

UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

*Discipline : Biologie des populations et écologie*

*Formation Doctorale : Parasitologie*

*Ecole Doctorale : Biologie Intégrative*

---

***Anopheles sundaicus* s.l., vecteur majeur du paludisme sur  
le littoral sud-est asiatique**

**De la caractérisation du complexe d'espèces à sa surveillance dans le  
sud Vietnam**

---

présentée et soutenue publiquement

par

**Isabelle DUSFOUR**

Le 6 décembre 2004

**JURY**

M. PARZY D., Professeur, IMTSSA, Le Pharo, Marseille  
M. REITER P. Professeur, Institut Pasteur, Paris  
Mme BRAUN-BRETON C., Professeur de l'Université Montpellier II  
Mme MANGUIN S., Directeur de recherche, CBGP-IRD, Montpellier  
M. COOSEMANS M., Professeur, IMT, Anvers, Belgique  
M. HARBACH R.E., Professeur, NHM, Londres, Royaume-Uni

Rapporteur  
Rapporteur  
Président  
Directeur  
Codirecteur  
Examineur

*Tu peux tout accomplir dans la vie si tu as le courage de le rêver, l'intelligence d'en faire un projet réaliste, et la volonté de voir ce projet mené à bien.*  
*Sidney A. Friedman*

*Ce manuscrit représente la finalisation de 8 années universitaires, le travail de trois années de thèse mais il est aussi et surtout un tremplin vers la vie professionnelle. Longue est la liste de ceux qui, affectueusement, amicalement, scientifiquement, financièrement, ont amené un jour ou l'autre une pierre à l'édifice.*

*Je voudrais tout d'abord remercier Catherine Braun-Breton, Paul Reiter et Daniel Parzy pour avoir fait partie des membres du jury.*

*Le projet « sundaicus » n'aurait jamais vu le jour sans Sylvie Manguin, Marc Coosemans et Ralph Harbach, merci de me l'avoir confié, de m'avoir soutenue, guidée et conseillée, en voici la concrétisation.*

*Merci aussi à Jean-Yves Rasplus et Johan Michaux pour m'avoir aidé au cours de ces trois années de thèse.*

*Je voudrais maintenant remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenue pendant ces trois années au CBGP, tous ceux dont les discussions ont fait avancer ce travail, tous ceux avec qui, un jour ou l'autre, j'ai partagé la paillasse.*

*Nath, toujours présente, toujours disponible....*

*Jean-michel, toujours présent du boulot à la rigolade, tu seras toujours le bienvenue dans le bureau....même quand j'y serais plus....*

*Sand, qu'est ce que j'aurais fait sans tes conseils en BM ?*

*Je voudrais faire une spéciale dédicace « aux filles », bureau B1.10, Cathy, Christine et Cécile. Clairounette, les débuts furent difficiles mais les missions resserrent les liens !!! Je voudrais te remercier pour ta contribution au mystère sundi et pour m'avoir remonté le moral. Le rice cooker et le grill resteront toujours près de moi sur mon chemin. Cam On Chi. Merci à toutes pour les rires, les « quelques » potins et QPUC...*

*Bien avant et bien en dehors du CBGP le soutien des amis a été essentiel dans cet accomplissement. Fred et Val, Steph, notre amitié a été le point de départ de mon parcours. Nos chemins ont un peu dévié de leurs objectifs initiaux mais les années et la distance n'ont rien altéré à notre relation. Seb et Zou, Pakal, Pris et l'abbé, Toinou et Mimi, Nico et les autres, que la génération qui arrive ne fasse que renforcer cette amitié !!!!*

*Rien n'aurait été possible sans mes parents. Votre soutien sans faille dans la voie que j'ai choisi et la persévérance que vous m'avez enseignée sont aujourd'hui concrétisés. Recevez aujourd'hui toute ma gratitude.*

*Omer, merci mon « petit » frère pour ta présence, ton soutien. Félicitation à toi aussi !!!*

*Merci aussi à tous les membres de ma famille qui m'ont fait confiance et qui ont été présent pour me soutenir. Un merci particulier à mamé juju et papé loulou, tatie Chris et tonton Michel, Cécile, tatie Jo et tonton Dado, tatie Micky, Nicole, Simon, Régine, Fabienne et Jacques (la première année de fac est loin, colocataire !!!) pour leur présence en ce jour ci particulier. Merci aussi à Kilu, Colette, Malika et Fabrice, Djémila et Raphaël, Karim, Michèle et Pierre.*

*Enfin, et non le moindre, Kamel, ton soutien et ta confiance pendant ces quatre années, et surtout ces derniers mois sont la pierre d'angle de toute cette réalisation et certainement de bien d'autres encore...*

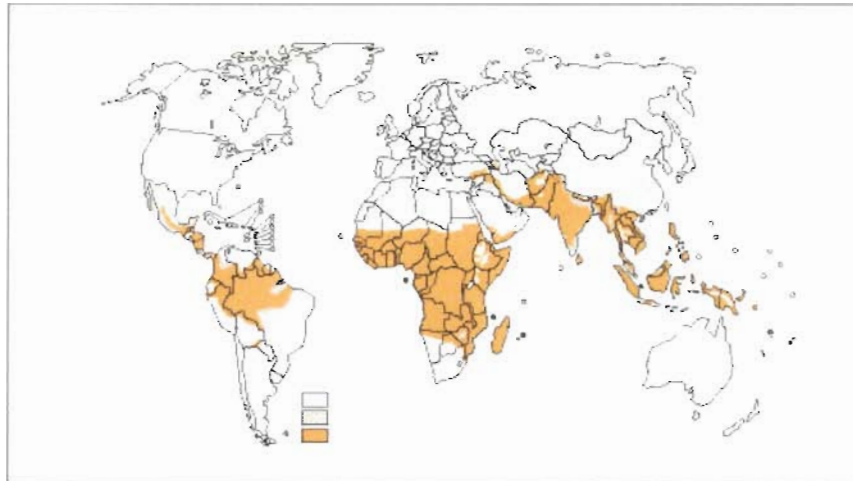
# SOMMAIRE

<b>AVANT PROPOS</b>	<b>2</b>
<b>PARTIE I • INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
Chapitre 1 • Les anophèles, vecteurs du paludisme	6
Chapitre 2 • Présentation d' <i>An. sundaicus</i> s.l.	10
<b>PROBLEMATIQUE &amp; PRESENTATION DES TRAVAUX</b>	<b>23</b>
<b>PARTIE II • TAXONOMIE ET PHYLOGÉOGRAPHIE</b>	<b>26</b>
Chapitre 1 • Méthodologie	29
Chapitre 2 • Analyses	36
Chapitre 3 • Synthèse et discussion générale	63
<b>PARTIE III • METHODES D'IDENTIFICATION</b>	<b>71</b>
Chapitre 1 • Identification morphologique d' <i>An. sundaicus</i> s.l.	73
Chapitre 2 • Mise au point de méthodes d'identification	76
<b>PARTIE IV • CARACTÉRISATION D'<i>AN. SUNDAICUS</i> S.L.</b>	<b>91</b>
Chapitre 1 • Contexte	94
Chapitre 2 • Méthodologie	99
Chapitre 3 • Environnement, biologie et résistance	105
Chapitre 4 • Applications, discussion et perspectives	118
<b>PARTIE V • CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE</b>	<b>122</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>127</b>
<b>ENCADRES, FIGURES, ILLUSTRATIONS ET TABLES</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>143</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>178</b>

## **AVANT PROPOS**

Le paludisme est une parasitose causée par un protozoaire parasite du genre *Plasmodium* transmis à un hôte vertébré par l'anophèle femelle. Sa distribution se situe sur la ceinture tropicale et sub-tropicale (Figure 1). De nos jours, le paludisme est un problème de santé pour 2,4 milliards de personnes, représentant 40% de la population mondiale, et touche directement 500 millions d'entre eux (Phillips 2001), tandis que 1 à 2 millions en meurent chaque année. Bien que le paludisme soit un grave problème en Asie et en Amérique latine, il reste le problème majeur de santé publique en Afrique sub-saharienne qui représentent 90% de la population mondiale touchée par cette maladie et en particulier les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. L'impact économique du paludisme se situe à 2 niveaux. Un impact direct qui correspond au coût des traitements et un coût indirect lié à la perte économique lorsque l'adulte est malade ou lorsqu'il s'occupe d'un enfant malade, mais aussi à la perte économique future due à la mortalité infantile. Dans les pays d'Afrique à fort taux de transmission, la pénalité dans la croissance économique peut atteindre 1,3% (RBM : <http://rbm.who.int>).

La lutte contre cette maladie est menée sur deux voies. D'une part, l'éradication du parasite qui est basée sur la stérilisation du réservoir humain grâce à des mesures préventives et la chimiothérapeutique. D'autre part, la lutte contre le vecteur qui passe par le développement de stratégies de lutte par limitation du contact homme/moustique, notamment par l'utilisation d'insecticides. Les années 1930-40 ont donné lieu à la mise au point des premiers médicaments antipaludéens et insecticides efficaces et peu onéreux (Schechter et al. 1949). Dès sa création en 1948, l'organisme mondial de la santé (OMS) a donné priorité à la lutte contre le paludisme. Les efforts de lutte se sont concentrés jusqu'en 1972 sur une volonté d'éradiquer cette maladie. Les stratégies développées après cette date par l'OMS, étaient basées non plus sur l'éradication mais sur le contrôle : diagnostic et traitement rapide des cas, prévention (dont la lutte antivectorielle), endiguement des épidémies et renforcement des capacités nationales de lutte (Mouchet et al. 2004). Le développement d'un programme efficace contre les parasites et les vecteurs a permis de diminuer voire d'éradiquer la maladie dans certains pays (Mouchet et al. 2004). Cependant, les nombreuses épidémies meurtrières (Mouchet et al. 1998) ont montré les faiblesses de ces nouvelles stratégies. De plus, le développement d'une double résistance de *Plasmodium* aux antipaludéens et des anophèles aux insecticides a aggravé la situation du paludisme dans le monde. Cette maladie a de fait réémergé depuis les 25 dernières années et elle est réapparue dans des pays où elle était maîtrisée ou avait disparue (Trape et al. 2002). Une redéfinition des priorités en terme de lutte (Declan 1997) a permis d'établir des programmes qui cherchent non plus à éradiquer ce fléau, mais plutôt à limiter la morbidité et la mortalité pour arriver progressivement à son élimination.



**Figure 1 : distribution du paludisme dans le monde. Copyright <http://rbm.who.int>**

L'échec, aujourd'hui, d'une lutte efficace contre cette maladie est aussi du à l'absence de vaccin efficace. Trois voies sont explorées pour son développement. Le vaccin peut être dirigé contre les antigènes des phases pré-érythrocytaires (sporozoïtes et formes hépatiques), des phases pré-érythrocytaires asexuées ou des stades sporogoniques (Mouchet et al. 2004). Une quarantaine d'essais de vaccins a eu lieu depuis vingt ans, la plupart dirigés contre les sporozoïtes, quelques-uns contre les formes sanguines et un seul contre la transmission. Les vaccins testés aujourd'hui sont limités face à la diversité antigénique produite à chaque stade parasitaire et à l'hétérogénéité de la réponse immunitaire chez l'homme. Leur développement doit alors faire face à un double défi: couvrir la diversité et le polymorphisme des populations de parasites, mais également être aussi simple et bon marché que possible.

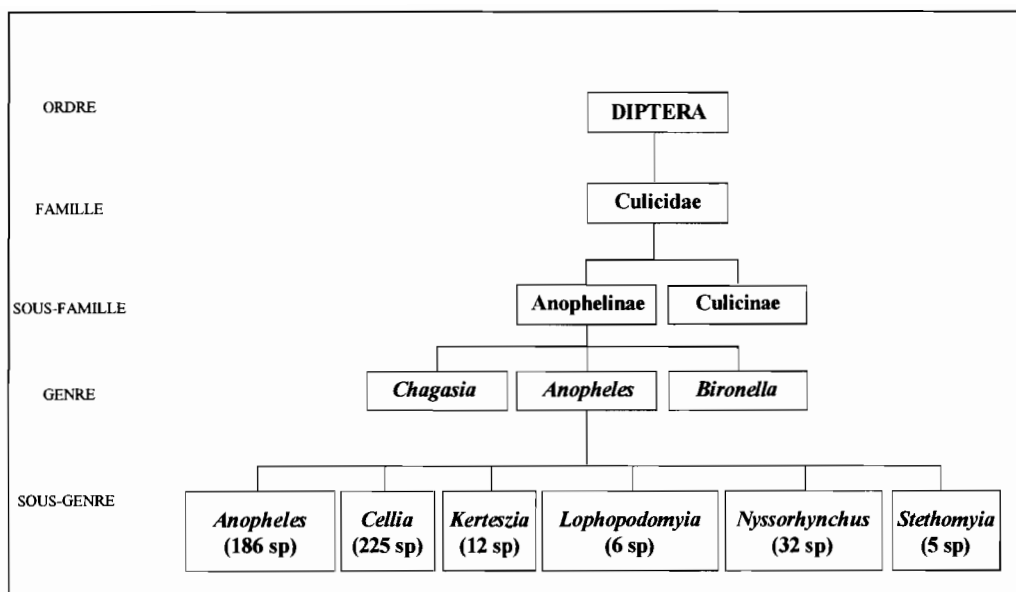
En attendant l'arrivée d'un vaccin, il est indispensable de continuer la lutte par la prise en charge des malades, la protection des groupes à risque, la prévention par la lutte antivectorielle et la prévention et la lutte contre les épidémies.

