

Intérêt de l'HPLC et des ptéridines fluorescentes pour estimer l'âge d'anophèles adultes de l'espèce *Anopheles gambiae*

Randimby FM¹, Gorham J², Duchemin JB¹, Robert V^{1,3}, Lehane MJ²

RESUME : Les ptéridines fluorescentes sont des pigments photosensibles de la cuticule des moustiques. Leur quantité diminue avec le temps au cours de la vie imaginaire. Afin de tester la faisabilité de la technique HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) en phase réverse pour mesurer la quantité de ptéridine fluorescente et pour en déduire l'âge des moustiques, on a utilisé des spécimens d'*Anopheles gambiae* élevés en insectarium et d'âge connu. Tête et thorax, ensemble ou séparés, ont été étudiés sur des moustiques âgés de 0, 5, 10 et 20 jours. Les moustiques mâles et femelles montrent une différence significative à 0 et 5 jours; à 10 jours la différence n'est plus significative. Chez les femelles, le niveau de fluorescence entre tête et thorax ensemble ne diffère pas de la somme de niveau de fluorescence de tête et thorax séparés. La corrélation entre la fluorescence de la tête et celle du thorax n'est pas significative. La diminution du niveau de fluorescence en fonction de l'âge a été significative entre 0 et 5 jours que ce soit pour l'ensemble tête + thorax ou pour tête seule. Au contraire, au-delà de 5 jours, la quantité de fluorescence est faible et se maintient en plateau. L'utilisation du thorax seul des femelles permet la séparation en moustiques âgés de moins de 5 jours, âgés entre 5 et 10 jours, et âgés de plus de 10 jours. La technique HPLC n'apparaît pas assez sensible pour estimer l'âge d'*Anopheles gambiae* élevés à l'insectarium. Il ne semble pas que cette technique, relativement complexe à mettre en œuvre, apporte un avantage substantiel par rapport à la méthode classique de Detinova permettant de séparer les femelles en nullipares et pares (i.e. ≤ 3 jours versus >3 jours).

Mots-clés : *Anopheles gambiae* - Détermination de l'âge - Fluorescence - HPLC - Insectarium - Ptéridine.

ABSTRACT : "Interest of HPLC and fluorescent pteridines to estimate the age of adult mosquitoes of the species *Anopheles gambiae*" : Fluorescent pteridines are photosensitive pigments of mosquito cuticle. Their quantity decreases with time during the adult life of mosquitoes. In order to test the feasibility of the reversed-phase HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) technique, to measure pteridine fluorescence and to estimate the calendar age, reared *Anopheles gambiae* of known age are used. Head and thorax were studied on mosquitoes aged 0, 5, 10, 20 days after emergence. There was significant difference between male and female of 0 and 5 days of age ; the difference was not significant at 10 days of age. The level of fluorescence between a female's head and thorax non separated does not differ from the sum of fluorescence level of separated head and thorax. Pteridin fluorescent of female's head and thorax does not correlate. It decreases significantly with chronological age between 0 and 5 days either for head+thorax or for head alone. Conversely, this fluorescence quantity is weak and maintained constant beyond 5 days. The use of thorax alone of the female mosquito allows the differentiation of mosquito aged less than 5 days, between 5 and 10 days and aged more than 10 days. Reversed-phase HPLC technique, at least in the way we have demonstrated, does not appear sensitive enough to estimate the age of the species *An. gambiae* reared in an insectarium. It seems that this technique, relatively complex to manage, does not bring a substantial advantage compared to the method of Detinova, which allows the separation of nulliparous and parous females (i.e. ≤ 3 days versus >3 days).

Key-words : *Anopheles gambiae* - Age determination - Fluorescence - HPLC - Insectary - Pteridine.

