux méthodes différentes.
- Spécificité : les bandes obtenues sont spécifiques et ne constituent pas des artéfacts.

- Reproductibilité : la même manipulation menée dans les mêmes conditions redonnera les mêmes résultats.

Modification des différents facteurs

Le problème souvent pour optimiser un résultat PCR vient du fait que l'ensemble des paramètres sont dépendants et leur modification a une influence également sur les autres paramètres.

- La quantité de Taq polymerase utilisée est très importante. Il faut une quantité suffisante pour avoir l'amplification, et pour observer des bandes importantes sur gel d'électrophorèse. En effet, l'intensité des bandes observée est directement liée à la quantité d'ADN amplifié obtenu et donc à la quantité de Taq incorporée. Cependant une quantité trop élevée de Taq peut conduire à l'obtention de produits non spécifiques. Couramment la concentration de Taq est d'environ 5 unités par μl .

- La maîtrise de la quantité d'amorces est primordiale. Il est nécessaire de sélectionner des amorces spécifiques et efficaces. Il faut à la fois une quantité suffisante d'amorces pour observer l'amplification mais aussi pas trop élevée pour ne pas observer un front d'oligonucléotides par polymérisation des amorces.

Certaines amorces sont à bannir :

- Toutes amorces qui possèdent des terminaisons 3' complémentaires et qui donnent facilement des dimères d'amorces (artéfacts) .
- Les amorces à séquences palindromiques. Etc...

Par contre, mieux vaut choisir des amorces avec un G+C% élevé (>45%), l'accrochage des amorces sur le fragments d'ADN n'en sera que meilleur car les liaisons hydrogène seront plus importantes.

- Le nombre de cycles ne doit pas être choisi au hasard. Un nombre trop important de cycles donnera beaucoup de produits non spécifiques parasites alors qu'un nombre trop faible de cycles entraînera un faible rendement d'amplification.
- Pour obtenir les produits les plus spécifiques , il faut contrôler l'étape d'annealing des amorces. Une température plutôt élevée d'annealing et d'extension, ainsi que des concentrations équilibrées entre les dNTP et Mg_2^+ donnent des produits PCR assez spécifiques.

3.4/ Conclusion AS-PCR

Cette technique nous a bien permis de vérifier les résultats obtenus en RAPD-PCR. Nous avons pu différencier 4 différentes espèces du complexe *An. dirus* en Asie du sud-est. Pour l'espèce A on obtient une bande spécifique autour de 550 bp, pour l'espèce B autour de 520 bp, pour l'espèce C autour de 350 bp et l'espèce D autour de 320 bp. Les résultats obtenus sont clairs et lisibles. Toutefois ils sont moins complets que ceux obtenus avec la RAPD-PCR. Ils ne permettent pas par exemple d'observer des différences au sein d'une même espèce, ce qui est possible avec la RAPD-PCR qui donne des profils électrophorétiques plus complexes.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Au cours de ce stage , j'ai été initiée à la technique de PCR, qui occupe une place de choix en biologie moléculaire. De part sa grande sensibilité, une attention particulière doit être portée sur les procédures expérimentales pour éviter les résultats faussement positifs.

L'intérêt de la technique RAPD réside dans la diversité génétique qu'elle génère entre les espèces et les groupes d'individus étudiés. Au cours de notre travail des marqueurs RAPD polymorphes ont été générés(amorce F8). Un autre intérêt réside dans la possibilité de tester un grand nombre d'amorces. Les résultats obtenus rendent plus robustes les subdivisions génétiques qui en découlent.

Cependant l'inconvénient majeur de la technique RAPD est lié à la sensibilité du test. Toute légère modification dans les différentes composantes réactionnelles peut changer notablement les profils des marqueurs RAPD. D'où l'idée de développer des sondes spécifiques découlant des marqueurs RAPD et appelés SCAR (Sequence Characterized Amplified Reaction).

Sur l'ensemble des amorces testées , un certain nombre nous ont permis de différencier les 4 espèces d'*Anophèles dirus* étudiés. Une des amorces : F8, a donné un profil stable, reproductible, c'est un candidat sérieux pour la différenciation génétique des espèces de ce complexe.

L'analyse de nos résultats montrent que les spécimens étudiés du Vietnam, et de Chine du sud appartiennent à l'espèce *An.dirus* A . Nous avons pu confirmer la présence des espèces A, C, D en Thaïlande.

Nous avons été amenés à mettre en œuvre la technique d'AS-PCR qui identifie 4 espèces du complexe *An.dirus*. Cette technique est basée sur la variation de séquence d'ADN du gène ITS2. Les résultats montrent la présence de la seule espèce A dans le lot des individus étudiés au Vietnam et en Chine du sud. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par RAPD.

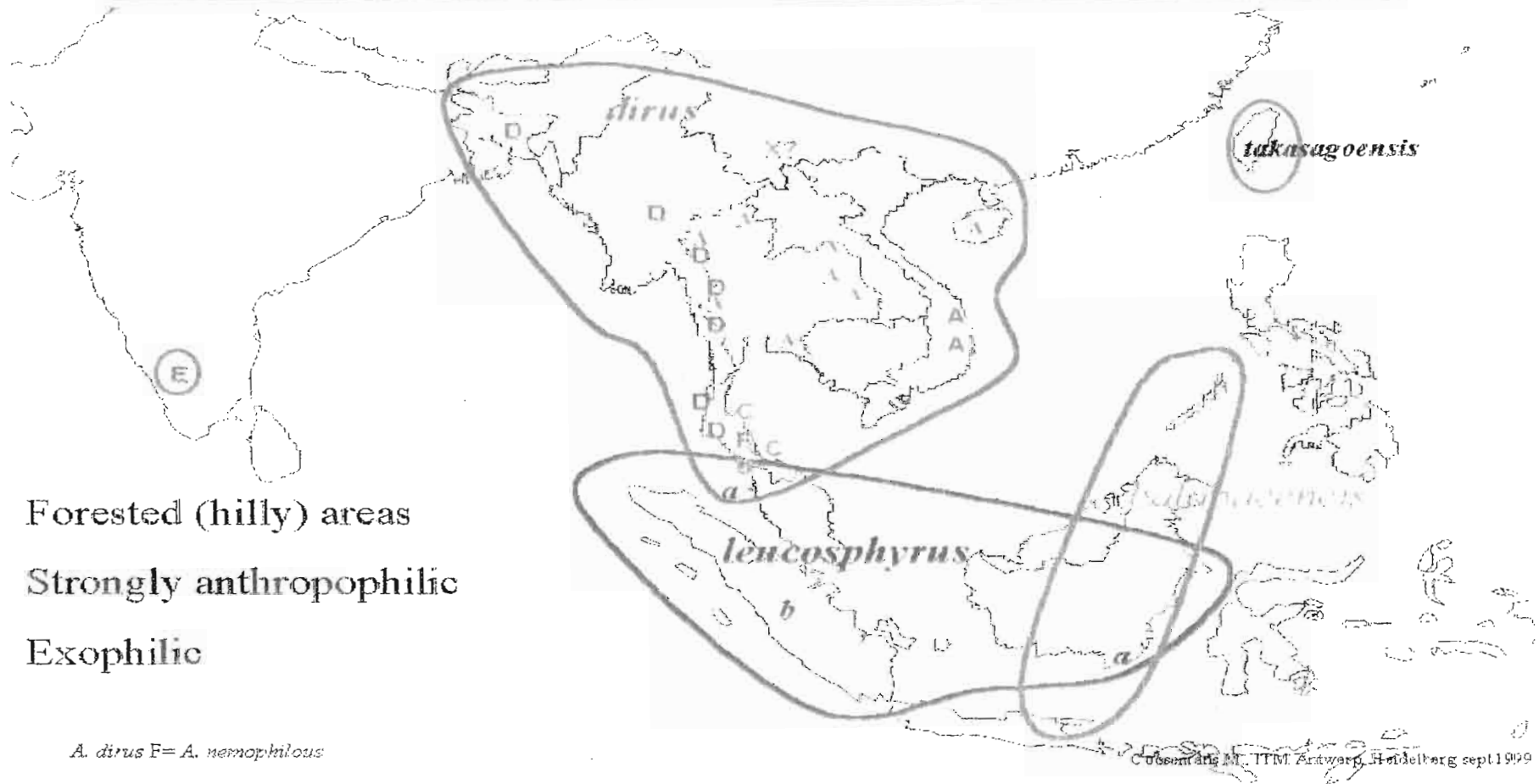
La technique AS-PCR nous a permis d'identifier les espèces A, C et D des trois sites ES, ET, et EP de Thaïlande. Les résultats des profils obtenus pour les espèces A et C, ont confirmé qu'une attention particulière doit être portée sur les procédures expérimentales de ces méthodes basées sur la PCR.