## **PARTIE I • INTRODUCTION**

## CHAPITRE 1 • LES ANOPHELES, VECTEURS DU PALUDISME

L'étude du paludisme a débuté dès la fin du siècle dernier par la découverte, en 1880 par Alphonse Laveran, de l'agent causal de la maladie, un parasite protozoaire du genre *Plasmodium*. Les premiers oocystes paludéens ont été découverts entre 1895 et 1897 par le docteur Ronald Ross dans les parois de l'estomac des moustiques du genre *Anopheles* ayant piqués un malade atteint du paludisme. L'année suivante, Giovanni Batista Grassi décrit les transformations du parasite chez *An. claviger* et prouve que le paludisme observé chez l'homme est bien transmis par les anophèles. A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les trois acteurs de cette maladie étaient donc identifiés avec le parasite du genre *Plasmodium*, le vecteur du genre *Anopheles* et l'homme. Malgré les nouvelles stratégies de contrôle développées depuis 1972 par l'OMS, le paludisme est toujours la maladie parasitaire la plus meurtrière au monde (Mouchet et al. 2004). Aujourd'hui, sans vaccin contre cette maladie, la lutte antivectorielle reste un moyen d'action efficace. Cependant, elle doit être basée sur une connaissance approfondie de la taxonomie, de la biologie et de l'écologie des populations vectorielles afin d'optimiser les moyens de contrôle et de soutenir le développement d'études épidémiologiques.

**LE GENRE ANOPHELES.** Le moustique vecteur de *Plasmodium* est un anophèle, du genre *Anopheles*, qui comprend 6 sous-genres reconnus (Harbach 2004). Sur 466 espèces d'anophèles reconnues dans le monde, 70 à 80 sont considérés comme vectrices d'agents du paludisme et une vingtaine comme vecteurs majeurs. Le genre *Anopheles* inclut aussi des moustiques qui transmettent des agents de filarioses et des arbovirus pathogènes pour l'homme et les animaux. Les sous-genres *Anopheles* et *Cellia* possèdent le plus grand nombre d'espèces (186 et 225 respectivement) (Figure I-1). Le sous-genre *Nyssorhynchus*, incluant aussi des vecteurs majeurs du paludisme (notamment *An. darlingi*), ne comporte que 32 espèces. Aucune espèce des sous-genres *Lophopodomyia* et *Stethomyia* n'est vectrice. Les plus grands sous-genres sont classés en section, série, groupe et complexe d'espèces (Harbach 2004). Les complexes d'espèces sont des espèces jumelles c'est-à-dire morphologiquement proches ou indifférenciables. Ces espèces peuvent avoir des comportements, des écologies et des capacités vectorielles différentes. Un grand intérêt doit être porté à l'identification et à leur caractérisation de ces espèces afin de déterminer leur rôle dans la transmission du paludisme.



**Figure I-1 : classification des *Anopheles* de l'ordre au sous-genre. Le nombre d'espèces dans les sous-genres est indiqué entre parenthèses.**

**LE CYCLE BIOLOGIQUE** des anophèles est constitué d'une phase aquatique au cours de laquelle les stades immatures se développent et d'une phase aérienne pendant laquelle l'adulte se consacre à la reproduction. Le cycle est ponctué de mues qui ont lieu au moment des changements de stade immature, puis d'une métamorphose complète pour le passage au stade imaginal. La femelle pond, à la surface de l'eau, 100 à 300 œufs munis de flotteurs latéraux. Les œufs éclosent généralement dans les 2 à 3 jours, selon la température. Ils sont sensibles à la dessiccation et ne peuvent survivre que quelques jours. Les larves, sans siphon, vivent parallèlement à la surface de l'eau. Les brosses buccales drainent vers la bouche les particules alimentaires. Les larves se développent en 4 stades, L1 à L4. Le développement larvaire se fait généralement en une semaine, mais peut varier selon les conditions environnementales. La L4 devient une nymphe après mue. Ce stade a une durée inférieure à 2 jours et donnera lieu, après métamorphose, à l'émergence de l'adulte ou imago.

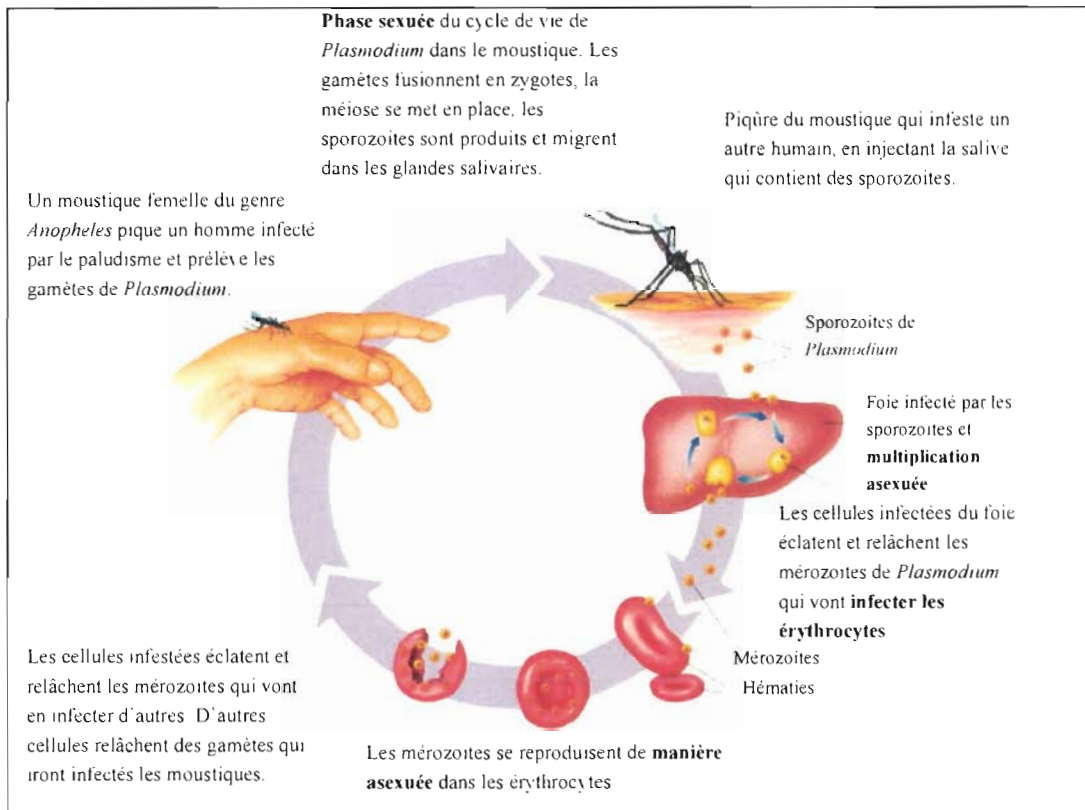
La fécondation a lieu le troisième jour qui suit l'émergence des adultes. Le mâle doit subir une hémirrotation de son appareil génital avant de pouvoir s'accoupler. Ce phénomène a lieu dans les 24h après l'émergence. Les mâles forment un essaim de reproduction au crépuscule. Les femelles s'approchent alors de cet essaim pour l'accouplement. La femelle n'est fécondée en général qu'une fois, les spermatozoïdes sont stockés dans une spermathèque et féconderont les ovocytes lors de leur passage dans l'oviducte. Après chaque fécondation d'ovocytes, la femelle cherche un hôte vertébré selon ses préférences trophiques, attirée par l'émanation de gaz carbonique de la respiration de l'hôte, puis par la transpiration et la température corporelle. Ce repas sanguin permettra de mener les œufs à maturité. La succession de recherche de l'hôte, prise du repas de sang, digestion et développement des ovocytes est appelée cycle gonotrophique dont la durée est de 2 jours. Au cours de sa vie (environ 1 mois), la femelle peut ainsi effectuer plus d'une dizaine de cycles gonotrophiques. Le choix du site de ponte par la femelle dépend de l'espèce et du lieu, d'où une

grande diversité dans les gîtes de ponte. Toutefois, l'absence de pollution organique est une constante chez les anophèles. Les comportements trophiques et gonotrophiques sont différents selon les espèces. Une femelle peut être anthropophile ou zoophile selon qu'elle pique préférentiellement l'homme ou l'animal lors du repas sanguin. Elle est endophage si elle pique à l'intérieur des habitations ou exophage si elle pique à l'extérieur. Enfin, on parle de femelle endophile ou exophile selon le lieu de repos après le repas sanguin, intérieur ou extérieur des maisons ou étables.

La survie et la densité des populations d'anophèles dépendent donc, d'une part des conditions météorologiques qui influence l'abondance des gîtes larvaires, et, d'autre part, de la proximité des hôtes.

**LA TRANSMISSION DU PALUDISME** est dépendante de 3 partenaires : le parasite de genre *Plasmodium*, un hôte intermédiaire vertébré (l'homme dans le cas du paludisme humain), et un anophèle femelle, hôte définitif. Le temps pour le parasite d'effectuer son cycle dans l'anophèle dépend du parasite, de l'hôte, mais aussi de l'environnement, plus particulièrement la température. Ce cycle appelé sporogonique, dure en régions tropicales, pour *Plasmodium falciparum*, environ 10 jours. L'hôte définitif, où se passe la **phase sexuée**, acquiert le parasite lors du repas sanguin sur un homme infesté (Figure I-2). Le moustique prélève des gamétocytes lors de son repas sanguin qui, dans le système digestif, formeront des zygotes. Ceux-ci traversent alors la paroi stomacale pour former un oocyste dans lequel se développeront les sporozoïtes qui entraîneront l'éclatement de l'oocyste à maturation. Les sporozoïtes ainsi libérés gagneront les glandes salivaires afin d'être transmis, lors du repas de sang suivant, à un autre hôte vertébré. Un moustique est considéré comme infectant du moment où les sporozoïtes sont dans les glandes salivaires. Une femelle est infectante à vie et peut donc infecter plusieurs hôtes lors ces cycles gonotrophiques après que ce soit accompli le cycle sporogonique.

La **phase asexuée** s'effectue chez l'hôte vertébré. Les sporozoïtes injectés par l'anophèle femelle, migrent alors vers le foie et se transforment en schizontes hépatiques, c'est la phase exo-érythrocytaire qui a lieu dans les cellules hépatiques. Cette schizogonie tissulaire est le lieu de la multiplication des mérozoïtes. Relâchés dans le système sanguin et après éclatement du schizonte, les mérozoïtes iront envahir les érythrocytes pour se multiplier en trophozoïtes puis en schizontes (schizogonie sanguine). Après éclatement des cellules sanguines, les schizontes réinfesteront d'autres cellules sanguines pour recommencer un cycle de multiplication ou bien pour débiter la gamétocytogenèse. Les gamétocytes matures, mâles et femelles, seront ensuite libérés dans la circulation sanguine périphérique, et prélevés par le moustique. C'est la phase érythrocytaire. L'éclatement des hématies entraîne l'épisode fébrile caractéristique du paludisme. Sur la centaine d'espèces de *Plasmodium*, quatre espèces sont pathogènes pour l'homme *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Sur ces 4 espèces, un seul, *P. falciparum*, peut entraîner la mort, si le malade survit, il est spontanément guéri. Les trois autres espèces, si elles ne sont pas mortelles, provoquent des rechutes.



**Figure I-2 : cycle de transmission du paludisme (d'après <http://www.millerandlevine.com/chapter/20/fig-20-7.html>)**

**VECTEUR DU PALUDISME HUMAIN.** Les anophèles ne sont pas tous vecteurs d'agents du paludisme, et seuls certains transmettent les parasites du paludisme humain. Un vecteur potentiel de paludisme humain doit être génétiquement compatible avec les plasmodies humaines et avoir une longévité permettant la réalisation des cycles sporogonique et gonotrophique. Il doit enfin avoir un comportement trophique au moins partiellement anthropophile.

#### **Encadré I-1 : symptômes du paludisme**

Les symptômes sont la fièvre et/ou des signes grippaux, incluant des frissons, des maux de tête, des douleurs musculaires et de la fatigue. Le cycle du parasite étant synchrone, les accès de fièvre sont périodiques. Leur périodicité dépend de l'espèce de *Plasmodium* en cause, et coïncide avec la multiplication des parasites et l'éclatement des globules rouges, qui conduit également à l'anémie. Des nausées, des vomissements et de la diarrhée peuvent être présents. Le paludisme à *P. falciparum* peut être fatal s'il n'est pas traité. Dans certains cas, les globules rouges infectés peuvent bloquer les vaisseaux sanguins irriguant le cerveau : c'est le neuropaludisme, souvent mortel.

CHAPITRE 2 • PRESENTATION D' *AN. SUNDAICUS* S.L.

*Anopheles sundaicus* a été décrit pour la première fois par Rodenwaldt en 1925 en tant qu'*An. ludlowi* variant *sundaica*. Le type provenait des îles Sunda (Indonésie). La reconnaissance d'*An. sundaicus* comme une espèce à part entière a été faite par King (1932), le distinguant morphologiquement de *An. ludlowi* et *An. litoralis*. *Anopheles sundaicus* a été souvent mal identifié et confondu avec *An. ludlowi* (King 1932, Christophers 1933, Reid 1968). Ainsi, sa distribution a été faussement reportée à plusieurs reprises en Chine, Taiwan et aux Philippines (Christophers 1933, Reid 1968). Dès 1933, Christopher le classe dans le sous-genre *Myzomyia* (= *Cellia*), Groupe *Pseudomyzomyia* sous le nom d'*An. sundaicus*. Reid, en 1968, se réfère donc à *An. sundaicus* comme étant classé dans le sous-genre *Cellia* et série *Pyrétophorus* selon la classification d'Edwards (1932) (Encadré I-2). On y retrouve aussi le complexe *Gambiae*, vecteur majeur en Afrique subsaharienne et le Complexe *Subpictus*, sympatrique d'*An. sundaicus* en Asie du sud-est (Encadré I-2). Linton et al. (2001a) décrit un néotype provenant de la plage de Pandan beach, Lundu, Province de Sarawak, Malaysia (Ile de Bornéo) car le type décrit par Rodenwaldt en 1925 était inexistant (Bonne-Webster and Swellengrebel 1953, Reid 1968). Ce travail de caractérisations morphologique et moléculaire est la base des investigations du travail présenté ici.