INTRODUCTION

La détermination de l'âge des moustiques est une question cruciale en entomologie médicale. Si des

espèces de moustiques se sont bien avérées vectrices de maladies, seuls les plus vieux individus sont vecteurs. Cela est dû à la période indispensable pour l'évolution du parasite dans le moustique entre le moment où il est ingéré, et le moment où il est physiologiquement infectant pour un hôte vertébré. Par exemple, le développement sporogonique de *Plasmodium falciparum* dure 11 jours à 24°C. Pour

¹ Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

² School of Biological Sciences, University of Wales - Bangor LL57 2UW - UK.

³ Institut de Recherche pour le Développement, BP 434 - 101 Antananarivo - Madagascar.

tout projet de lutte antivectorielle, on comprend qu'il serait particulièrement utile d'identifier ces moustiques et leur proportion dans la population naturelle de moustiques pour estimer une capacité vectrice.

Pour la détermination de l'âge des moustiques, la technique HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) en phase réverse a donné des résultats encourageants sur *Anopheles gambiae* et *An. stephensi* [1] alors que la spectrofluorométrie a donné des résultats décevants chez *An. albimanus* [2] et chez les *Culex* et *Aedes* [3]. Ces deux méthodes sont comparables mais différent en ce sens que l'HPLC est plus sensible que la méthode spectrofluorométrique sur plaque de titration, elle même plus simple de mise en œuvre. L'HPLC a montré que des ptéridines sont présentes chez *An. gambiae* femelle et que leurs quantités diminuent avec l'âge du moustique, de façon mesurable jusqu'à 30 jours pour le corps en entier, et jusqu'à 20 jours pour la tête seule. Ces travaux ont également montré la relative abondance des ptéridines au niveau du thorax. Il est possible d'améliorer la valeur prédictive de la quantité de fluorescence avec l'HPLC en pondérant cette valeur par la taille du moustique, évaluée par la longueur de l'aile [1].

Sur le terrain, on utilise de nombreuses parties du moustique, telles que le thorax pour la détection des sporozoïtes par le test ELISA-CSP, l'abdomen pour la recherche d'oocystes au niveau de l'estomac et pour la détermination de la parité au niveau de l'ovaire, les pattes pour la biologie moléculaire et l'identification des espèces jumelles. En pratique, seule la tête reste disponible. Ainsi, ce travail a pour objectif de tester la faisabilité et la valeur de la méthode HPLC dans la mesure des ptéridines fluorescentes des têtes et thorax des moustiques femelles et mâles d'*An. gambiae*.

MATERIEL ET METHODES

La souche d'*An. gambiae* que nous avons utilisée dans ce travail provient de Taolagnaro, Sud-Est de Madagascar. Cette souche a été maintenue en élevage dans l'insectarium de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) à température de 27-28°C et 70% d'humidité relative. Les adultes ont été soumis à un éclairage de 12 heures par nycthémère avec des lampes de type "tube fluorescent" et ont été nourris en permanence de jus sucré à 10%. Après émergence, les adultes âgés de 0, 5, 10 et 20 jours ont été tués au chloroforme. Leurs ailes ont été détachées et conservées afin de mesurer la distance entre la partie distale de l'alula et la pointe de la

veine R3. Les pattes et les abdomens ont été retirés. Seules les têtes et les thorax ont été conservés dans des tubes Eppendorf 1,5 ml, contenant des grains de silicagel et de coton. La fermeture du capuchon de chaque tube a été étanchée par du Parafilm®. Les tubes ont été mis dans une boîte en carton étanche à la lumière et placés à -20°C jusqu'à leur envoi par la poste à l'université de Banghor, UK. Le trajet d'Antananarivo à Banghor, effectué en paquet poste "par avion", sans précaution vis-à-vis de la température, a duré une dizaine de jours. L'extraction de ptéridines et la mesure de la fluorescence s'est faite par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) en phase reverse [1]. La mesure de la ptéridine fluorescente s'est déroulée à l'obscurité. La partie de moustique contenue dans le tube Eppendorf a été transférée dans 100 ml d'azote liquide, additionnée de 120 ml de tampon (100 mM NaOH, 150 mM glycine, pH 10,3) et homogénéisée. L'homogénat obtenu a été transféré dans un tube microcentrifuge en utilisant une longue et mince pipette, puis centrifugé à 13 000 tours/mn pendant 5 minutes. Le surnageant (25 ml) a été injecté avec une seringue à l'intérieur du système HPLC (détecteur fluorométrique Shimadzu RF-535 avec excitation à 365 nm et émission à 455 nm, avec un flux de 0,5 cm³) permettant l'enregistrement de pics. La quantification du niveau total de la fluorescence (NTF) pour chaque moustique ou fraction de moustique a été estimée par la somme de la surface des pics correspondant aux ptéridines, divisé par la longueur moyenne (en mm) des deux ailes. La durée entre le sacrifice des moustiques et la mesure du NTF a été de l'ordre de 45 jours.