L'intérêt de la technique AS-PCR réside justement dans la grande spécificité des amorces utilisées. Les séquences amplifiées sont caractéristiques d'une espèce donnée d'anophèle, généralement pour un spécimen le nombre de bandes obtenues sur le gel ne dépasse pas une ou deux. L'interprétation des résultats est plus aisée qu'avec la RAPD-PCR et les risques de contamination sont moins importants.

L'ensemble des résultats obtenus concernant la classification des espèces d'*Anopheles dirus* dans différentes régions d 'Asie du sud-est sont regroupés sur la carte ci-après.

Distribution géographique du groupe *Leucosphyrus* , le complexe *Anopheles dirus* fait parti de ce groupe (en rouge sur la carte)

Leucosphyrus group



Forested (hilly) areas
Strongly anthropophilic
Exophilic

A. dirus F = *A. nemophilous*

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Sylvie Manguin & Pierre Kegne, communications personnelles

Paludisme, Martin Danis et Jean Mouchet, édition ELLIPSES/AUPELF

Essential Malariology, Leonard Jan Bruce- Chwatt, édition JOHN WILEY & SONS

Insect Molecular Genetics, Majorie A.Hoy, édition Academic Press

Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, F.Rodhain & C. Perez, édition MALOINE

Walton, C., Handley, J.M., Kuvangdilok, C., Collins, F.H., Harbach, R.E., Baimai, V., Butlin, R.K.(1999) Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand using allele-specific polymerase chain reaction. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 24-32.

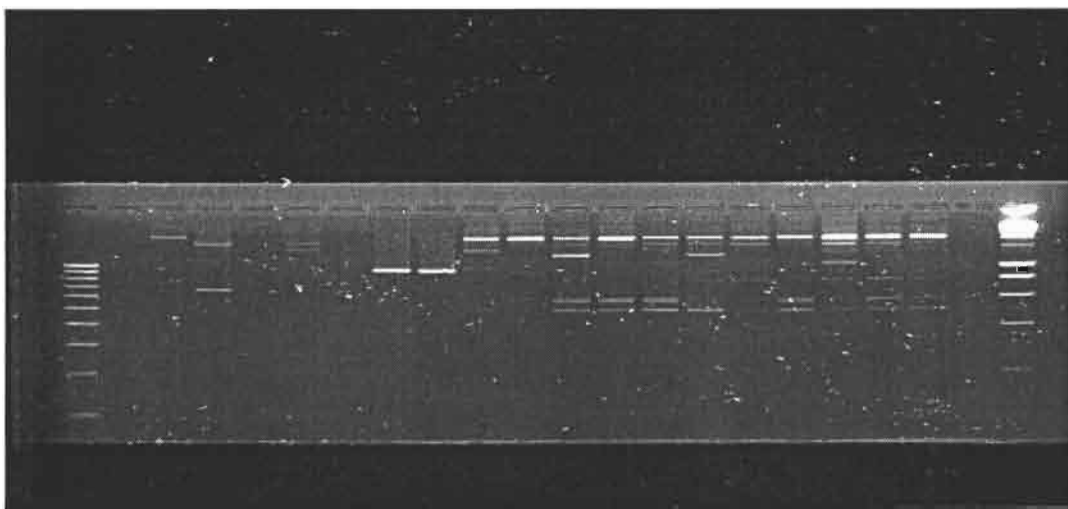
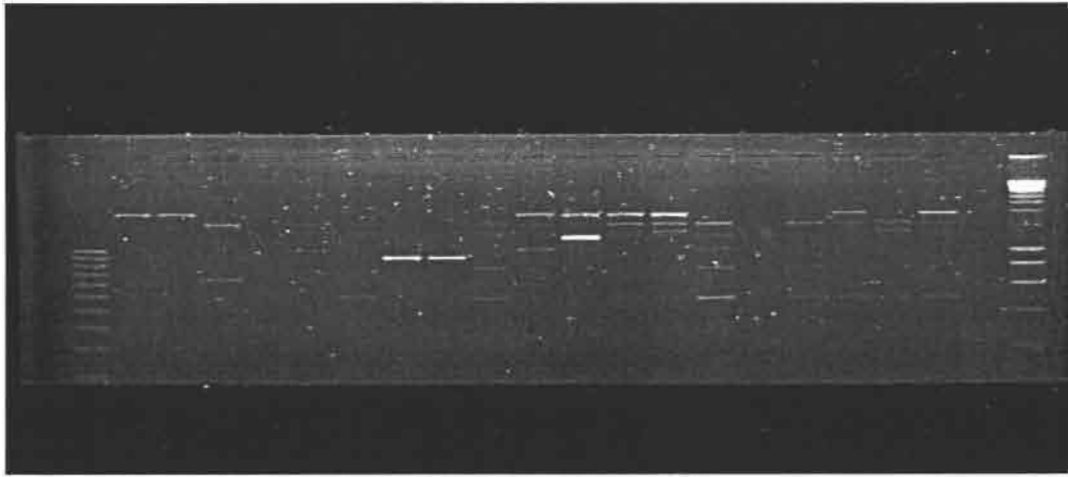
ANNEXES

- Gels d'électrophorèse des amorces A5 et P14
- Walton, C., Handley, J.M., Kuvangdilok, C., Collins, F.H., Harbach, R.E., Baimai, V., Butlin, R.K. (1999) Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand using allele-specific polymerase chain reaction. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 24-32.
- Profil de densité optique de l'ADN extrait