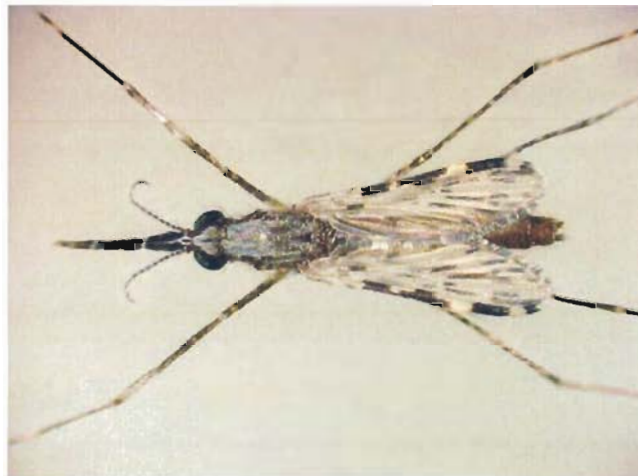


Illustration I-1 : *An. sundaicus* s.l. (Photo Mr Michel Dukhan, IRD, 2003.) Collecté en Janvier 2003 dans la province de Bac Lieu, Vietnam.

**Encadré I-2 : les membres de la série Pyrethophorus (Harbach 1994)**

<i>An. christyi</i> (Newstead & Carter)	Région Afrotropicale*
<i>An. daudi</i> Coluzzi	Région Afrotropicale*
<i>An. indefinitus</i> (Ludlow)	Région Orientale*
<i>An. limosus</i> King	Région Orientale*
<i>An. litoralis</i> King	Région Orientale*
<i>An. ludlowae</i> (Theobald)	Région Orientale*
<i>An. parangensis</i> (Ludlow)	Région Orientale*
<i>An. vagus</i> Doenitz	Région Orientale*
Complexe Sundaicus: <i>An. sundaicus</i> (Rodenwaldt)	Région Orientale *
Complexe Subpictus: <i>An. subpictus</i> Grassi	Région Orientale*
Complexe Gambiae: <i>An. arabiensis</i> Patton, <i>An. bwambae</i> White, <i>An. gambiae</i> Giles, <i>An. melas</i> Theobald, <i>An. merus</i> Doenitz, <i>An. quadriannulatus</i> Theobald espèces A et B	Région Afrotropicale*

\*d'après Mouchet et al. (2004)

---

**ARTICLE 1 - BIOLOGIE ET SYSTEMATIQUE DU COMPLEXE *AN. SUNDAICUS*, IMPACT SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME ET LA LUTTE ANTIVECTORIELLE**

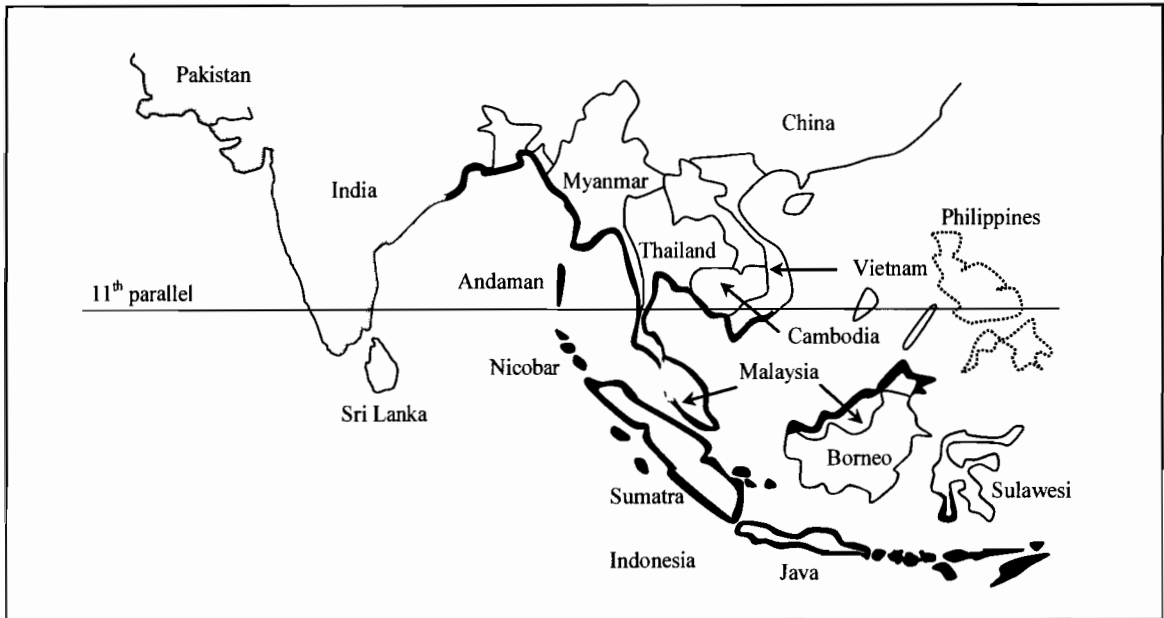
**Dusfour I. et al. 2004.** Bionomics and Systematics of the Oriental *Anopheles sundaicus* complex in relation to malaria transmission and vector control. **Am J Trop Med & Hyg** 71(4) 518-524

Malaria control strategies aim to decrease human morbidity and mortality by limiting parasite transmission (Declan 1997). The identification of vector species and knowledge of their ecology and behavior is essential for epidemiological studies and the design and implementation of appropriate vector control strategies. Among morphologically indistinguishable anopheline species, distinct eco-ethological differences have been used to identify putative species associated with malaria transmission (Green et al. 1990, Van Bortel et al. 1999, Della Torre et al. 2002). These putative species are now recognized as distinct genetic species.

In Southeast Asia, vector studies and malaria control are focused mainly on three major species complexes: *An. dirus* Peyton & Harrison, *An. minimus* Theobald and *An. sundaicus* Rodenwaldt. The *An. dirus* and *An. minimus* complexes are well known because they are widespread throughout Southeast Asia, whereas the *An. sundaicus* complex has been investigated to a much lesser degree because the species occur mainly in coastal areas (Soeparmo and Lair 1954, Hair 1973, Kalra 1978;1980, Brandling-Bennett et al. 1981, Bang 1985, Chooi 1985, Das et al. 1989, Nguyen Tang Am et al. 1993, Meek 1995, Barcus et al. 2002). The ecology, behavior and/or vectorial capacity of *An. sundaicus s.l.* have been described for populations in India, Indonesia, Malaysia, Vietnam, Myanmar, Thailand and Cambodia (Chow 1970); however, comparisons of the main characteristics of populations across the distribution of the taxon are wanting (Ikemoto 1996).

The probability that *An. sundaicus* represents a complex of species was hypothesized on the basis of eco-ethological differences and isolation of populations on the coastal areas and islands of Southeast Asia (Kalra 1978, Rao 1984, Chang Moh Seng et al. 2001). The recent use of genetic and molecular tools confirmed the genetic isolation of species that comprise the *An. sundaicus* complex (Sukowati et al. 1996, 1999). Considered an efficient malaria vector taxon, *An. sundaicus s.l.* has been a principal target of mosquito control programs even though links between biological characteristics and vectorial capacity have not been clearly defined.

The aim of this paper is to consolidate available information about the *An. sundaicus* complex as a foundation for further investigation and a better understanding of the individual species across their ranges of distribution. Unless otherwise noted, *An. sundaicus* refers to *An. sundaicus s.l.* in the discussion below.



**Figure I-3: distribution of the *An. sudaicus* complex. Coastal areas lined in black represent the currently recognized distribution. Grey zones are areas where *An. sudaicus* reportedly disappeared. The taxon is absent or has never been recorded from uncolored areas.**

## DISTRIBUTION

The distribution of *An. sudaicus* includes coastal areas (Figure I-3) from northeastern India to southern Vietnam (below the 11<sup>th</sup> parallel), south to the Nicobar, Andaman and Indonesian islands (Reid 1968, Sukowati et al. 1996, Linton et al. 2001a). The taxon occurs in southern Sulawesi (Reid 1968, Collins et al. 1979) but is absent from the Philippines (Coosemans et al. 1998, Phan 1998) and has not been reported from southern Borneo (Christophers 1933, Nagpal and Kalra 1997) (Figure I-3). It has been recorded from Pakistan (Puri 1936;1948, Nasiruddin 1952) and two localities in northwestern India (Singh et al. 1985), but these records require verification.

Environmental changes due to human activities seem to be causing the disappearance of the taxon from coastal areas (Rajogopal 1976, Kalra 1978, Dash et al. 1984, Bang 1985, Nguyen Tang Am et al. 1993). Recent field surveys in northwestern peninsular Malaysia and the eastern coastal region of India (Figure I-3) suggest that *An. sudaicus* no longer occurs there (Sandosham and Thomas 1983, Nagpal and Kalra 1997, Dash et al. 2000).

Earthen embankments were built in peninsular Malaysia, to prevent intrusion of sea water (Abu Hassan et al. 1997) and profound ecological and salinity changes occurred in India (Dash et al. 1984), which probably altered or eliminated potential larval habitats. In other countries such as Pakistan, field records are not recent and the occurrence of *An. sudaicus* is uncertain. In addition, local populations of *An. sudaicus* are known to have a fluctuating, patchy distribution in space and time, changing through the year in response to the availability of adequate breeding sites (Reid 1968, Scanlon et al. 1968, Ikemoto et al. 1986). In general, the distribution of *An. sudaicus* on the coastal areas and islands of Southeast Asia is poorly known due to a paucity of available data.

## **BIONOMICS: FIRST EVIDENCE OF A SPECIES COMPLEX**

**Immature stages.** The immature stages of *An. sundaicus* inhabit sunlit bodies of stagnant water, including ponds with vegetation and floating algae (Ikemoto et al. 1986, Nguyen Tang Am et al. 1993), swamps (Kalra 1978), mangrove (Harinasuta et al. 1974), wells, rockpools (Nagpal and Kalra 1997, Chang Moh Seng et al. 2001), and particularly shrimp/fish ponds along the coast or irrigated by inland sea-water canals (Christophers 1933, Soeparmo and Lair 1954, Soerono et al. 1965, Collins et al. 1979, Nguyen Tang Am et al. 1993, Phan 1998), which are reported as favorable habitats in Vietnam and Indonesia (Illustration I-2). Sea-water aquaculture was known during the 18<sup>th</sup> century in Jakarta to be favorable for malarial mosquitoes, which were most likely *An. sundaicus* (Van der Brug 1997). Lagoons and creeks (Soeparmo and Lair 1954, Kalra 1978, Kirnowardoya and Yoga 1987, Miyagi et al. 1994, Nagpal and Kalra 1997, Das et al. 1998) and blocked river mouths (Chow 1970, Chooi 1985) are also favorable sites for *An. sundaicus* larvae. As the majority of suitable larval habitats are provided with saline water from the sea, *An. sundaicus* has been described as mainly a brackish water breeder in coastal areas (Soeparmo and Lair 1954, Nguyen Tang Am et al. 1993, Webster 2000b). However, the taxon has been found in inland sites with either brackish or freshwater. In southern Vietnam, where no permanent freshwater breeding sites have been encountered, sea water canals contribute saline water to larval habitats (Phan 1998). In contrast, *An. sundaicus* larvae breed in inland freshwater ponds in India (Senior-White and Adhikari 1939, Nagpal and Kalra 1997), Car Nicobar island (Das et al. 1998), peninsular Malaysia (Reid 1966), Sarawak (Malaysian Borneo (Chang Moh Seng et al. 2001) and Indonesia (Soeparmo and Lair 1954, Collins et al. 1979, Sukowati et al. 1996). Published data indicate that larvae tolerate salinity ranging from 0 to 11% (Figure I-4), i.e. from freshwater (<0.05%) to much greater concentrations than sea water (3.5%). Over time, salinity in ponds changes as a result of rainfall, inundation by sea water and evaporation (Reid 1968, Phan 1998).

Soeparmo and Lair (1954) and Kikuchi *et al.* (1997) noted that the levels of salinity in coastal habitats are affected by tidal movements. Therefore, any comparison of salinity must be done cautiously, as indicated by the different optimal ranges shown in Figure I-4. Phan (1998) noted a positive correlation between salinity and vector density, with peak density at the start of the rainy season. This correlation shows the importance of salinity tolerance in larval development. In addition, Collins et al. (1979) noted that *An. sundaicus* females in southern Sulawesi readily oviposit in freshwater if no brackish water sites are available. The wide range from freshwater to saline breeding sites was one of the differences that led mosquito workers to hypothesize that *An. sundaicus* was a species complex (Chang Moh Seng et al. 2001).

Either different species accounted for observed ecological differences or one euryhaline species was tolerant to a wide range of salinity.