Les données obtenues de cette mesure ont été analysées statistiquement par le logiciel Statistica® utilisant la comparaison des deux moyennes de niveau total de la fluorescence (NTF) observées entre le mâle et la femelle, entre celles de tête + thorax ensemble, et tête thorax séparés. L'analyse de la variance (ANOVA) a été aussi utilisée pour estimer les différences de moyennes en niveau total de fluorescence entre les moustiques femelles de différents âges. L'étude de la corrélation a été utilisée pour estimer la liaison entre le niveau total de fluorescence dans la tête et le thorax des moustiques femelles de différents âges.

Pour savoir si le marquage par des poudres ou peintures fluorescentes pouvait perturber cette technique, certains moustiques femelles âgés de 5 jours ont été marqués soit par des poudres fluorescentes, soit par des peintures fluorescentes de trois couleurs : jaune, bleue et rouge. Dix individus femelles marqués de chaque couleur de poudre ont été testés, 3 individus femelles marqués

de chaque couleur de peinture et une femelle marquée à la fois de peinture de couleur jaune, bleue et rouge.

RESULTATS

Les résultats exposés portent sur des *An. gambiae*, 27 mâles et 128 femelles.

Par rapport aux moustiques femelles, les mâles contiennent moins de ptéridine. La comparaison du niveau total de fluorescence chez les deux sexes montre une différence significative jusqu'à 5 jours après l'émergence ($t \geq 2,17$; $p < 0,05$). Cependant, vers l'âge de 10 jours les niveaux totaux tendent à s'égaliser pour les deux sexes (tableau I).

Tableau I : Comparaison de moyennes du niveau total de fluorescence (NTF) de l'ensemble tête + thorax chez les femelles et les mâles d'*Anopheles gambiae* (test de Student)

Age (jours)	0	5	10	20
NTF moyen tête+thorax	5,812	3,37	3,204	2,878
NTF moyen tête	1,23	0,84	0,74	0,71
NTF moyen thorax	4,80	2,75	2,15	2,11
NTF moyen de la somme tête et thorax séparés	5,561	3,51	2,894	2,823
t	0,271	0,465	1,911	0,191
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Pour chaque âge de moustiques femelles, la somme du niveau total de fluorescence de la tête et thorax séparés ne diffère pas de celui de l'ensemble tête + thorax (tableau II).

Tableau II : Comparaison de moyennes de la somme du niveau total de fluorescence (NTF) de tête et thorax séparé et l'ensemble tête + thorax chez les femelles d'*Anopheles gambiae* (test de Student)

Age (jours)	0	5	10	20
NTF moyen tête+thorax	5,812	3,37	3,204	2,878
NTF moyen tête	1,23	0,84	0,74	0,71
NTF moyen thorax	4,80	2,75	2,15	2,11
NTF moyen de la somme tête et thorax séparés	5,561	3,51	2,894	2,823
t	0,271	0,465	1,911	0,191
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Il n'y a pas de liaison significative entre le niveau total de fluorescence de la tête et celui du thorax chez une même femelle (tableau III).