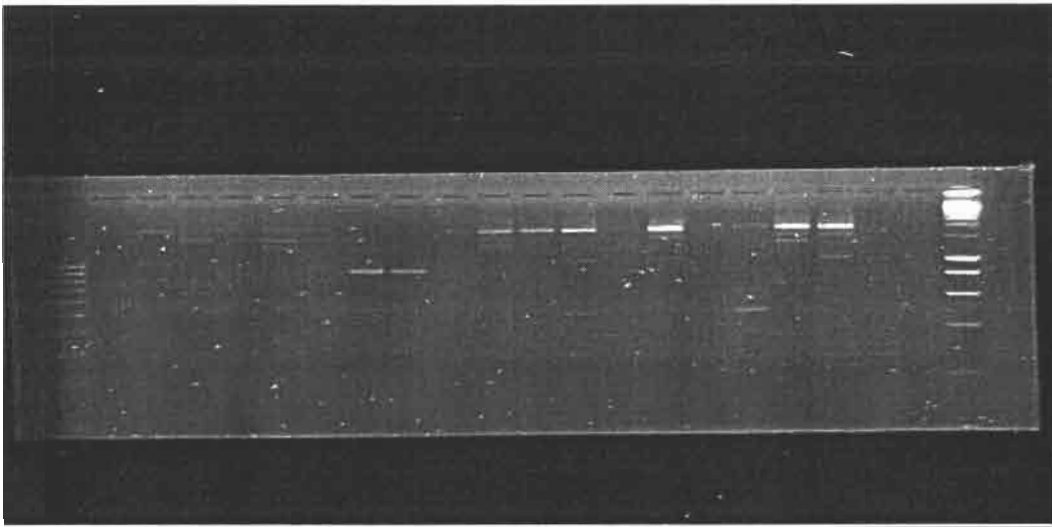
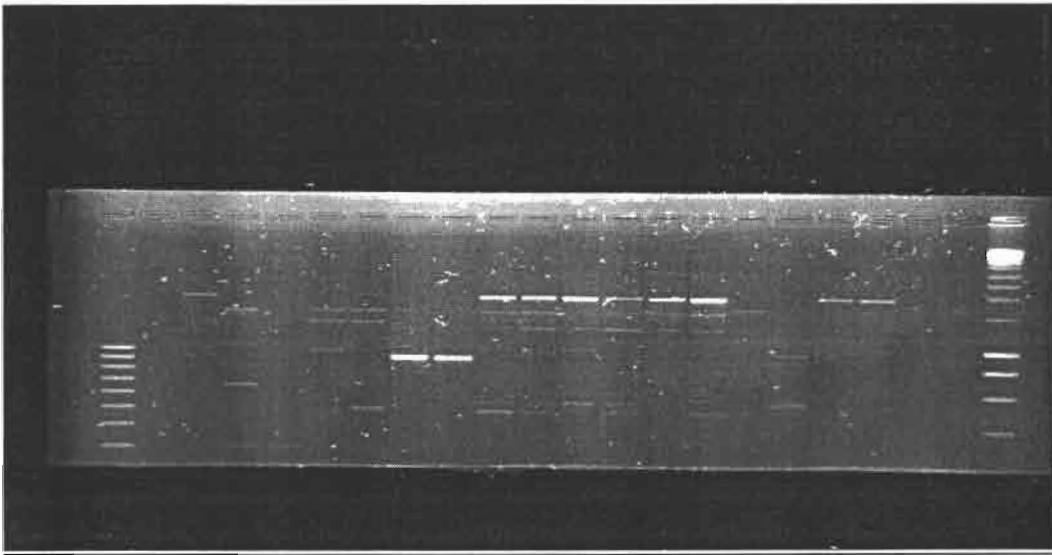
Gel d'électrophorèse amorce A5 et P14

Amorce A5

An. dirus, Province de Binh Thuan, centre Vietnam

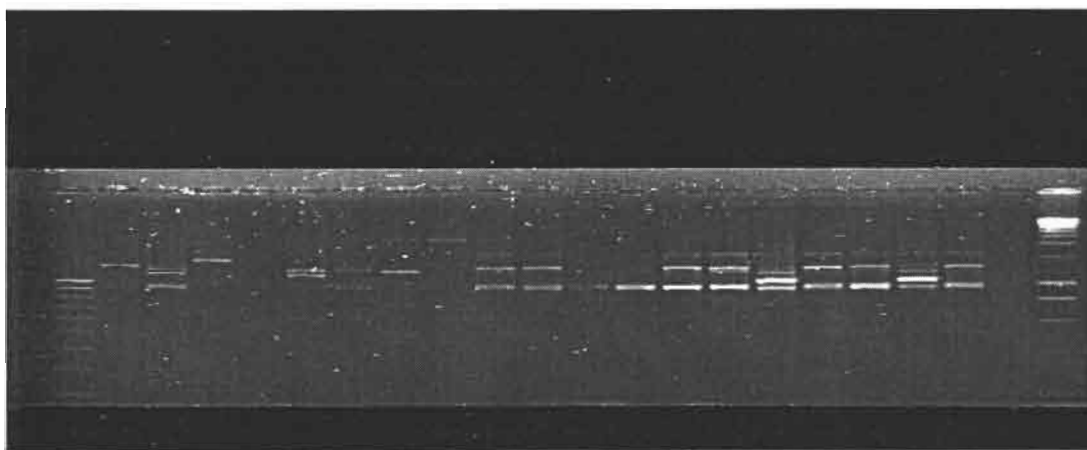
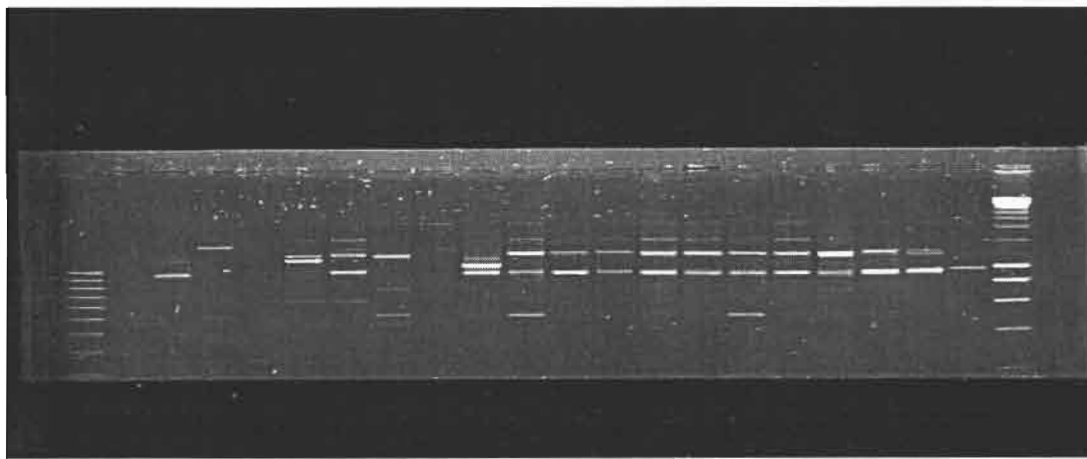


An. dirus, Collection NIMPE, Chine du sud



Amorce P14

An. dirus, province de Binh Thuan, centre Vietnam



Sylvie:
With warmest regards.
Ralph

Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction

C. WALTON, J. M. HANDLEY, C. KUVANGKADILOK,*
F. H. COLLINS,[†] R. E. HARBACH,[‡] V. BAIMAI* and
R. K. BUTLIN

Ecology and Evolution Group, School of Biology, University of Leeds, U.K.; *Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand; [†]Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, U.S.A.; and [‡]Department of Entomology, The Natural History Museum, U.K.