**Illustration I-2 : gîtes larvaires d'*An. sondaicus* s.l.**



**A /** Bassin d'élevage de crevettes couvert d'algues flottantes. Province de Bac Lieu, Sud Vietnam.  
(Photo I. Dusfour, 2003)

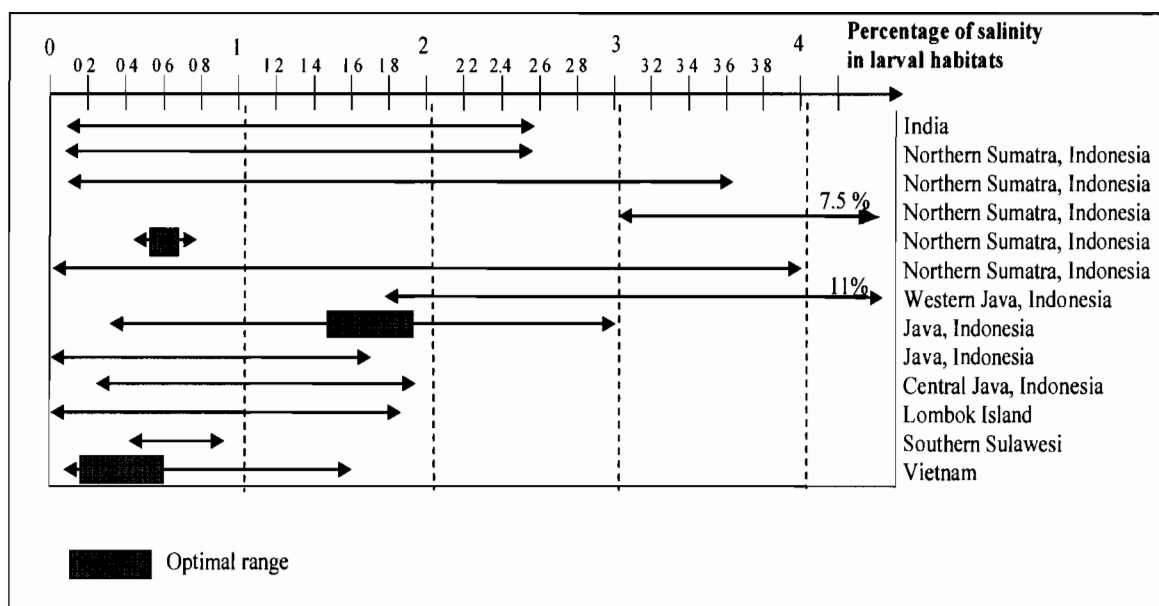
**B/** Bassins d'élevage de crevettes ensoleillés avec de la végétation immergée. Province de Ben Tre, Sud Vietnam. (Photo I. Dusfour, 2003)



**C/** Algues filamenteuses flottantes et végétation immergée. Province de Tien Giang, Sud Vietnam.  
(Photo I. Dusfour, 2003)

**D/** Gîte larvaire dans les rochers de la plage de Pandan beach à Lundu, Sarawak, Malaysia . Les gîtes sont caractérisés par l'absence de végétation émergée ou émergente et d'algues filamenteuses flottantes.  
(Photo Y.M. Linton, 2001)





**Figure I-4 : range and optimal range of salinity reported for breeding sites of *An. sundaicus* in various countries.**

Compared to salinity, the pH of larval habitats is not so variable, ranging from 7 to 8.5 in India, Vietnam and Java (Indonesia) (Kirnowardoya and Yoga 1987, Das et al. 1989, Nguyen Tang Am et al. 1993, Nagpal and Kalra 1997).

Filamentous floating algae and aquatic plants appear to be crucial for the development of *An. sundaicus* larvae (Kirnowardoya and Yoga 1987, Nguyen Tang Am et al. 1993). Aquatic flora supplies food (micro-algae and bacteria) and protection against predators (Soeparmo and Lair 1954, Schaefer and Kirnowardoyo 1983, Imai et al. 1988). In Bengal (India), Iyenger (1945) found a direct relationship between surface algae together with submerged vegetation and breeding sites. Exceptions include sites on the Coral Beach of India (Christophers 1933) and rock pools on Pandan Beach in the Lundu District of Sarawak (Malaysian Borneo) (Chang Moh Seng et al. 2001) where no vegetation was present. Freshwater plants such as *Salvinia* sp. (Imai et al. 1988) and *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) (Kikuchi et al. 1997) are associated with the absence of *An. sundaicus* larvae, but as immature stages occur in freshwater habitats these plants seem to be more a barrier to oviposition than indicators of unfavorable breeding places (Kikuchi et al. 1997).

**Adult behavior.** Differences in adult behavior are also indicators of species diversity. *Anopheles sundaicus* exhibits both endophagy and exophagy. It is mainly endophilic and anthropophilic but also exhibits exophily and zoophily (Table 1). Indoor application of insecticide for vector control revealed the presence of exophagic, exophilic and zoophilic *An. sundaicus* in areas of the Nicobar islands and Vietnam where the vector was previously known to be endophagic, endophilic and anthropophilic (Kalra 1978, Phan 1998).

Country	Trophic preference	Resting preference	Biting preference	Source
Cambodia	Exophagy		Anthropophily	(Chow 1970)
Cambodia	Exophagy/endophagy	Endophily	Zoophily/anthropophily	(Webster 2000b)
India (Nicobar/Andaman)	Endophagy	Endophily	Anthropophily	(Covell 1927)
India (Andaman/Orissa)		Endophily	Anthropophily	(Covell and Singh 1942)
India (Nicobar/Andaman)	Exophagy	Exophily	Zoophily/anthropophily	(Kalra 1978)
India (Nicobar)			Zoophily	(Kumari et al. 1993)
India (Nicobar)	Endophagy	Endophily		(Kumari and Sharma 1994)
India (West Bengal)			Zoophily/anthropophily	(Nandi et al. 2000)
Indonesia (northern Sumatra)	Exophagy/endophagy	Exophily		(Ikemoto 1982)
Indonesia (western Java)	Endophagy	Endophily		(Akiyama 1984)
Indonesia (central Java)	Endophagy	Endophily		(Kirnowardoya and Yoga 1987)
Indonesia (Sulawesi)	Endophagy	Endophily	Anthropophily	(Collins et al. 1979)
Malaysia	Exophagy	Exophily	Zoophily	(Moorhouse and Wharton 1965)
Malaysia	Exophagy		Anthropophily	(Chow 1970)
Malaysia (Sarawak)	Endophagy			(Chow 1970)
Thailand		Exophagy	Zoophily	(Gould et al. 1966)
Vietnam		Endophily	Anthropophily	(Giang et al. 1980)
Vietnam		Exophily		(Phan 1998)

**Table I-1 : behavior of *An. sundaicus* observed in different localities**

Females exhibit a peak of biting activity from 20:00 to 03:00 depending on locality. Adventitious biting in dark houses during the day has been observed in Vietnam (Hair 1973, Nguyen Tang Am et al. 1993), but humans are generally at higher risk of being bitten indoors while sleeping during the night. *Anopheles sundaicus* is capable of flying long distances, ranging from 1.6 km to 9 km (Sundaraman et al. 1957, Reid 1968, Sandosham and Thomas 1983, Meek 1995), but blood feeding depends on the location, the availability of hosts and insecticide pressure.

Due to its ecological and behavioral plasticity, *An. sundaicus* has adapted to a range of coastal and inland environmental situations. The main requirement is the presence of sunlit breeding sites with fresh or brackish water, floating algae and non-invasive vegetation in coastal areas and on islands. Adult females are mainly anthropophagic and endophilic. Comparison of the biology of *An. sundaicus* with that of the more intensely studied *An. gambiae* complex in Africa or the *An. minimus* complex in Asia suggested the existence of a species complex in the absence of other evidence. Investigation based on genetic tools confirmed that *An. sundaicus* is a complex of species.

## GENETIC CONFIRMATION OF A SPECIES COMPLEX

Genetic tools were used to establish beyond doubt that *An. sundaicus* is a species complex. Cytogenetic and enzymatic studies were first carried out on populations from Thailand and Indonesia (Java and Sumatra) that resulted in the discovery of three forms, informally designated forms A, B and C (Sukowati et al. 1996, Sukowati et al. 1999). A fourth cytotype named D, was

identified on Car Nicobar Island (Nanda et al. 2004). Form A was collected from coastal areas of Thailand, Sumatra and Java. Form B was mainly collected in the freshwater sites at South Tapanuli in northern Sumatra in association with form A, where it comprised 92.9% of females captured in September 1993 and 87.5% in September 1994 (Encadré 1-3). Form B was also found with form A in a brackish water area at Purwojero in south-central Java, where it comprised 9.9% of the collections. Form C was only found in one coastal locality at Asahan in northeastern Sumatra, where it occurred in sympatry with both species A and B (48.4% A, 14.5% B, and 37.1% C). The presence of forms A and B at both freshwater and brackish water sites seemed to dispel the hypothesis that populations with different ecological requirements might represent different species.

In fact, use of the cytochrome b (Cyt-b) and cytochrome oxidase I (COI) mitochondrial markers later showed that mosquitoes reared from an inland freshwater pond near Miri and a brackish water rock pool on the shore of the South China Sea in the Lundu District of Sarawak were the same species (Dusfour et al. 2004b). Based on the formal taxonomic recognition and definition of *An. sundaicus* s.s. as the species encountered in Miri and Lundu (Linton et al. 2001a), Dusfour et al. (2004b) demonstrated that form A in the coastal areas of Vietnam and Thailand is a different genetic species of *An. sundaicus* complex<sup>1</sup>.

The genetics of *An. sundaicus* are poorly explored but the limited chromosomal, isozyme and molecular studies confirmed that the taxon is a species complex. However, the molecular studies were based on some different populations than the chromosomal and isozyme studies, and the results cannot be correlated entirely. Further investigation using the same markers and the same populations is required to clarify the number of species that comprise the complex.

### ***ANOPHELES SUNDAICUS*: A MALARIA VECTOR**

Differences in the adult behavior and larval habitats of *An. sundaicus* are indicative of an increased risk of contact with humans. *Anopheles sundaicus* is considered as either a major vector or secondary vector of malaria depending on region and country (Schaefer and Kirnowardoyo 1983, Meek 1995). It was regarded as a secondary vector in Thailand in the past (Gould et al. 1966, Harinasuta et al. 1974). However because of its occurrence close to tourist sites it is now considered as a potential major vector (Chowanadisai et al. 1989). In contrast, it has been regarded as the principal vector in coastal areas of India (Rao 1984), Vietnam (Nguyen Tang Am et al. 1993) and Indonesia (Soeparmono and Lair 1954, Miyagi et al. 1994). Kirnowardoyo and Yoga (1987) noticed that malaria transmission at Chilacap on Java fluctuated widely, not only from year to year, but also from locality to locality during the same year. In the meantime, *An. sundaicus* was responsible for local epidemics in Orissa (India) from 1930 to 1940 (Nagpal and Kalra 1997), Calcutta in 1936 (Sen 1938), Vietnam from 1965 to 1985 (Phan 1998) and Indonesia in 1985 (Kirnowardoyo and Yoga 1987).

---

<sup>1</sup> Ce travail a été effectué dans le cadre de la thèse et est décrit dans la partie Taxonomie et Phylogéographie

### Encadré I-3 : études de cytogénétiques chez *An. sundaicus* s.l.

D'après (Sukowati et al. 1996, Nanda et al. 2004)

L'étude décrite par Sukowati et al. (1996), a été menée sur des populations naturelles d'*An. sundaicus* par analyse de chromosomes polytènes des cellules ganglionnaires de larves. Le caryotype d'*An. sundaicus* a montré, comme pour tous les anophèles,  $2n=6$  chromosomes, deux paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels.

En 1996, Sukowati et al. ont décrit 3 formes chromosomiques (A, B, C) réparties en Thaïlande et en Indonésie. Deux types de chromosomes X ont été observés basés sur des différences dans la répartition et la densité de l'hétérochromatine centromérique. Le chromosome Xa possède 4 bandes claires, larges et diffuses à l'extrémité. Le variant Xb a un profil différent sur l'extrémité, avec deux bandes noires proéminentes. Le chromosome 2 présente une variation sur son bras 2R. Le variant 2Rb se distingue du 2Ra par la présence d'une zone diffuse proche de la région centromérique. De plus, deux types distincts ont été trouvés pour le chromosome Y. Les deux formes télomériques sont constituées de deux blocs d'hétérochromatines. Cependant, Y2 est plus grand que Y1 possédant un bloc d'hétérochromatine supplémentaire.

La distinction des trois formes se fait par la combinaison des différents types (Table I-2). La forme B est fortement liée à des gîtes d'eau douce, alors que les formes A et C semblent être corrélées à l'eau saumâtre.

Nanda et al. (2004) se sont basés sur ces types pour caractériser des populations des îles Car Nicobar. Un quatrième type, D, a alors été identifié. Mais aucune différence n'a été trouvée entre des gîtes d'eau douce et d'eau saumâtre.

Formes	Profils de bandes des chromosomes polytènes				Chromosomes mitotiques	
	Xa	Xb	2Ra	2Rb	Y	ch
A	+	-	+	-	Y1	Normal
B	-	+	+	-	Y1	Normal
C	-	+	-	+	Y2	Grand
D	+	-	-	+	Y2	Grand

Table I-2 : résumé des différences entre les chromosomes polytènes et mitotiques des trois formes d'*An. sundaicus*. +, présence ; -, absence ; ch, block d'hétérochromatine péricentrique du chromosome 2.

### Encadré I-4 : études isoenzymatiques chez *An. sundaicus* s.l.

Les résultats obtenus en cytogénétique ont été confirmés par une analyse basée sur 12 marqueurs isoenzymatiques (Sukowati et al. 1999). La Mannose Phosphate Isomerase (Mpi) a révélé 2 isomères discriminants pour les espèces A et B. L'allèle a est caractéristique de l'espèce A et l'allèle b est caractéristique de l'espèce B. La forme C présente une fréquence des allèles a et b équivalente.

Formes	Fréquences des isomères de la Mpi
A	Freq (Allele a) > 0.933
B	Freq (Allele b) > 0.889
C	Freq (Allele a) ± Freq (Allele b)
D	

Table I-3 : résumé des fréquences alléliques de Mpi pour chacune des espèces discriminées par l'étude en cytogénétique.