Tableau III : Coefficient de corrélation (r) du niveau total de la fluorescence entre la tête et le thorax chez les femelles d'*Anopheles gambiae*

Age (jours)	0	5	10	20
n	9	9	10	10
r	0,545	0,642	0,055	0,039
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Chez les moustiques femelles, la quantité de ptéridine diminue jusqu'à l'âge de 10 jours pour l'ensemble tête + thorax et pour le thorax seul, mais

il ne diminue que jusqu'à 5 jours pour la tête seule. Au-delà de ces périodes, la baisse du niveau total de ptéridines n'est pas significative (figure 1, tableau IV).

Figure 1 : Moyenne du niveau total de la fluorescence en fonction de l'âge des moustiques femelles (les astérisques sont placés entre deux points consécutifs significativement différents)

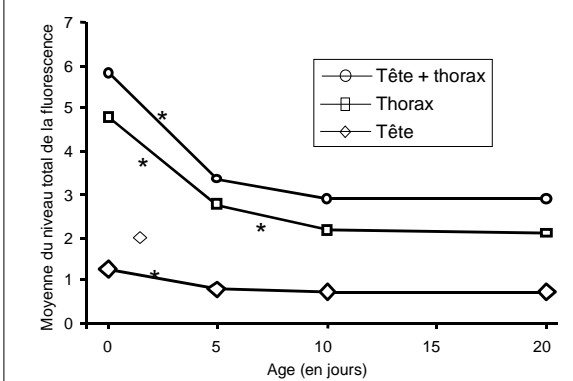


Tableau IV : Analyse de la variance pour le niveau total de la fluorescence chez les femelles d'*Anopheles gambiae* (test F)

Age (jours)	Ensemble tête+thorax			Têtes seules			Thorax seuls		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
0	F=44,21	F=39,27	F=50,92	F=11,24	F=18,28	12,24	8,25	11,05	10,48
	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
5		F=0,33	F=1,55		F=1,28	F=1,29		17,77	8,93
		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.		p<0,05	p<0,05
10			F=3,03			F=0,15			0,096
			n.s.			n.s.			n.s.

Les marquages des moustiques par différents procédés fluorescents montrent que la présence de la couleur bleue, en poudre ou en peinture, perturbe la technique HPLC en augmentant nettement la valeur du niveau total de fluorescence (tableau V).

Tableau V : Comparaison du niveau total de la fluorescence moyen pour des ensembles tête+thorax témoins et marqués par des pigments fluorescents de différentes couleurs chez des moustiques femelles d'*Anopheles gambiae* âgés de 5 jours (test U de Mann-Whitney). Toutes les comparaisons ont utilisé 3,37 comme valeur du NTF témoin négatif

	Poudre	Peinture
Jaune	3,52	3,23
	n.s.	n.s.
Bleue	5,44	5,45
	p=0,02	p=0,02
Rouge	3,71	2,98
	n.s.	n.s.
Jaune + bleue + rouge		2,81
		n.s.

n.s. = non significatif

La valeur du NTF du témoin négatif et de chaque poudre a été obtenue sur 10 moustiques. La valeur du NTF de chaque peinture a été obtenue sur 3 moustiques. La valeur du NTF de la somme des trois peintures a été obtenue sur 1 moustique.

La mesure de la longueur des ailes est donnée en annexe.

DISCUSSION

Le présent travail vérifie la présence des ptéridines fluorescentes dans les moustiques, quoiqu'en faible quantité chez les anophèles [1,4]. Les ptéridines sont plus abondantes dans le thorax que dans la tête. Le niveau total de fluorescence varie en fonction de l'âge et cette relation est significative jusqu'à 5 jours après l'émergence; ceci diffère des résultats de *Wu et Lehane* [1] qui ont vérifié cette relation jusqu'à 30 jours. La technique HPLC en phase réverse, pourtant considérée comme très sensible, ne nous a pas permis la détermination de l'âge des moustiques vecteurs élevés en insectarium.

Cette observation est peut-être liée à l'activité journalière des insectes, qui influence la quantité de fluorescence des moustiques, comme c'est le cas pour les anophèles [1,2] et les mouches [5].