Abstract. The *Anopheles dirus* complex of mosquitoes contains some of the most important vectors of malaria in Southeast Asia. To distinguish five species of the complex that occur in Thailand, a method using the polymerase chain reaction (PCR) was developed. The method utilizes allele-specific amplification to detect fixed differences between the species in the DNA sequence of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2. Primers were designed to amplify fragments of diagnostic length from the DNA of the different species. The method was tested on 179 mosquitoes of the *An. dirus* complex from many parts of Thailand and shown to be effective. Every specimen was unambiguously identified as species A, B, C, D or F (i.e. *An. dirus* s.s. species B, C, D or *An. nemophilous*, respectively) by the PCR method, with confirmation of 58/61 identifications from polytene chromosome characteristics. For the other three specimens (3/44 from Kanchanaburi 5 locality), there was disagreement between the PCR and chromosomal methods of species identification (probably due to errors in the chromosomal identifications). Primers can be combined in a single PCR reaction providing a rapid, sensitive and straightforward method of species identification. Only small quantities of DNA are required, leaving most of the mosquito to be used for other analyses.

Key words. *Anopheles dirus*, *Anopheles nemophilous*, species identification, internal transcribed spacer 2, allele-specific polymerase chain reaction, malaria vectors, Thailand.

Introduction

Anopheles dirus (Peyton & Harrison, 1980) has been found to comprise a complex of species of mosquitoes (Diptera: Culicidae) including major vectors of malaria in Southeast Asia (Scanlon & Sandinand, 1965; Rosenberg, 1982; Rosenberg *et al.*, 1990). The complex belongs to the *Anopheles* (*Cellia*) *leucosphyrus* Dönitz group, as reviewed by Peyton (1989). Larvae of the *An. dirus* complex typically inhabit

small, often temporary, shaded pools of water in hilly regions of tropical, evergreen rainforest. Of the seven known species of the *An. dirus* complex, five have been recognized in Thailand – designated *An. dirus* species A, B, C, D and F (Baimai *et al.*, 1987, 1988a, d). Species A is *An. dirus sensu stricto* (Peyton, 1989) and the formal name *An. nemophilous* (Peyton & Ramalingam, 1988) was proposed for species F. Two other known species of the complex, *An. dirus* E and *An. takasagoensis* Morishita, are restricted to southwestern India and Taiwan, respectively (Sawadipanich *et al.*, 1990; Peyton & Harrison, 1980). Previous surveys of the distribution of *An. dirus sensu lato* in Thailand (Baimai *et al.*, 1988c, d), and our own collections, have shown that multiple species

Correspondence: Dr C. Walton, Ecology & Evolution Group, School of Biology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, U.K.
E-mail: gencw@leeds.ac.uk

occur sympatrically, in different combinations. Because they are largely isomorphic, however, distinctions between them have rarely been made in epidemiological studies. Consequently, it is still not known whether there are any contrasts in vectorial capacity between different members of this complex. A reliable and rapid method for discrimination between these species is needed to settle this question. If relevant differences are found, the method would be an important tool in epidemiological studies of malaria transmission by each species, investigations on the biology of these mosquitoes, and should be of practical assistance to vector control programmes.

Although it is not possible at present to distinguish between all members of the *An. dirus* complex morphologically, a number of other characteristics have been employed to differentiate them. However, non-morphological features such as cytological or isoenzyme characteristics have practical disadvantages that preclude their large-scale application. As with the *An. gambiae* Giles complex (Coluzzi *et al.*, 1979), chromosome banding sequences have proved to be informative as a means of species recognition. Whereas mitotic karyotypes of the *An. dirus* complex are compromised by extensive intraspecific variation in the amount and distribution of heterochromatin on the sex chromosomes (Baimai & Traipakvasin, 1987), interspecific differences in polytene chromosomal banding patterns can be extremely reliable (Baimai *et al.*, 1988a, d). Even so, considerable technical skill is needed to prepare good chromosome spreads, which then require expertise for interpretation. Furthermore, because readable polytene chromosomes can only be obtained from fourth-instar larvae of the *An. dirus* complex, the identification of adults usually involves the laborious process of rearing progeny broods from wild-caught females. Allozymes can also be used to differentiate the species (Green *et al.*, 1992), but specimens for electrophoresis must be fresh or stored in liquid nitrogen upon collection. DNA-based methods have the advantage that all developmental stages can be identified, and that DNA can be prepared from samples that have been preserved, for example, by desiccation or in ethanol. DNA probes have been developed that can distinguish four species of the *An. dirus* complex in Thailand with the use of dot blots (Panyim *et al.*, 1988; Audtho *et al.*, 1995). However, this technique is sometimes problematic due to DNA cross-hybridization, or if samples only give a weak signal due to an insufficient quantity and/or quality of DNA.

Thus, the aim of this study was to develop an identification method for species of the *An. dirus* complex using the DNA polymerase chain reaction (PCR). The PCR method is rapid, reliable, extremely sensitive and relatively tolerant to degraded DNA from poorly preserved specimens. DNA prepared from as little as a single leg of a mosquito is more than ample for the PCR, allowing the rest of the specimen to be used for other analyses, such as parasite detection. The method is based on the principle of allele-specific PCR (ASPCR), whereby DNA templates, differing by as little as a single base pair, can be distinguished by the inability of *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polymerase to extend primers that are mismatched to their template DNA (Ugozzoli & Wallace, 1991).

Ribosomal RNA genes (rDNA) have been used to distinguish between other mosquito species, including those of the *An. gambiae* complex (Scott *et al.*, 1993) and the *An. punctulatus* complex (Beebe & Saul, 1995). rDNA genes are arranged in tandem and there are hundreds of copies per genome, making them particularly easy to amplify. We selected the second internal transcribed spacer, known as ITS2, which separates the 5.8S and 28S rDNA subunits. Although it may be involved in RNA splicing, this sequence has a high rate of evolution (Schlotterer *et al.*, 1994) making it likely to vary between even closely related species. Because it is in tandem arrays, and therefore evolves with a concerted mode of evolution (Dover, 1986), the ITS2 sequence tends to homogenize within arrays in an individual, within populations and within species, providing there is some gene flow between populations. These properties make ITS2 an ideal candidate for a species diagnostic marker.

Materials and Methods

Adult mosquito collection and identification

Adult female mosquitoes were collected at night by man-baited landing catches from fifteen sites throughout Thailand (Fig. 1, sites 1–4 and 6–15). Aspirators were used to capture individual female mosquitoes landing on human hosts, prior to biting; the local collectors had ready access to malaria diagnosis and treatment facilities. Specimens of the *An. dirus* complex were sorted from other anopheline mosquitoes by reference to the morphological identification key of Rattana-ithikul & Panthusiri (1994). Females of *An. dirus s.l.* were kept alive, returned to the laboratory in Bangkok, blood-fed, placed individually in tubes and allowed to lay eggs. Those females from which progeny were obtained were identified (by C. K. and V. B.) from the banding pattern observed in fourth-instar larval salivary gland polytene chromosomes (Baimai *et al.*, 1980, 1988d). The remaining mosquitoes were preserved by desiccation. *An. dirus* A, C, D and *An. nemophilous* were obtained from localities in their previously reported ranges (Baimai *et al.*, 1988c, d; Table 1). Additional samples of *An. dirus* A were obtained from colony material derived from collections at Phrae (site 5). Because *An. dirus* B is restricted to southern Thailand, where sampling was limited, this species was obtained from a colony maintained at Chiang Mai University that was founded with mosquitoes from Perlis State of Malaysia, bordering southern Thailand. The small number of *An. nemophilous* collected may reflect its low anthropophily and habit of feeding in the canopy (Baimai *et al.*, 1988a), rather than implying its scarcity.