Outbreaks in Indonesia are also linked to the increase of shrimp and fish farming (Christophers 1933, Van der Brug 1997). The development of such farms induced, first, an increase in mosquito densities and, second, a greater proximity of mosquitoes to human hosts in important social and economic areas (Soeparmono and Lair 1954). Knowledge of fluctuations in densities of *An. sundaicus* is crucial for understanding malaria transmission in inhabited coastal areas. This taxon has been found in large numbers in certain areas of central Java (Indonesia) and Nicobar Island where the incidence of malaria is very low (Sundaraman et al. 1957, Kumari et al. 1993). Huehne (1971) found that although *An. sundaicus* occurred in high densities in coastal areas of Malaysia, it was not involved in malaria transmission.

Country	Year	Sporozoite rate (%)	Source
Bangladesh	1952	4.3	(Nasiruddin 1952)
Cambodia	1977	0.4	(Klein 1977)
India (Calcutta)	1936	3.6	(Sen 1938)
India	1948	2.7	(Nagpal and Kalra 1997)
Indonesia (Sulawesi)	1953	0.04	(Bonne-Webster and Swellengrebel 1953)
Indonesia (Sulawesi)	1973	0.07	(Collins et al. 1979)
Indonesia (Java)	1952-56	0.04-0.3	(Sundaraman et al. 1957)
Indonesia (Flores)	1991	4.2	(Marwoto and Arbani 1991)
Indonesia (Sumatra)	2002	1.2	(Fryauff et al. 2002)
Malaysia (Sabah Prov.)	1957	1.65	Malaria Report 1957 (Chow 1970)
Thailand	1966	0	(Gould et al. 1966)
Vietnam (Go Cong Prov.)	1961	2.9	(Phan 1998)
Vietnam (Go Cong Prov.)	1971	4.4	(Phan 1998)
Vietnam (Ho Chi Minh Prov.)	1968	1.03	(Nguyen Tang Am et al. 1993)
Vietnam (Mekong delta)	1968	0.18	(Hien 1968)
Vietnam (Tra Vinh Prov.)	1975	2.7	(Giang et al. 1980)
Vietnam (Bac Lieu Prov.)	1998	0	(Coosemans et al. 1998)

**Table I-4 : sporozoite rates observed in different populations of *An. sundaicus*.**

Recently, Coosemans *et al* (1998) indicated a null sporozoite rate in Bac Lieu Province of southern Vietnam where humans receive an average of 12.78 bites from *An. sundaicus* per hour. Coosemans *et al* (1992) explained that a drastic increase of density can induce a reduction in transmission as a result of decreased mosquito longevity whereby sporogonic development of malaria plasmodia cannot be completed. This situation could occur anywhere where *An. sundaicus* occurs in very high densities. On the contrary, Poolsuwan (1995) explained that a low sporozoite rate is compensated for by high density in areas of transmission. However, no studies have examined mosquito densities in relation to decrease in sporozoite rate. Additionally, few recent data are available for sporozoite rates in *An. sundaicus*, and published observations show considerable disparity in different localities and countries (Table I-4). Apart from the transmission of human malarial parasites, *An. sundaicus* has been found to transmit monkey malaria in the Andaman Islands (Kalra 1980). Although previously defined as anthropophilic, endophilic and endophilic, Kalra (1980) found that *An. sundaicus* was more zoophilic, exophilic and exophilic. Sporozoite detection revealed that *An. sundaicus* was

transmitting *P. cynomolgi*, which is closely related to *P. vivax*, to both monkeys and humans. This is interesting in view of laboratory studies which have shown that *An. sundaicus* is not able to transmit *P. gonderi* (Collins and Contacos 1980) or other parasites on Nicobar Island (Das et al. 1989). The role of *An. sundaicus* in malaria transmission has been defined as heterogeneous. As such, it poses a threat for malaria epidemics and endemism in areas of economic development, notably shrimp farming and tourism. Consequently, it is important to monitor populations to better define the actual or potential role of *An. sundaicus* in malaria transmission. The ecological and behavioral plasticity of this taxon poses difficulties for the development of appropriate vector control strategies.

## CONTROL STRATEGIES

Eradication of *An. sundaicus* was included in the anti-malarial programs undertaken in many Southeast Asian countries in the 1950s. The strategy was based on the application of DDT inside houses (Brandling-Bennett et al. 1981, Meek 1995, Phan 1998). The unforeseen consequence was the rapid resistance of mosquitoes to DDT (Table I-5). However, *An. sundaicus* remained susceptible in a few malaria foci of India (Das et al. 1989, Nagpal and Kalra 1997). Other insecticides were used in areas where DDT resistance occurred but few records report whether or not *An. sundaicus* has developed resistance. To circumvent or decrease the extent of resistance and avoid wasteful indoor spraying where *An. sundaicus* is exophilic or exophagic, control efforts focused on environmental alteration of breeding sites, particularly in Indonesia. The elimination of brackish water habitats by drainage was effective in decreasing vector densities (Soeparmo and Lair 1954). The main idea of such drainage is to confine the tidal influence to well-kept channels where the movement of water will prevent the breeding of *An. sundaicus* (Sandosham and Thomas 1983). Bunds and sluice gates built at the outlet of the main drains are commonly used methods to prevent the invasion of seawater (Sandosham and Thomas 1983), but such constructions are expensive. Fortunately, control measures against *An. sundaicus* coincide with the complete exclusion of salt water in agriculture (Sandosham and Thomas 1983). Efforts to eliminate vegetation and algae from ponds, and plant mangrove in lagoons, were also undertaken. However, these practices required ongoing attention and follow-up (Iyenger 1945, Kirnowardoyo 1988). Takagi (1995) attempted to suppress larval development in western Java by shading fishponds with the leaves of *Nipa* palm, or by adding larvivorous fish to these habitats. This strategy was cheap, easy to develop and efficient, but it required the monthly renewal of *Nipa* palm leaves and was not suitable for fisheries and large ponds. Larvivorous fish were used successfully in combination with *Bacillus thuringiensis israelensis* and chemical larvicides in northern Sumatra (Ikemoto et al. 1986), and Schaefer and Kirnowardoyo (1983) introduced *B. thuringiensis* H-14 in western Java for the successful control of *An. sundaicus*. Unfortunately, subsequent application was inefficient (Kirnowardoyo 1988). Similar trials were undertaken with *B. sphaericus* 2362 in Thailand (Chowanadisai et al. 1989). All of these strategies were considered successful in controlling *An. sundaicus* (Ikemoto et al. 1986, Imai et al. 1987, Meek 1995), but they were impractical for large-scale application at national levels.

Date	Country	Resistance status	References
1954	Indonesia	DDT resistant	(Crandell 1954)
1956	Indonesia (Java)	DDT resistant	(Chow 1970)
1962	Malaysia (Sabah)	Dieldrin resistant, DDT susceptible	(Chow 1970)
1973	Indonesia (Sulawesi)	DDT susceptible	(Collins et al. 1979)
1976	Indonesia	DDT and dieldrin resistant	(WHO 1976)
1978	India	DDT resistant	(Kalra 1978)
1979	Singapore	Susceptible to 3 organochlorines, 5 organophosphates and 1 pyrethroid	(Ong Keng Ho et al. 1981)
1989	India (Kamorta Island)	DDT susceptible, temephos susceptible	(Das et al. 1989)
1985	Vietnam	DDT resistant, others susceptible	(Nguyen Tang Am et al. 1993)
1985	Indonesia (Java)	DDT susceptible	(Kirnowardoyo 1985)
1987	Indonesia (central Java)	DDT resistant	(Kirnowardoya and Yoga 1987)
1994	Vietnam	DDT resistant, others susceptible	(Gornostaeva et al. 1994)
1997	India	DDT susceptible	(Nagpal and Kalra 1997)
2000	Indonesia	DDT resistant	(Webster 2000a)

**Table I-5 : chronological listing of insecticide resistance noted in different populations of *An. sundaicus*.**

## CONCLUSIONS

Due to its plasticity and capacity to transmit malaria, members of the *An. sundaicus* complex represent a threat to coastal and island populations of humans in Southeast Asia. The capacity of *An. sundaicus* to develop in seawater, various concentrations of brackish water, and freshwater is not linked to a particular species but to an ability of the species to adapt to available sites. However, its presence is restricted along the coast, supporting the hypothesis of larval tolerance to freshwater rather than a wide degree of adaptability. The capacity to develop in a range of habitats from freshwater to seawater is not unusual in anopheline mosquitoes being known for other species, such as *An. pseudopunctipennis* (Manguin et al. 1996). Moreover, the lack of recent data on the bionomics, insecticide resistance and vector capacity, as well as the general lack of surveillance and monitoring of potential vector populations, make the development of targeted control measures problematic. The results of recent molecular and phylogenetic analyses of the *An. sundaicus* complex (Dusfour et al. 2004b) will foster further study of these mosquitoes. The next step should be the elucidation, characterization and identification of all members of the complex which includes four identified species: *An. sundaicus* s.s. and species A confirmed by molecular markers (Dusfour et al. 2004b) and species B and C (Sukowati et al. 1996, 1999). Such work is needed to determine the distributions, disease relations, environmental characteristics and insecticide resistance of the individual species. This knowledge is essential for epidemiological studies, the design and implementation of appropriate vector control measures, and the development of strategies for monitoring the spatio-temporal fluctuations of *An. sundaicus* needed to assess the potential risk of malaria outbreaks.

## **PROBLEMATIQUE & PRESENTATION DES TRAVAUX**

*Anopheles sundaicus* est l'un des trois vecteurs majeurs du paludisme en Asie du sud-est. Il est suspecté depuis longtemps d'être un complexe d'espèces sur la base de l'observation de variations écologiques et comportementales. Cette hypothèse a ensuite été confortée par des analyses de cytogénétique et confirmée par des études isoenzymatiques (Sukowati et al. 1996, 1999). Au début de ma thèse, la caractérisation du néotype d'*An. sundaicus* s.s. par descriptions morphologique et moléculaire (marqueurs COI et ITS2) avait été le seul travail publié basée (Linton et al. 2001a). Une étude réalisée sur des populations thaïlandaises, Vietnamiennes et Malaises (provenant de Bornéo) par analyse de RAPDs avait alors montré une différenciation des populations continentales et celles de Bornéo (Cohuet & Manguin, données non publiées)<sup>1</sup>.

Par le passé, *An. sundaicus* était considéré, sur toute sa distribution, comme un vecteur majeur. Il reste dans les mémoires comme un vecteur efficace du paludisme au cours d'épidémies et d'endémies (voir Article 1 « *An. sundaicus* : a malaria vector »). Aujourd'hui, selon les quelques données publiées (Kirnowardoyo 1985, Meek 1995, Rahman et al. 1997) et les commentaires personnels de partenaires sur le terrain, *An. sundaicus* s.l. peut être considéré, comme un vecteur majeur en Indonésie, bien que son implication dans la transmission soit hétérogène (M. Bangs, comm. pers.) et en Malaisie (R.E. Harbach, comm. pers.). Il est décrit comme vecteur secondaire en Thaïlande et au Cambodge (Meek 1995) et peu de cas lui sont actuellement imputés au Vietnam (Phan 1998). Toutefois, *An. sundaicus* reste une menace à surveiller pour les populations côtières et insulaires de l'Asie du sud-est. La lutte contre ce vecteur a été réalisée par l'utilisation d'insecticide, mais aussi des méthodes biologiques face à l'essor de la résistance. Cependant, le statut actuel des populations face aux insecticides, et particulièrement aux pyréthrinoides, la répartition de cette résistance en Asie du sud-est, ainsi que le type de mécanismes impliqués, sont peu voire pas connus. Face à ce manque de données, approfondir les connaissances sur *An. sundaicus* est essentiel pour mieux contrôler ce vecteur du paludisme dans les régions où il est présent, et prévoir son apparition dans les zones où il est actuellement absent. La confirmation de la présence d'un complexe d'espèces et le développement d'outils d'identification sont primordiaux pour les investigations de l'implication des espèces jumelles dans la transmission palustre. Ensuite, la mise en place d'outils de surveillance et d'aide à la décision pour cette lutte antivectorielle devient nécessaire.

**TAXONOMIE ET PHYLOGEOGRAPHIE.** La taxonomie du Complexe d'espèces d'*An. sundaicus* s'est faite sur la base de marqueurs cytogénétique, isoenzymatiques et moléculaires avec des gènes nucléaire et mitochondriaux (Linton et al. 2001a, Sukowati et al. 1996, 1999). Mon travail a été la continuité de cette étude à l'aide de marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire ribosomal (ITS2) et de l'ADN mitochondrial (Cytochrome b et Cytochrome Oxidase I), et d'un plus grand nombre de populations. A partir du postulat de la présence d'un complexe, une meilleure compréhension de la distribution

---

<sup>1</sup> Les résultats ont depuis été en partie publiés dans Dusfour et al (2004b) en tant que méthode d'identification

actuelle des espèces et des mécanismes potentiels de spéciation dans la région sud-est asiatique était nécessaire. Ces aspects ont été abordés par une approche phylogéographique.

**METHODES D'IDENTIFICATION.** La discrimination d'espèces chez les vecteurs d'agents pathogènes n'est pas seulement un exercice de taxonomie, mais elle est essentielle dans la lutte antivectorielle. Une étude comparative de la morphologie des espèces discriminées a été effectuée afin de mettre en évidence des caractères différentiels ou discriminants pour les trois stades du moustique : larve de quatrième stade, pupa et adulte. Pour optimiser et faciliter la reconnaissance de ces espèces, une méthode moléculaire rapide d'identification, a été développée. Une PCR allèle-spécifique de chaque espèce combinant dans une seule réaction d'amplification (PCR multiplexe), les amorces spécifiques de chaque espèce a permis l'identification des espèces du complexe.