Il est à souligner que les moustiques testés dans cette étude ont été élevés à une température constante de 27-28°C et à un éclairage de 12 heures par nycthémère avec des lampes de type "tube fluorescent". Il est envisageable que ces conditions aient dégradé précocement les ptéridines par rapport à ce qu'il serait advenu en conditions naturelles, expliquant le relativement faible niveau total de fluorescence observé. Cependant, les résultats de *Penilla et coll.* [2] ne sont pas en faveur de cette hypothèse puisque la relation entre l'âge et le niveau de fluorescence est plus étroite avec des anophèles d'insectarium qu'avec des anophèles élevés dans la nature.

Enfin, il est également possible que le délai entre le sacrifice des moustiques et la mesure du NTF ait été trop long. Pour réduire ce délai et ainsi éviter les pertes de ptéridines dues au stockage en congélateur et dues au voyage postal, il serait logique d'effectuer sur place, à Madagascar, la technique HPLC.

CONCLUSION

L'utilisation de la technique HPLC avec l'ensemble tête + thorax, ou bien avec la tête seule, pour déterminer l'âge d'*An. gambiae* d'élevage n'a pas donné satisfaction. Elle a seulement pu répartir

les moustiques entre ceux âgés de moins de 5 jours et ceux âgés de plus de 5 jours. Ceci nous paraît très insuffisant car n'apporte pas de vraie amélioration par rapport à la technique de *Détinova* [6], basée sur la présence de pelotons trachéolaires dans l'ovaire des femelles âgées de ≤ 3 jours et sur leur absence chez les femelles de plus de 3 jours.

L'utilisation de la technique HPLC avec le thorax seul a permis de répartir les moustiques en trois catégories séparées par les jours 5 et 10, ce qui constitue un argument positif mais interdit d'effectuer sur ces moustiques un test de type ELISA CSP pour rechercher la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires.

L'application des poudres ou peinture, en particulier de la couleur bleue, perturbe la technique HPLC.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Messieurs Edmond Rajaonarivelo, Jean-Claude Rakotoniaina, Etienne Tata et Haja Johnson Velonirina pour leur assistance technique à l'insectarium de l'Institut Pasteur de Madagascar.

REFERENCES

- 1- **Wu D, Lehane MJ.** Pteridine fluorescence for age determination of *Anopheles* mosquitoes. *Med Vet Entomol* 1999; **13** : 48-52.
- 2- **Penilla RP, Rodriguez MH, Lopez AD, Viader-Salvado JM, Sanchez CN.** Pteridine concentrations differ between insectary-reared and field-collected *Anopheles albimanus* mosquitoes of the same physiological age. *Med Vet Entomol* 2002; **16** : 225-234.
- 3- **Lardeux F, Ung A, Chebret M.** Spectrofluorometers are not adequate for aging *Aedes* and *Culex* (Diptera : Culicidae) using pteridine fluorescence. *J Med Entomol* 2000; **37** : 769-773.
- 4- **Beard CB, Benedict MQ, Primus JP, Finnerty V, Collins FH.** Eye pigments in wild-type and eye-color mutant strains of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Hered* 1995; **86** : 375-380.
- 5- **Sohal RS, Donato H.** Effects of experimentally altered lifespans on the accumulation of fluorescent age pigment in the housefly *Musca domestica*. *Exp Gerontol* 1978; **13** : 335-341.
- 6- **Detinova TS.** Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les diptères présentant une importance médicale. Genève : OMS, 1963; 220 p. (Série monographie, n°47).

ANNEXES

Distribution de la longueur des ailes (en mm) des *Anopheles gambiae* sur lesquels portent les résultats. Ces mesures sont la moyenne des deux ailes entre l'extrémité distale de l'alula et la pointe de la veine R3

Moustiques	Mâles	Femelles
Effectif	27	128
Moyenne	3,09	3,18
Ecart-type	0,11	0,11
Médiane	3,06	3,06
Maximum	3,36	3,96
Minimum	2,90	2,92