Mosquito preservation and DNA extraction

Laboratory-reared adult siblings of cytogenetically identified F₁ progeny from wild-caught *An. dirus s.l.* females were stored in 100% ethanol. Field-collected adult mosquitoes were killed and preserved by desiccation with silica gel, using a



Fig. 1. Outline map of Thailand showing collection sites numbered 1–15. Table 1 lists the species of the *An. dirus* complex collected at each site and the means of their identification.

method similar to that described by Chase & Hills (1991) for plant material. Mosquitoes that had been 'knocked down' with ether were put individually into small plastic 'beem' capsules (Agar Scientific Ltd, Stansted) that had been pierced with a needle, and placed in self-seal bags containing indicating silica gel. Samples killed and stored in this way have yielded DNA of high quality for at least 2 years after initial drying. Genomic DNA was extracted from individual mosquitoes using a 'salting-out' protocol (Sunnucks & Hales, 1996). When the same procedure was applied to mosquito legs, all the volumes used were halved. The concentrated stock was kept at -80°C and a working stock, diluted 1:40 (whole mosquitoes) or 1:10

(legs) with sterile water, was typically used in the PCR reactions.

Sequence analysis of rDNA ITS2

Because it is important that the selection of primer binding sites within the ITS2 DNA is based on fixed differences between species, the ITS2 region was amplified and sequenced from a number of chromosomally determined individuals of each species, representing as broad a geographic range as possible. The rDNA ITS2 was amplified using primers ITS2A (5'TGTGAACTGCAGGACA) and ITS2B (5'TATGCTTAAATTCAGGGGGT) (Beebe & Saul, 1995). Reactions were performed in a 50 μl volume using a 'TouchDown' thermal cycler (Hybaid Ltd, Teddington, U.K.). Each tube contained 1 μl of mosquito DNA (at the working concentration), each primer at 1 μM , 200 μM dNTP, 4 mM MgCl_2 , 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.01% (w/v) 'Tween', 1.25 units of 'Thermoprime+' thermostable DNA polymerase (enzyme and buffer supplied by Advanced Biotechnologies Ltd, Epsom, U.K., and 10% dimethylsulphoxide (DMSO). The latter is required to melt the extensive secondary structure of this region. The samples were heated at 94°C for 5 min before thirty-five cycles of amplification at 94°C for 1 min, 51°C for 1 min and 72°C for 2 min followed by a final extension step of 10 min. The amplification products were purified on columns (Promega, Madison, U.S.A.) and sequenced using the PCR primers with TaqFS dye-terminator fluorescent chemistry (Applied Biosystems, Warrington, U.K.). The sequences were aligned using PILEUP (Genetics Computer Group, 1994) and then edited manually. The conditions established for the ASPCR are detailed below.

Results and Discussion

Comparison of ITS2 sequences

Sequence type A1 (Fig. 2) was found in all specimens of *An. dirus* species A analysed, which included two individuals from site 6 and one each from sites 1, 2, 3, 4, 7 and Hainan Island. *An. dirus* A from China (Xu & Qu, 1997) was also identical. Two individuals each of *An. dirus* species D from site 7 and *An. nemophilous* from site 15 were sequenced.

These resulted in sequence types D1 and F1, respectively, identical to those of the corresponding species from other sites, i.e. *An. dirus* D from two sites in Myanmar and *An. nemophilous* identified retrospectively from site 12 (see below). *An. dirus* species C appears to be exceptional in that two sequence types were found: C1 in two individuals from site 14, and C2 in two individuals from site 12. One of these differences is in a repeat unit of a CA microsatellite, likely to be highly variable even within a species (Jarne & Lagoda, 1996). The other is a point difference at base 342, which is the same in sequence types C1 and A1. The sequence previously reported for *An. dirus* D in China (Xu & Qu, 1997) is substantially different from, but related to, all the other known sequences of the *An. dirus*

Table 1. Numbers of each species identified by the ASPCR method; numbers in parentheses indicate how many had the same chromosomal species determination. Collection sites were near the localities named and shown on Fig. 1.

Site	Latitude, longitude	Site name	Species					Totals
			A	B	C	D	F	
1	12°37'N 102°9'E	Chantaburi	6 (6)					6 (6)
2	14°29'N 105°21'E	Ubon Ratchathani	6 (1)					6 (1)
3	16°50'N 104°16'E	Sakhon Nakhon	7					7
4	17°25'N 101°38'E	Loei	8 (1)					8 (1)
5	18°4'N 100°11'E	Phrae	8 (8)					8 (8)
6	16°57'N 98°33'E	Maeramad	2 (2)					2 (2)
7	16°36'N 98°42'E	Mae sot	9 (4)			26 (16)		35 (20)
8	14°39'N 98°46'E	Kanchanaburi 1				2		2
9	14°27'N 98°51'E	Kanchanaburi 2			8	12		20
10	14°24'N 98°55'E	Kanchanaburi 3			2	1		3
11	14°23'N 98°56'E	Kanchanaburi 4			9	3		12
12	14°20'N 98°59'E	Kanchanaburi 5			41 (15)	*2 (0)	†1 (0)	44 (15)
13	13°30'N 99°21'E	Ratcha Buri	5			10		15
14	8°11'N 99°48'E	Thung Song			6 (3)			6 (3)
15	6°40'N 100°20'E	Padang Besar					2 (2)	2 (2)
16	Unknown	Perlis, Malaysia		3 (3)				3 (3)
Totals			51 (22)	3 (3)	66 (18)	56 (16)	3 (2)	179 (61)

*Two specimens identified chromosomally as species C, †one specimen identified chromosomally as species A.

complex (Fig. 2). Given the absence of intraspecific variation in the ITS2 sequence for each of the five recognized species from Thailand (with the exception of *An. dirus* C which has two very similar sequence types), and because *An. dirus* species E and *An. takasagoensis* occur allopatrically in India and Taiwan, respectively, we suggest that the distinct ITS2 sequence reported for 'species D' of Xu & Qu (1997) may represent a new species of the *An. dirus* complex in China.

Among the five members of the *An. dirus* complex found in Thailand, the sequence obtained from the ITS2 was from 733 to 801 bases in length (Fig. 2), with the notable exception of *An. dirus* D, which had only 479 bases. In addition to the base substitutions, there are many small insertions-deletions (indels), often of repeat units a few bases in length. While the sequences align well through most of their length, there are two hyper-variable regions: one starting at base 422 (in the middle of ITS2), the other at base 698 towards the 3' end. A

large indel between these two regions appears to distinguish *An. dirus* D from the other four species from Thailand, and from the Chinese 'species D' of Xu & Qu (1997). In *An. dirus* A and C, the central hyper-variable region contains a microsatellite composed of CA and GT repeat units. It is only in this area that *An. dirus* A and C differ from each other, by a single base change and a GT repeat unit. This is consistent with the considerable body of other evidence that suggests a very recent divergence between the two species (Baimai *et al.*, 1988d; Green *et al.*, 1992). Elsewhere, we will present a phylogenetic analysis of these and additional sequence data.

Primer design and PCR optimization

Our strategy for ITS2 allele-specific amplification followed the approach of Scott *et al.* (1993) to distinguish members of

1 70
 A1 CGACACGTTGAACGCAAATGGCGCATCGGCTCGCCTCAAACGACCGATGCACACATCCTTGAGTGTCTA
 C1
 C2
 X
 F1
 D1
 B1

D-U

71 140
 A1 CTGATTTTCGAA--ATATCCTCATGTTTAAACGAGACTACAACAGCCACGTGGGCCCCCGCCGGGGCC
 C1
 C2
 XG.....G.....
 F1G...TC...T.....
 D1A.....T.....
 B1AT.....G...TC...T.....