**CHARACTERISATION D'*AN. SUNDAICUS* S.I. DANS LE SUD VIETNAM.** Dans le sud Vietnam, *An. sundaicus* est considéré comme vecteur du paludisme sur les zones côtières. Toutefois, même si le nombre de cas de paludisme a drastiquement baissé depuis le début des années 90, grâce au programme de prévention et de lutte, la vigilance à l'égard de ce vecteur reste intacte. Des collectes et des tests de résistance aux insecticides faits par les équipes vietnamiennes ont déterminé la diversité et la densité des anophèles dans 18 sites du sud Vietnam, ainsi que leur niveau de résistance aux insecticides couramment utilisés. Par la suite, des missions sur le terrain et l'utilisation de la télédétection ont permis de caractériser l'environnement lié à ces moustiques. L'intégration de toutes ces données dans un système d'information géographique a pour but de cartographier la distribution et les densités de vecteurs, ainsi que leur niveau de résistance aux pyréthrinoides, afin de mettre en place les bases d'un système de surveillance et de prédiction de la présence du vecteur dans le but d'améliorer les stratégies de lutte antivectorielle.

## **PARTIE II • TAXONOMIE ET PHYLOGEOGRAPHIE**

**L**a **taxonomie** est la science des lois de la classification. Faire une classification implique donc d'identifier un taxon, dans notre cas une espèce. De nombreux concepts ont été décrits afin de définir la notion d'espèce. Le concept biologique défini par Ernst Mayr (1963) (Encadré II-1) est la base de la définition moderne d'espèce mais elle est difficilement applicable car il est difficile d'obtenir la reproduction d'anophèles en captivité. C'est pourquoi l'observation des différences morphologiques reste l'outil de base de la discrimination des espèces (Linnaeus 1758). D'autres concepts basés sur les différences écologiques ont aussi été décrits, mais avec le développement des analyses de marqueurs génétiques et des techniques de biologie moléculaire, les concepts d'espèces basés sur des analyses génétiques ou reconstructions phylogénétiques sont venues supplanter ces concepts de base (Encadré II-1). Ces derniers sont d'autant plus utilisés à des niveaux inférieurs de la classification, tels que les complexes dont les espèces sont morphologiquement proches, voire indifférenciables.

Au-delà de la discrimination d'espèces, les hypothèses des mécanismes de colonisation et de spéciation permettent, dans un contexte plus général, de comprendre les dynamiques anciennes des populations. L'histoire géologique, géographique et climatique de la région dans laquelle résident les espèces d'aujourd'hui, a eu une influence sur les migrations, la séparation et la démographie de ces lignées. La **phylogéographie** est l'étude, à l'échelle d'une espèce ou d'espèces proches, des diversités biologiques, de leur origine, de leur évolution et de leur régulation dans des espaces hétérogènes et changeants (Blondel 1995). Elle s'applique à expliquer les distributions des espèces observées actuellement. Cette discipline allie phylogénie moléculaire, génétique, biologie, démographie, géologie, paléontologie, géographie afin de retracer leur histoire spatio-temporelle.

Dans le cadre de l'étude des vecteurs d'agents de pathogènes, la question de la détermination d'espèces, et plus particulièrement des espèces vectrices majeures, est une étape indispensable pour une meilleure reconnaissance des espèces impliquées dans la transmission d'une maladie et de leur contrôle. Les études menées jusqu'alors sur les anophèles se sont focalisées sur cette reconnaissance des espèces (Green et al. 1992, Foley et al. 1996, Van Bortel et al. 2000, Cooper et al. 2002). Dans les complexes, les espèces jumelles ont des comportements et des capacités vectorielles propres. Ainsi, sur la base de leur identification, leur propre implication dans la transmission des agents du paludisme a pu être mis à jour et des méthodes d'identification fiables des espèces vectrices ont pu être développées. Taxonomie et systématique ont été largement abordées pour le genre *Anopheles* (Freitas-Sibajev et al. 1995, Anthony et al. 1999, Beebe and Cooper 2000, Sharpe et al. 2000, Sallum et al. 2002). Ainsi, un grand nombre de complexes d'espèces ont pu être décrits. Les approches phylogéographique et biogéographique, quant à elles, ont été peu abordées chez les anophèles (Petrarca et al. 2000, Beebe et al. 2001, Krzywinski et al. 2001, Garros et al. 2004a), en particulier parce qu'elles sont rendues difficiles en l'absence d'espèces fossiles (Jarzembowski 1995). Une origine du nouveau monde de la sous-famille des Anophelinae a, toutefois, été avancée (Harbach and Kitching 1998, Krzywinski et al. 2001, 2003) et la radiation du sous-genre *Cellia*,

absent du nouveau monde, aurait eu lieu après la fin de l'Eocène, lorsque la connection entre Europe et Amérique avait disparu (Krzywinski et al. 2001). En Asie du sud-est, Garros et al. (2004a) ont avancé l'hypothèse d'une migration de l'ancêtre du Groupe Minimus d'Afrique vers l'Asie il y a 20 à 25 Millions d'années (Ma) lorsqu'une connection de forêt se faisait entre ces deux régions. La séparation entre les deux lignées (Groupes Funestus et Minimus) aurait eu lieu par désertification de la Laurasia en Asie de l'est et centrale, il y a environ 22 Ma. Peu de données phylogéographiques sont disponibles sur les anophèles dans cette région du sud-est asiatique, mais leur forte relation avec les vertébrés, due à la nécessité d'un repas de sang pour la reproduction, permet de soutenir des hypothèses sur la phylogéographie de ces insectes.

#### **Encadré II-1 : quelques définitions du concept d'espèces**

**Concept d'espèces biologiques (BSC).** Les espèces sont des groupes de populations se reproduisant ou pouvant se reproduire entre elles mais qui ne peuvent le faire avec d'autres (d'après Mayr, 1940).

**Concept d'espèces génétiques (GSC).** Concept qui se réfère aussi au processus biologique (reproduction, compétition) prenant part à l'évolution dans les espèces. L'absence du flux de gène est l'indicateur de la présence d'espèces (d'après Mayden 1997).

**Concept d'espèces typologiques.** Une espèce est un groupe d'organismes conforme à un plan morphologique commun (d'après Mayr 1969; d'après Lincoln et al. 1982).

**Concept d'espèces phénétiques.** Une espèce est un lot d'organismes qui se ressemblent entre eux mais les lots sont différents les uns des autres (d'après Ridley, 1993).

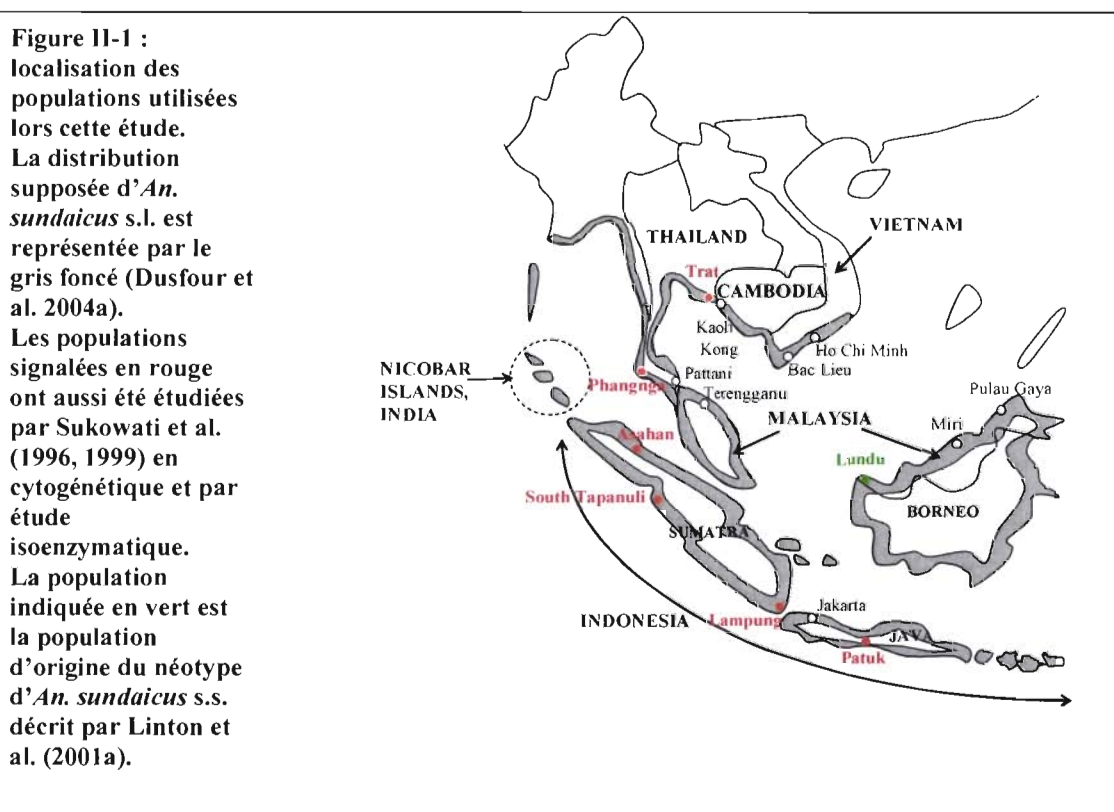
**Concept d'espèces écologiques.** Une espèce est un groupe d'organismes exploitants (ou adaptés) à une seule niche écologique (d'après Ridley 1993).

**Concept d'espèces en évolution.** Une espèce est une lignée (une séquence ancêtre/descendant dans une population) évoluant séparément des autres et avec des tendances et rôles évolutifs propres (d'après Simpson, 1961).

**Concept d'espèces phylogénétiques (PSC).** une espèce est un groupe monophylétique composé du "plus petit groupe diagnosticable d'organismes dans lequel il y a un profil parental d'ancêtre et descendant" (d'après Cracraft 1983).

**TAXONOMIE : MISE EN EVIDENCE DES ESPECES**

L'étude sur *An. sundaicus* s.l. a été menée par l'analyse de marqueurs moléculaires. Afin de confirmer la présence d'un complexe d'espèces, différents types de méthodes basées ou non sur la reconstruction d'arbres ont été utilisées. Les méthodes non basées sur la reconstruction s'attachent à regarder la présence ou non de flux de gènes par des inférences indirectes (GSC) (Encadré II-1). La reconstruction d'arbres permet de délimiter les espèces par les propriétés liées aux topologies des arbres phylogénétiques (monophylie) (PSC) (Encadré II-1). Les résultats obtenus ont pu être comparés à des études menées sur d'autres caractères écologique ou génétique (cytogénétique, isoenzymatique), grâce à l'analyse de populations identiques à ces précédents travaux (Figure II-1).



**FLUX DE GENE ET DISTANCES GENETIQUES.** L'absence de flux de gène entre des populations est caractérisée par un déficit en hétérozygote entre celles-ci. L'estimateur est le coefficient de différenciation. Il mesure la réduction d'hétérozygotie entre populations. Cet estimateur a été développé, à l'origine, pour un calcul basée sur des fréquences alléliques mais une adaptation aux séquences existe ( $\Phi_{st}$ ) (Schneider et al. 2000). S'il y a un déficit en hétérozygote au sein d'une population, deux ou plusieurs sous-populations génétiquement distinctes composent cette population. Deux mécanismes peuvent être responsables de ce déficit, soit il n'y a pas de reproduction par isolement pré-zygotique, soit les hybrides produits par la reproduction des deux entités sont non viables ou stériles, c'est un isolement post-zygotique. D'autre part, la distance génétique est aussi utilisée en tant qu'indicateur (Ferguson 2002, Mayden 2002, Sites and Marshall 2003). En effet, plus les distances génétiques sont grandes et plus les entités sont éloignées génétiquement menant directement à l'isolement des entités et empêchant la production d'une descendance viable. Il faut cependant déterminer le seuil à partir duquel on peut parler d'espèces génétiques. En général, une comparaison à des données sur des espèces dans des unités taxonomiques proches et sur des marqueurs génétiques similaires, est faite.

#### **Encadré II-2 : méthodes de phylogénie**

**Méthode phénétique:** l'approche phénétique se fonde sur l'analyse, sous forme quantitative, du plus grand nombre de caractères chez les espèces étudiées, homologie et homoplasie mêlées. Son principe repose donc sur l'estimation d'une distance entre chaque paire d'unités évolutive.

**Méthode cladistique:** l'analyse cladistique émet des hypothèses sur le sens de transformation des caractères et en déduit des relations phylogénétiques entre les unités évolutives. Elle repose sur le principe qu'un caractère dérivé observé chez plusieurs taxons est hérité d'un ancêtre.

**PHYLOGENIE.** La phylogénie permet de retracer les relations généalogiques entre des caractères discontinus et discrets qui peuvent être des gènes ou des caractères morphologiques et donc indirectement entre les espèces qui les portent. Pour construire une phylogénie, il faut des caractères comparables entre tous les «objets» (c'est-à-dire gènes ou espèces). On dit que ces caractères sont homologues c'est-à-dire qu'on formule l'hypothèse selon laquelle la similitude observée est due au fait que les caractères sont issus d'un ancêtre commun et qu'ils se sont progressivement modifiés au cours des générations (Lopez et al. 2002).

La recherche du meilleur arbre phylogénétique parmi le nombre existant est impossible car le nombre augmente de manière exponentielle avec le nombre d'espèces analysées. Il faut donc accepter que le programme nous donne un arbre, non pas le meilleur, mais celui s'en approchant, de tels programmes sont dits « heuristiques ». Ce compromis entre temps de recherche et efficacité fait qu'on obtient rarement le meilleur arbre même si l'on est toujours sûr d'avoir un très bon arbre. Toutes les méthodes de reconstructions sont basées sur un caractère quantitatif et recherchent l'arbre qui maximise (ou minimise) ce critère (« optimality criterion »).

La **méthode de distances**, méthode dite phénétique, est constituée d'une phase de calcul de distances évolutives (c'est-à-dire des substitutions) entre deux séquences, en général à l'aide de

méthodes statistiques utilisant un modèle d'évolution de séquences. Différents algorithmes comme le neighbor-joining permettent de construire des arbres à partir de cette matrice.

Lors de l'analyse en **maximum de parcimonie**, méthode cladistique, on choisit l'arbre qui minimise le nombre de changements de nucléotides ou d'acides aminés au cours de l'évolution.

La méthode du **maximum de vraisemblance** (cladistique) estime la probabilité d'observer les données sous une hypothèse donnée (ici l'arbre phylogénétique), ce que l'on appelle vraisemblance. On choisit comme arbre celui qui maximise le critère de vraisemblance. Pour calculer la vraisemblance, le modèle d'évolution des données a besoin d'être connu, les paramètres du modèle peuvent cependant être estimés à partir des données. Le facteur limitant de cette méthode est le temps de calcul.

La méthode de distances et les analyses en maximum de parcimonie sont très rapides mais se sont révélées moins performantes que le maximum de vraisemblance.

Afin d'estimer la **robustesse des arbres** reconstruits, l'une des méthodes probalistiques les plus utilisées est le bootstrapping. Le principe est le rééchantillonnage avec remplacement de la matrice des données pour produire des sets de pseudo-réplicats. L'algorithme de reconstruction des arbres est appliqué à chacun des réplicats. Un arbre moyen est construit selon le principe de consensus majoritaire, ce qui consiste à faire apparaître tous les clades qui reviennent le plus souvent avec leur pourcentage d'apparition en tant que valeurs de robustesse. Cette méthode peut être utilisée pour les méthodes phénétique et cladistique. La valeur au-dessus de laquelle un clade est considéré comme robuste est 70% (Holder and Lewis 2003).

Plus récemment, les statistiques bayésiennes ont été mises au service de la phylogénie. L'**inférence bayésienne** est une méthode probalistique basée sur une quantité appelée probabilité « a posteriori » donnée par une matrice de caractères. Cette probabilité, dans notre cas, représente la probabilité qu'un arbre soit correct (Huelsenbeck et al. 2001). La probabilité « a posteriori » est calculée en combinant une probabilité « a priori » d'une phylogénie et la vraisemblance produite par les données pour construire l'arbre. Les inférences sur l'histoire du groupe sont alors basées sur les probabilités « a posteriori » des arbres reconstruits. L'approche bayésienne combine un modèle probalistique d'évolution des caractères et la rapidité de l'approximation par la Chaîne de Markov Monte Carlo (MCMC). Les arbres obtenus sont conservés selon leur probabilité. L'arbre consensus produit des probabilités bayésiennes « a posteriori » pour chaque clade. Elles peuvent être considérées comme globalement équivalentes à des pourcentages de bootstrap calculés sur le maximum de vraisemblance (Huelsenbeck et al. 2001, Douady et al. 2003).

Toutes ces méthodes de reconstruction nous permettent de mettre en évidence des clades monophylétiques avec leur robustesse, identifiant ainsi les espèces selon le concept d'espèces phylogénétiques et les relations qu'elles ont entre elles. Les lignées ainsi identifiées seront la base des investigations de phylogéographie.

### Encadré II-3 : clades et lignées

**Clade** : groupe monophylétique d'organismes

**Lignée** : séquence chronologique de populations avec des relations ancêtre-descendant.

---

## PHYLOGEOGRAPHIE

La géographie et la démographie des populations ont joué un rôle clé dans la plupart des scénari de spéciation. En complément de la reconstruction phylogénique, indicateur de la spéciation, la mesure des variations démographiques et une connaissance de la paleogéographie de la région étudiée permet de reconstruire l'histoire évolutive des espèces.

**MESURE DES VARIATIONS DEMOGRAPHIQUES.** La sélection naturelle subie par les populations a un effet direct sur leur taille. L'évolution de cette taille (constance, croissance ou déclin, taux qui leur sont liés, taux de migration) peut être notamment estimée par l'analyse des haplotypes de l'ADN mitochondrial. Les estimations sont donc généralement faites sur des lignées matriarcales (Avisé 2000). C'est l'analyse des distances génétiques des haplotypes calculées deux à deux et de leur diversité (nucléotidique et haplotypique) qui permet d'évaluer l'histoire passée des populations. En effet, la comparaison des résultats obtenus aux modèles de croissance, déclin ou encore taille constante des populations (Rogers and Harpending 1992, Avisé 2000) permet de déduire leur évolution démographique.

**HISTOIRE DE LA REGION.** La région d'Asie du sud-est, tout comme sa voisine la région ouest-pacifique, a depuis longtemps suscité l'intérêt des biogéographes. Positionnée à la limite de deux plaques (eurasienne et océanique Indo-Australienne), elle subit l'influence de la tectonique et du volcanisme. La présence d'un biotope sur l'archipel malais composé d'espèces asiatiques et australasiennes a permis de postuler l'hypothèse d'une dispersion, puis d'une fragmentation des populations animales et végétales dues, certainement, à des fluctuations du niveau de la mer. Le quaternaire a eu un rôle majeur sur ces phénomènes avec l'accélération de l'alternance des cycles glaciaires et pour conséquence l'isolement d'îles ou l'émergence de la plaque continentale. L'alternance des périodes glaciaires et interglaciaires a non seulement permis la dispersion des espèces par l'émersion de la plaque continentale nommée « sundaland » ? mais aussi leur isolement par la création d'îles (Ruedi 1996, Karns et al. 2000, Tougard 2001). Cette période a été accentuée par l'aridification du climat et la création de refuges tropicaux lors des périodes glaciaires pouvant ainsi renforcer l'isolement de certaines espèces inféodées à ce type d'environnement (Gathorne-Hardy et al. 2002, Meijard 2003, Gorog et al. 2004).

---

## CHOIX DES MARQUEURS

**LES MARQUEURS.** Face aux connaissances déjà acquises par l'étude des marqueurs moléculaires d'*An. sudaicus* d'une part, et sur la discrimination des complexes d'espèces chez les Diptères d'autres part, un criblage de marqueurs moléculaires a été réalisé (Table II-1).

Au début de mon étude sur *An. sudaicus s.l.*, seul le travail de Linton et al. (2001a) sur la caractérisation morphologique et moléculaire d'*An. sudaicus s.s.* faisait référence à deux marqueurs moléculaires séquencés pour ce taxon. Les marqueurs Cytochrome Oxidase I (COI de l'ADN mitochondrial) et l'espaceur interne transcrit 2 (Internal Transcribed Spacer 2, ITS2) de l'ADN ribosomal étaient les deux marqueurs de base. De plus, ils ont été largement utilisés pour discriminer les espèces de complexe chez les diptères et plus particulièrement chez les anophèles (Spicer 1995, Arrivillaga and Feliciangeli 2001, Linton et al. 2001b, de Brito et al. 2002, Linton et al. 2002a, 2003, Garros et al. 2004a).

Les **marqueurs mitochondriaux** sont plus polymorphes que des gènes nucléaires. L'héritabilité du génome mitochondrial est maternelle et la recombinaison absente (Simon et al. 1994, Hwang and Kim 1999). Les mitochondries sont en grand nombre dans le génome, l'amplification des gènes est ainsi facilitée. Les gènes mitochondriaux sont donc des marqueurs de choix dans les phylogénies et sont utilisés en phylogéographie. Cependant, tous les gènes ne sont pas utilisés de la même manière pour chaque modèle animal. Le COI ou le COII sont des marqueurs de référence utilisés à tous les niveaux de la taxonomie des insectes (Beckenbach et al. 1993, Navajas et al. 1998, Caterino and Sperling 1999, Sharpe et al. 2000, Trewick 2000, Walton et al. 2000, Cryan et al. 2001, Salomone et al. 2002). Inversement, le Cytochrome b (Cyt-b) largement utilisé chez les vertébrés, est moins connu chez les insectes (Crozier et al. 1995, Besansky et al. 1997, Lyman et al. 1999, Mukabayire et al. 1999, Lachaise et al. 2000, Morrow et al. 2000, Krzywinski et al. 2001, Lin and Wood 2002). Pourtant, il a été démontré que le Cyt-b est aussi polymorphe que le COI pour les reconstructions phylogénétiques chez les insectes (Simmons and Weller 2001). Il a été testé chez *An. sudaicus s.l.* en complément du COI.

Les **marqueurs nucléaires** les plus polymorphes et les plus facilement utilisables sont la région intergénique (IGS) et les ITS de l'ADN ribosomal (rDNA). L'ADN ribosomal est une séquence de plusieurs gènes et régions intergéniques répétées en tandem dans le génome. Cette famille multigénique, héritée biparentalement, est soumise à l'évolution concertée et à la recombinaison (Buckler et al. 1997, Hwang and Kim 1999). Chez les anophèles, l'ADN ribosomal est situé sur le chromosome sexuel X (Kumar and Rai 1990). L'ITS2 a été largement utilisé pour la discrimination des complexes d'espèces (Favia et al. 1997, Sharpe et al. 2000, Mukabayire et al. 2001, Sedaghat et al. 2003, Garros et al. 2004b, Sierra et al. 2004).

D'**autres marqueurs nucléaires** ont été amplifiés et séquencés pour *An. sudaicus s.l.* à partir d'amorces utilisées dans le Complexe Gambiae ou dessinées à partir de l'alignement des séquences d'insectes (Table II-1)). Le Complexe Gambiae est classé comme *An. sudaicus* dans la série *Pyrethophorus*. De plus, il est le plus étudié des anophèles et reste donc la plus grande source de

documentation. Parmi ces marqueurs, dix-sept couples d'amorces amplifiant pour des microsatellites du complexe Gambiae ont été transférés sur les individus du Complexe Sundaicus. Ces loci microsatellites ont été choisis parmi les plus polymorphes au sein du complexe Gambiae. Ils possèdent des motifs dinucléotidiques réguliers susceptibles d'être les plus polymorphes lors du transfert.

**LES RESULTATS** sont présentés dans la table 5. Les fragments cités ci-dessous ont été amplifiés, puis clonés pour deux individus des populations de Miri (Sarawak, Malaisie) et Bac Lieu (Vietnam).

Origine		Source	Amplification & clonage Résultats
Nucléaire	ATP binding cassette	(Mukabayire et al. 2001)	Aisée 4 nucléotides (ntd) / 520 ntd
Nucléaire	Tryptophane oxygenase	(Mukabayire et al. 2001)	Profil multibande
Nucléaire	EF 1 alpha	Alignement séquence	Difficile 5 ntd / 620 ntd
Mitochondrial	Cyt b	(Beard et al. 1993, Simon et al. 1994)	Aisée 11 ntd / 485 ntd
Mitochondrial	COI	(Simon et al. 1994)	Aisée 7 ntd / 445 ntd
Nucléaire (rDNA)	ITS2	(Beebe and Saul 1995)	Aisée 3 ntd / 580 ntd
Nucléaire (rDNA)	IGS	(Favia and Louis 1999)	Difficile 11 ntd / 580 ntd
Tout le génome	17 microsatellites	(Zheng et al. 1996)	Profils multibandes

**Table II-1 : résultats des tests de marqueurs moléculaires.**

Comme attendu, les marqueurs mitochondriaux se sont montrés les plus polymorphes (Table II-1) et les plus faciles à amplifier. Les deux marqueurs COI et Cyt-b s'alignent parfaitement avec la séquence connue d'*An. gambiae* (Beard et al. 1993) et de COI pour *An. sudaicus* s.s. (Linton et al. 2001a).

L'ITS2 a été séquencé directement après amplification. L'IGS a été cloné puis séquencé. L'ITS2 est moins polymorphe que les marqueurs mitochondriaux et l'IGS a une variabilité équivalente révélant un polymorphisme de 3 nucléotides variables sur 580 et 11 sur 580 respectivement (Table II-1). De plus, lors du séquençage direct, la mise en évidence de bases systématiquement non résolues, et par la suite des profils de restriction hybrides nous ont amenés à l'hypothèse d'une variabilité intragénomique de l'ITS2. Cette hypothèse a été confirmée par un clonage et séquençage de l'ITS2. Seulement deux clones de l'IGS ont été séquencés après clonage, cette variabilité intragénomique n'a pu être mise en évidence. Afin de prendre en compte la variabilité intragénomique, clonage et séquençage sont des étapes obligatoires de l'analyse des marqueurs ribosomiaux chez *An. sudaicus* s.l.

Les autres marqueurs nucléaires n'ont pas donné de résultats concluants soit par la difficulté de l'amplification et/ou par le manque de polymorphisme quand le séquençage a eu lieu.

Le transfert de microsatellites a échoué car aucun motif susceptible d'être utilisé n'a été obtenu.

**LA SÉLECTION** s'est effectuée sur le critère du polymorphisme et de l'intérêt de l'information apportée par ces marqueurs dans la discrimination des espèces, mais aussi dans la facilité de l'amplification et/ou du clonage de ces marqueurs.

Les marqueurs mitochondriaux COI et Cyt-b ont donc été sélectionnés. L'ITS2 a été choisi malgré le faible polymorphisme et ce pour deux raisons : (1) son utilisation préalable dans la caractérisation d'*An. sudaicus* s.s. (Linton et al. 2001a) (2) l'approche de l'étude des variations intragénomiques pouvant amener des informations intéressantes par l'étude des copies intragénomiques.