141 210
 A1 GAGGTGGACGTTGTGCATAACAGCGTGCTGGGCGTGGCTTCGCGCCGCCAGGGCGTTGGTCTGGAT-
 C1
 C2
 XC.....C.....C.....
 F1C.....
 D1T.....T.G
 B1C.....T..

211 280
 A1 -GAGTGATGGATACAGAGCGGGCGACCGCGTCGCTGGCCTGCACGGCCTTACGGCCCGGTCCCTGGTC
 C1
 C2
 X
 F1C.....T.....
 D1 A.....T.....
 B1 A.....T.....

281 350
 A1 GTTAGATGTTGCCCGGTAGCCTTCCGAGGCTGCAAGCGCCAGATGCTTCCGAC-ACGCACAAGGGGAC
 C1
 C2G.....
 X
 F1
 D1
 B1A.A...C.....

D-F

351 420
 A1 CGCCGTTTCGTGCGGTCGGTGCCTACAAGGTACCGCGCGCGGTTTCGCTCCGACACAAAGCCTCACCTC
 C1
 C2
 X
 F1T.....CT.....
 D1
 B1T.....

D-D

421 490
 A1 CGC---GGACG---CCC---GGGTGCGCGGCTCCACACACA---A-GGGTGTGTGTGT--GGAGTGC
 C1CA...G...C.GT.....
 C2CACAC.G...C.GT.....
 XA.....CAC.TG.....GT.....
 F1 ...GCT.....A...TGATC---G.C...-AA...
 D1 ...AAC...GT...GCGC.....
 B1 ...T.....GC...A.....TC...TC.....

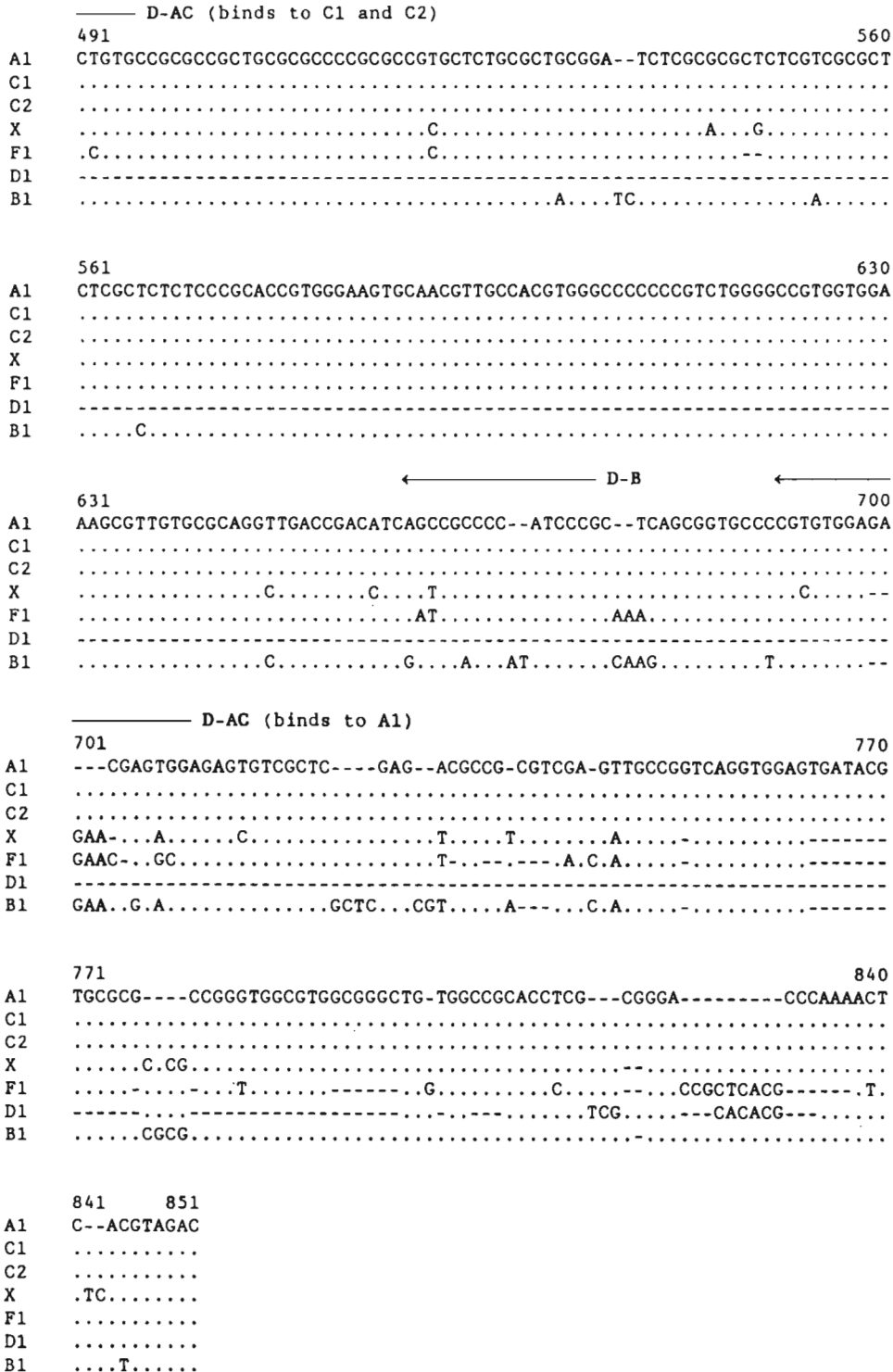


Fig. 2. Alignment of ITS2 sequence type for members of the *An. dirus* complex from Thailand. Each sequence is labelled by a letter indicating *An. dirus* species A, B, C, D and F (for *An. nemophilous*) and a number, indicating how many types were found within that species. The species referred to as *An. dirus* D from China (Xu & Qu, 1997) has also been included and is designated 'X' here to emphasize its difference from the true *An. dirus* D from Thailand. Each dot in the alignment indicates that the sequence is identical with that of the reference (A1), and a dash denotes a deletion with respect to the other sequences. Binding sites of the primers in Table 2 are indicated by arrows.

Table 2. Primers used for identification of five species of the *An. dirus* complex. D-U is the universal primer that binds to the same position on the ITS2 DNA for all members of the complex. D-B, D-D and D-F bind only to ITS2 DNA for *An. dirus* species B, species D and *An. nemophilous*, respectively, while D-AC binds at different places to the ITS2 DNA of *An. dirus* species A and species C.

Primer name	Sequence (5'-3')					
D-U	CGC	CGG	GGC	CGA	GGT	GG
D-AC	CAC	AGC	GAC	TCC	ACA	CG
D-B	CGG	GAT	ATG	GGT	CGG	CC
D-D	GCG	CGG	GAC	CGT	CCG	TT
D-F	AAC	GGC	GGT	CCC	CTT	TG

the *An. gambiae* complex. There is a universal forward primer that binds to the 5' end of ITS2 in all species of the *An. dirus* complex, whereas the reverse primers are species-limited and hybridize at different positions along the ITS2. Amplification products of diagnostic lengths are thereby generated from the DNA of different species. All members of the *An. leucosphyrus* group are morphologically similar and other species of this group occur in southern Thailand, viz. *An. hackeri* Edwards, *An. introlatus* Colless, *An. leucosphyrus* species A, *An. macarthurii* Colless and *An. pujutensis* Colless (Scanlon *et al.*, 1967; Baimai *et al.*, 1988b; Harrison *et al.*, 1990). To avoid inadvertent misidentification of these species as members of the *An. dirus* complex, by reference to ITS2 sequences from *An. leucosphyrus* A and *An. macarthurii* from Sarawak (data not shown), the forward primer (D-U, Table 2) was designed to be specific to the *An. dirus* complex.

In the design of specific primers, base substitution and indel differences were concentrated at the 3'-extreme end of the primer, where they have the greatest effect on inhibiting extension from mismatched primer-DNA templates (Ugozoli & Wallace, 1991). Where possible, the most discriminating mismatch base pairs were used (Huang *et al.*, 1992). At the same time, consideration was given to generating amplification products of differing sizes that could be separated easily on an agarose gel. The primers were kept short to reduce the DNA melting temperature and therefore enhance the difference in efficiency with which matched and mismatched primers are extended. The melting temperatures of the primers were also kept similar to each other so that they could be combined readily in a single PCR. The positions of the primer binding sites are indicated in Fig. 2. Because only one region of ITS2 differs between *An. dirus* A and C, the same D-AC primer is used to distinguish both species. In *An. dirus* C it binds to bases 479-495 but, in the absence of this exact sequence from *An. dirus* A, the D-AC primer binds to bases 691-709 at the 3' end of ITS2, resulting in a longer PCR product.

Trial PCR amplifications were performed using all four possible primer pair combinations (D-U with D-AC, D-B, D-D or D-F), each with DNA from chromosomally identified individuals of all five species. The PCR

conditions were optimized with respect to a number of parameters (the concentrations of DMSO, MgCl₂, thermostable DNA polymerase and primers) and the annealing temperature. The aim was to maximize the yield of the desired product whilst retaining specificity. Because the use of DMSO has a detrimental effect on the polymerase, the minimum level of DMSO that was still capable of melting the secondary structure was used. To reduce the cost of the method, as well as favouring specificity, the lowest concentration of the polymerase that still gave bright bands on an agarose gel was selected. Again, to favour specificity, the highest annealing temperature that still resulted in a sufficient amount of amplification products was used. After achieving a single set of reaction conditions where products of the correct size were only generated from the corresponding primer pair-DNA combinations, all the primers were included in a 'single reaction cocktail'. This enables the use of a one-tube PCR to identify any of the five species of the *An. dirus* complex in Thailand. To generate the PCR product from *An. dirus* A, it was necessary to increase the level of the D-AC primer fourfold more than required for *An. dirus* C.

The final optimized reaction conditions were the D-U, D-B, D-D and D-F primers each at 1 µM, 200 µM dNTP, 2 mM MgCl₂, 4% DMSO, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.01% (w/v) Tween, and 0.25 units of thermostable DNA polymerase. After a preliminary denaturation step of 5 min at 94°C there were thirty-two amplification cycles at 94°C for 15 sec, 55°C for 15 sec and 72°C for 30 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. All the identification reactions were performed in a 25 µl volume of 0.5 µl of DNA at the working concentration. The same volume of DNA template was used in the PCR, whether it was prepared from a whole mosquito or a single leg, and gave bands of similar intensity (Fig. 3). Products of length 562, 514, 349 (or 353), 306 and 223 bp were produced from *An. dirus* A, B, C, D and *An. nemophilous*, respectively. Under these amplification conditions no products were generated with DNA from individuals of *An. leucosphyrus* A, *An. macarthurii* or *An. pujutensis* from Sarawak. *An. hackeri* from Sabah, the only other available species of the *An. leucosphyrus* group (Peyton, 1989), gave two faint bands of intermediate length between those produced by *An. dirus* B and C, which would not result in a false positive identification.

Verification of the method with field-collected samples

To test the general application of the method, we performed 179 analyses on field-collected *An. dirus* *s.l.* from sites throughout Thailand. All individuals were identified by ASPCR as one of the five species expected, suggesting that no variants of ITS2 escaped detection. Results (Table 1) were generally in agreement with chromosomal identification of the specimens, or with known distributions of the species. For example, at sites 1-5 only *An. dirus* A has been recorded in many previous collections

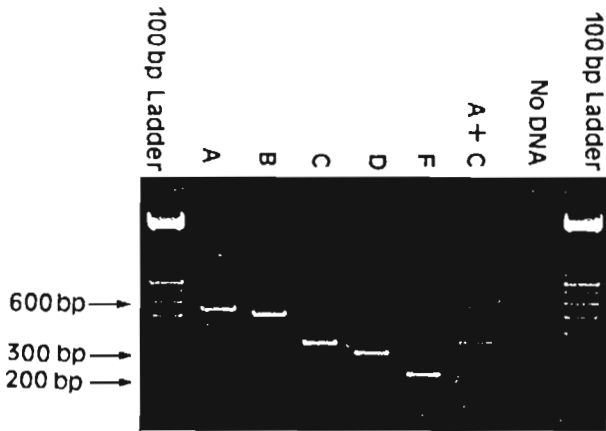


Fig. 3. A photograph of 2.5% agarose gel under ultraviolet light illumination showing the amplification products from a single PCR reaction mix containing all the identification primers as described in the text. The source of template DNA was whole mosquitoes as indicated by the letter A, B, C, D for *An. dirus* species A, B, C and D, and the letter F for *An. nemophilous*. 'A+C' contained the same total amount of DNA from *An. dirus* A and C mixed in a 1:1 ratio to simulate an F₁ hybrid between these species. The 'no DNA' control was included routinely. Outer lanes contain molecular weight markers with the size of selected bands indicated in base pairs (bp).

(Baimai *et al.*, 1988c, d). Only three specimens yielded discrepancies between the two methods of identification, all from site 12 (Fig. 1, Table 1). The sequence of ITS2 was therefore determined from these individuals. Two specimens that were chromosomally identified as *An. dirus* C, but identified as *An. dirus* D by ASPCR, both had the same sequence as *An. dirus* D from site 7. One individual identified chromosomally as *An. dirus* A, but identified as *An. nemophilous* by ASPCR, had a sequence identical to that of *An. nemophilous* from site 15. Given (i) the concordance between the ASPCR and sequence data; (ii) the multiple differences between the specific ITS2 sequences of *An. dirus* C versus D, as well as *An. dirus* A versus *An. nemophilous*; and (iii) the general lack of intraspecific geographic variation in ITS2, we suspect that the chromosomal identifications were incorrect. They may reflect the subjective preconception of the observer (C. K. or V. B.) that predominantly *An. dirus* C and small numbers of *An. dirus* A and D would be found at site 12. Although *An. nemophilous* is not usually considered to occur at site 12, it was recorded nearby by Peyton & Ramalingam (1988).

The ASPCR method presented here enables the unambiguous, reliable and rapid identification of the five species of the *An. dirus* complex that are found in Thailand. It is not intended to replace the use of polytene chromosome banding patterns and/or isoenzyme analysis for primary interpretation of population genetics and species status. However, in routine and large-scale operations where species determination of many specimens is required, ASPCR offers many advantages. Most importantly, this method does not rely on skilful

interpretation, so no subjective bias is introduced to the identification. The DNA extraction and PCR techniques used are relatively straightforward to perform and there should be no difficulty in establishing the method in appropriate laboratories. However, because of PCR sensitivity, unless exactly the same materials and procedures as those listed here are used (i.e. the enzyme, buffer conditions, PCR machine, etc.), it may be necessary to reoptimize the conditions.

We have developed an ASPCR method that positively identifies five species of the *An. dirus* complex using specimens collected from sites widely distributed in Thailand. The sequence data indicate that (except for species C) there was very little, if any, intraspecific variation in the ITS2 within Thailand; it seems likely that this conservatism of ITS2 would hold true throughout the wider range of these species in Southeast Asia. We intend this PCR method to identify members of the *An. dirus* complex from outside Thailand, although caution should be exercised in case of finding unexpected sequences, possibly representing as yet unrecognized species of the complex such as the Chinese 'species D' of Xu & Qu (1997). Even within Thailand, we recommend that validity of the ASPCR method should be established for every study area by cross-checking the identification of samples by means of allozyme profiles or polytene chromosome banding patterns.

Acknowledgements

This research was supported by a Wellcome Trust Training Fellowship in Biodiversity awarded to C. Walton under the sponsorship of R. K. Butlin. Part of the work was conducted at the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta, Georgia, U.S.A. We thank Brian Holloway and staff of the CDC Biotechnology Core Facility for synthesizing some of the oligonucleotide primers used in this study, and Diane Hamm at the CDC for technical assistance. We also thank Professor Sornchai Looareesuw for samples from Ratchaburi, Dr Pradya Somboon for specimens of *An. dirus* A from Phrae (site 5) and *An. dirus* B from Perlis, Malaysia and the staff of malaria offices throughout Thailand for their assistance in the collection of mosquitoes. The samples from Myanmar were kindly supplied courtesy of WHO/TDR grant 890372.

References

- Audtho, M., Tassanakajon, A., Boonseng, V., Tpiankijagum, S. & Panyim, S. (1995) Simple nonradioactive DNA hybridization method for identification of sibling species of *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) complex. *Journal of Medical Entomology*, **32**, 107–111.
- Baimai, V. & Traipakvasin, A. (1987) Intraspecific variation in sex heterochromatin of species B of the *Anopheles dirus* complex in Thailand. *Genome*, **29**, 401–404.
- Baimai, V., Harrison, B.A. & Nakavachara, V. (1980) The salivary gland chromosomes of *Anopheles (Cellia) dirus* (Diptera: Culicidae)

- of the Southeast Asian Leucosphyrus Group. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **82**, 319–328.
- Baimai, V., Andre, R.G., Harrison, B.A., Kijchalao, U. & Panthusiri, L. (1987) Crossing and chromosomal evidence for two additional sibling species within the taxon *Anopheles dirus* Peyton and Harrison (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **89**, 157–166.
- Baimai, V., Harbach, R.E. & Kijchalao, U. (1988a) Cytogenetic evidence of a fifth species within the taxon *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **4**, 333–338.
- Baimai, V., Harbach, R.E. & Sukowati, S. (1988b) Cytogenetic evidence for two species within the current concept of the malaria vector *Anopheles leucosphyrus* in Southeast Asia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **4**, 44–50.
- Baimai, V., Kijchalao, U., Sawadwongporn, P. & Green, C.A. (1988c) Geographic distribution and biting behaviour of four species of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **19**, 151–161.
- Baimai, V., Poopittayasatoporn, A. & Kijchalao, U. (1988d) Cytological differences and chromosomal rearrangements in four members of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Genome*, **30**, 372–379.
- Beebe, N.W. & Saul, A. (1995) Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **53**, 478–481.
- Chase, M.W. & Hills, H.H. (1991) Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, **40**, 215–220.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V. & Di Deco, M.A. (1979) Chromosomal differentiation and adaptation to human environment in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 483–497.
- Dover, G.A. (1986) Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread, and are assimilated. *Current Trends in Genetics*, **8**, 159–165.
- Genetics Computer Group (1994) Program manual for the Wisconsin package, version 8, September 1994. 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, 53711, U.S.A.
- Green, C.A., Munstermann, L.E., Tan, S.G., Panyim, S. & Baimai, V. (1992) Population genetic evidence for species A, B, C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs for their identification. *Medical and Veterinary Entomology*, **6**, 29–36.
- Harrison, B.A., Rattanarithikul, R., Peyton, E.L. & Mongkolpanya, K. (1990) Taxonomic changes, revised occurrence records and notes on the Culicidae of Thailand and neighbouring countries. *Mosquito Systematics*, **22**, 196–227.
- Huang, M.-M., Arnheim, N. & Goodman, M.F. (1992) Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Research*, **20**, 4567–4573.
- Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 424–429.
- Panyim, S., Yasothornsrikul, S., Tungpradubkul, S., Baimai, V., Rosenberg, R., Andre, R.G. & Green, C.A. (1988) Identification of isomorphic malaria vectors using a DNA probe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **38**, 47–49.
- Peyton, E.L. (1989) A new classification for the Leucosphyrus Group of *Anopheles* (*Cellia*). *Mosquito Systematics*, **21**, 197–205.
- Peyton, E.L. & Harrison, B.A. (1980) *Anopheles* (*Cellia*) *takasagoensis* Morishita 1946, an additional species in the Balabacensis Complex of Southeast Asia (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, **12**, 335–347.
- Peyton, E.L. & Ramalingam, S. (1988) *Anopheles* (*Cellia*) *nemophilous*, a new species of the Leucosphyrus Group from peninsular Malaysia and Thailand (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, **20**, 272–299.
- Rattanarithikul, R. & Panthusiri, P. (1994) Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **25**(Suppl. 1), 1–66.
- Rosenberg, R. (1982) Forest malaria in Bangladesh. III. Breeding habits of *Anopheles dirus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **31**, 192–201.
- Rosenberg, R., Andre, R.G. & Somchit, L. (1990) Highly efficient dry season transmission of malaria in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**, 22–28.
- Sawadipanich, Y., Baimai, V. & Harrison, B.A. (1990) *Anopheles dirus* species E: chromosomal and crossing evidence for another member of the Dirus Complex. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **6**, 477–481.
- Scanlon, J.E. & Sandinand, U. (1965) The distribution and biology of *Anopheles balabacensis* in Thailand (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **2**, 61–69.
- Scanlon, J.E., Peyton, E.L. & Gould, D.J. (1967) The *Anopheles leucosphyrus* group in Thailand. *Proceedings of the California Mosquito Control Association*, **35**, 78–83.
- Scott, J.A., Brogdon, W.G. & Collins, F.H. (1993) Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**, 520–529.
- Schlotterer, C., Hauser, M.-T., von Haeseler, A. & Tautz, D. (1994) Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, **11**, 513–522.
- Sunnucks, P. & Hales, D.F. (1996) Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobian* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 510–524.
- Ugozzoli, L. & Wallace, R.B. (1991) Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, **2**, 42–48.
- Xu, J.-N. & Qu, F.-Y. (1997) Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**, 134–138.

Accepted 18 July 1998

Profil de densité optique de l'ADN extrait

Wavelength Scan HELP
 ReadSamples Tabulate +-*Scans Scatter NetA Method SaveClear Print Quit

Scan directory: VIEW Autoprint: [No] Method name: A:\KENGNE
 Start wl: 210 nm Autosave: [No] Autosave name: [A:\]SCANS
 End wl: 300 nm Scans per sample: 1 Sampling device: None
 Overlay scans: [No] Interval: 35.00 [sec] Scan speed: 1200 nm/min

A:\WORK_003 (1200)

Print ↓ ↑ ← → Exit Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print

wl	Abs	Pick
210.0	0.0910	pt
230.0	0.0520	pt