#### **En résumé**

##### **Marqueurs :**

1. Mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) et Cytochrome b (Cyt-b) en combinaison
2. ADNr : Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

##### **Analyses:**

1. Flux de gène:  $F_{st}$  (coefficient de différenciation) et distances génétiques (modèle Tamura-Nei)
2. Reconstruction phylogénétique : Neighbor-Joining (NJ) (Tamura-Nei 93), Maximum de Parcimonie (MP), Maximum de vraisemblance (ML) et analyse Bayésienne. Robustesse: Bootstrapping
3. Phylogéographie
  - (i) Calcul des diversités haplotypique et nucléotidique des clades mis en évidence par les reconstructions et comparaison au modèle décrit par Avise (2001)
  - (ii) Mismatch distribution et comparaison au modèle de Roger et Harpending (1992)
  - (iii) Répartition des copies d'ITS2

---

**ARTICLE 2 - MISE EN EVIDENCE DE LA SPECIATION ENTRE DES POPULATIONS INSULAIRES (SARAWAK, MALAISIE) ET CONTINENTALES (THAILANDE & VIETNAM)**

**Dusfour I. et al. 2004.** Molecular evidence of speciation between island and continental populations of *Anopheles (Cellia) sundaicus* Rodenwaldt (Diptera: Culicidae), a principal malaria vector taxon in Southeast Asia. **J. Med. Entomol.** 41(3) 287-295.

The principal malaria vectors in Southeast Asia belong to three species complexes: the *An. dirus* Peyton & Harrison, the *An. minimus* Theobald and the *An. sundaicus* Rodenwaldt complexes. The systematics of the first two taxa is well studied. The Dirus Complex consists of at least seven species (*An. dirus* [=species A], species B-E, *An. nemophilous* Peyton, and *An. takasagoensis* Morishita) (Peyton 1989) and the Minimus Complex includes at least two species (A and C) (Green et al. 1990). In contrast to these, the systematics of the Sundaicus Complex needs to be investigated. *Anopheles sundaicus s.l.* is a principal malaria vector taxon on islands and along coastal areas of Southeast Asia (Kalra 1978, Brandling-Bennett et al. 1981, Kirnowardoya and Yoga 1987, Nguyen Tang Am et al. 1993). Its distribution reportedly includes coastal areas from northeastern India to southern Vietnam, including Myanmar, Thailand, Cambodia, and Peninsular Malaysia, and the islands of Nicobar, Andaman, Borneo, and Indonesia (Reid 1968, Sukowati et al. 1996, Linton et al. 2001a). The wide geographic distribution, especially on numerous islands, and the high level of species variability led to speculation that *An. sundaicus* represents a complex of sibling species. Larvae have been collected in brackish water at many locations (Chow 1970, Brandling-Bennett et al. 1981, Kumari et al. 1993, Nguyen Tang Am et al. 1993, Kumari and Sharma 1994, Das et al. 1997, Chang Moh Seng et al. 2001) and in freshwater near Miri in Sarawak, Malaysia on Borneo (Linton et al. 2001a), South Tapanuli on Sumatra (Indonesia) (Sukowati et al. 1996) and Car Nicobar Island (Das et al. 1997). Chow (1970) found that *An. sundaicus* was mainly anthropophilic, endophilic, and exophagic on the Indonesian island of Java. In Vietnam, *An. sundaicus* was also found to be mainly anthropophilic and exophagic, but also endophagic (Nguyen Tang Am et al. 1993). Kumari (1993, 1994) reported that *An. sundaicus* on Car Nicobar Island is zoophilic, exophagic, and exophilic. Cytogenetic studies carried out on populations from Thailand, Java, and Sumatra resulted in the discovery of three chromosomal forms (A, B, C) (Sukowati et al. 1996). Form A was shown to occur in Sumatra and Thailand, form B was found only in northern Sumatra and central Java, and form C was restricted to Asahan in northern Sumatra. Asahan was the only site where all three cytotypes were found in sympatry (Sukowati et al. 1996). Isozyme analysis (Sukowati et al. 1999) provided further evidence that these three forms are separate genetic entities. A fourth cytotype may have been identified from the Nicobar Islands, but evidence to support this remains unpublished (Subbarao et al. 1999).

Little is known about the vector capacity of the three forms. Since the design of effective, targeted vector and malaria control measures is dependent on correct species identification, it is essential to characterize all taxa within the Sundaicus Complex. To fix the identity of *An. sundaicus* as a foundation for further investigations of the Sundaicus Complex, a neotype was designated (Linton et al. 2001a) from material collected at Pandan Beach, Lundu District, Sarawak, Malaysia on Borneo. Further integrated systematics studies are required to determine the composition of the Sundaicus Complex across its range.

The aims of the present study were to conduct a molecular assessment of *An. sundaicus* populations from Thailand, Vietnam, and Malaysian Borneo, and if more than one species was found, to develop a rapid identification method to distinguish the species on a wide scale. Partial regions of two mitochondrial (mtDNA) genes, cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome b (Cyt-b), were sequenced, and the data used to assess genetic relationships. These mitochondrial regions have the advantage of being maternally inherited, rapidly evolving, and present in multiple copies per cell, hence they are easy to amplify by PCR. The COI gene is a very useful marker for assessing relationships among closely related insects, with resolution ranging from orders to species (de Brito et al. 2002). The utility of using the COI gene for elucidating relationships of Diptera at the species-complex level is well documented, e.g. the Buzzatii Complex of *Drosophila* (Spicer 1995), the Longipalpis Complex of *Lutzomyia* (Arrivillaga and Feliciangeli 2001), the Imicola Complex of *Culicoides* (Linton et al. 2002a), and the Maculipennis Complex of *Anopheles* (Linton et al. 2001a, 2001b). Although the Cyt-b gene is widely used in vertebrate systematics, its utility has not been well documented for insects (Simmons and Weller 2001). This gene has been sequenced for few *Anopheles* species, e.g. *An. funestus* and *An. gambiae s.l.* (Besansky et al. 1997, Mukabayire et al. 1999, Krzywinski et al. 2001). Little is known of its utility for distinguishing members of dipteran species complexes (Lachaise et al. 2000), however this region was informative in studies of sibling species in Coleoptera, Hemiptera, Homoptera, and Hymenoptera (Crozier et al. 1995, Lyman et al. 1999, Morrow et al. 2000, Lin and Wood 2002). The use of Cyt-b jointly with the better known COI (Linton et al. 2001a) in the characterization of *Anopheles* complexes, in particular in the Sundaicus Complex, is novel.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Mosquito populations.** Specimens used in this study were identified as *An. sundaicus s.l.* using the morphological keys of Reid (1968), and the keys for the *Anopheles* of Vietnam prepared by IMPE (1987). Specimens were collected from six localities, two in southern Vietnam, two in Thailand, and two in Malaysian Borneo (Figure II-2, Table II-2). Samples from Lundu Province in Sarawak were collected in association with the neotype series of *An. sundaicus* (Linton et al. 2001a). Sequences of *An. minimus* species A from Hoa Binh Province, Vietnam, and those of *An. gambiae s.s.* (Beard et al. 1993) obtained from GenBank were used to assess genetic relationships between populations of *An. sundaicus s.l.* (see below).

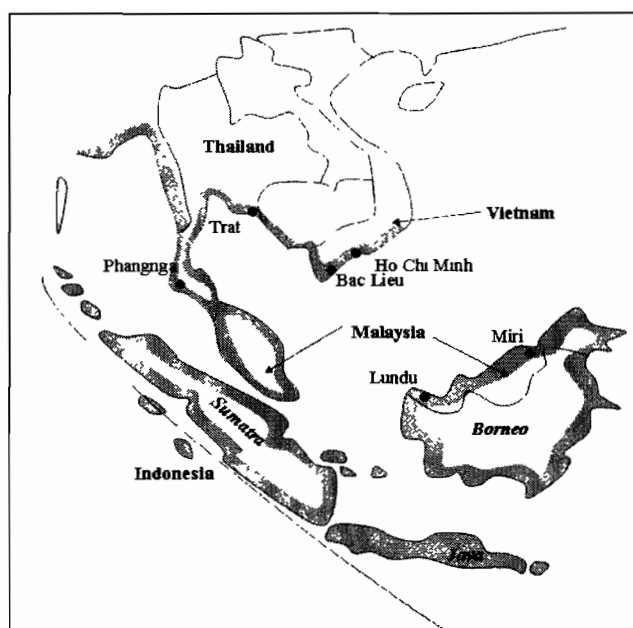


Figure II-2: reported distribution of *An. sudaicus* s.l. in the studied area (shaded area) and the localities of the six populations studied (black dots).

Countries	Localities	Population codes	N	Conservation states	Collection dates	Larval habitats	N° of specimens analyzed	
							COI	Cyt-b
Vietnam	Bac Lieu	VBL	7	Frozen adults	03-04/99	Brackish	7	5
	Ho Chi Minh	VHCM	3	Frozen adults	03/99	Brackish	3	2
Thailand	Trat	TTR	6	Dried adults	04/99	Brackish	5	5
	Phangnga	TPG	4	Dried adults	02/00	Brackish	4	4
Malaysia (Sarawak)	Lundu	MAL	7	Larvae in EtOH	11/99	Brackish	4	7
	Miri	MAM	6	Larvae in EtOH	11/99	Freshwater	4	6
Total							27	29

Table II-2 : location, number, conservation state, date of collection, and type of larval habitat for specimens of *An. sudaicus* s.l. used in this study. Numbers of specimens analyzed per mtDNA gene region are also listed.

**DNA extraction.** DNA was individually extracted following a slightly modified version of the protocol listed in (Martinez-Torres et al. 1998)). Insects were homogenized in 100 µl of extraction buffer (10 mM Tris-HCl, 60 mM NaCl, 5% sucrose, and 10 mM EDTA, pH 8), to which 125 µl of lysis solution (1.25% SDS, 300 mM Tris-HCl, 5% sucrose, and 10 mM EDTA, pH 8) was added. Following a 30 min incubation at 65°C, 38 µl of 3M potassium acetate (pH 5.2) were added and the homogenates placed at -20°C for 10 min. After centrifugation at 14,000 rpm for 15 min, two volumes of cold 95% ethanol were added and the tubes incubated for at least 10 min at -20°C. DNA was pelleted by centrifugation at 4°C for 15 min at 14,000 rpm. Pellets were then washed with 500 µl of 70% ethanol and dried in speed vacuum. DNA was resuspended in 100 µl of LTE (10mM Tris, pH 8, 0.1mM EDTA) and stored at -20°C until required.

**mtDNA amplification.** A 445-bp region of the COI gene was amplified with universal primers C1-J-1718 and C1-N-2191 (Simon et al. 1994), employing the reaction conditions described in Linton et al. (2001b). Initially, an 804-bp fragment of mitochondrial Cyt-b was cloned and sequenced

following amplification with primers CB1L (Simon et al. 1994) and CytR (Krzywinski et al. 2001). Specific primers (CBsunA 5'-AATGTTACAAGAATTCA-3' and CBsunB 5'-TTAGCTATACATTATGC-3') were subsequently designed to amplify an informative region of 485 bp. For Cyt-b, the reaction conditions were as follows. The 100 µl-reaction mix contained 4 µl of 1:10 DNA dilution, 4 pmoles of primers, 10 µl of 10X buffer (provided with Taq polymerase, 1.5 mM included), 1 mM of MgCl<sub>2</sub> added, 0.2 mM of dNTP mix (Eurogentec, Liège, Belgium), and 5 U of Taq polymerase (QIAGEN, California, USA). The PCR conditions were 94°C for 5 min, then 40 cycles at 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, and 72°C for 40 sec, with a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products were purified (NucleoSpin extract 2 in 1, Machery-Nagel, Düren, Germany), diluted and sent for direct sequencing using the original primers (CBsunA). These fragments of *An. sudaicus s.l.* correspond to nucleotides 10580 - 11062 (COI) and 1649 - 2093 (Cyt-b) of the mtDNA sequence of *An. gambiae* (NC002084) (Beard et al. 1993). All sequences generated in this study are available in GenBank under the following accession numbers: AY243788-AY243799, AY245283, AY245284, AY256954-AY256957, AY253150-AY253155, AY299094-AY299120, AY299339-AY299346.

To define the amino acid translation reading frame, sequences were aligned against the complete mtDNA sequence of *An. gambiae* (Beard et al. 1993). The nucleotide sequences were translated into amino acids with MEGA version 2.1 (Kumar et al. 2001), using the invertebrate mitochondrial code.

**Multiplex PCR conditions.** The multiplex PCR for species identification was developed on the base of the sequence characterized amplified regions (SCAR) derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD). The protocol used in this approach was described in Kengne et al. (2001) and Manguin et al. (2002).

The multiplex PCR was performed in 25 µl-reaction mix containing 3 µl of 1:10 DNA dilution, 4 pmoles of each primer S9A1 5'-GTCCCAAATCCTGCCAATC-3', S9A2 5'-CGATGGTATTCATTCTGCTTTACTA-3', S9B1 5'-AAGATCATCGTTTTCATAGATTTCCG-3', S9B2 5'-CTTTTTGCTGGTTCATTCTATCTGT-3', 2.5 µl of 10X buffer (provided with Taq polymerase, 1.5 mM included), 0.2 mM of dNTP mix (Eurogentec), and 1.25 U of Taq polymerase (QIAGEN). The conditions of amplification were 94°C for 5 min, then 35 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec, and a final elongation at 72°C for 10 min.

**Sequence alignment and phylogenetic analyses.** Multiple sequence alignments were achieved using BioEdit (Hall 1999) with Clustal W 1.4 (Thompson 1994). Transition:transversion ratios (Ti:Tv), sequence diversities, and genetic distances according the Tamura-Nei algorithm (Tamura and Nei 1993) with Gamma correction were calculated in MEGA 2.1 (Kumar et al. 2001). Gamma parameters were estimated within PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). The genetic population structure was investigated using pairwise population F-statistics (F<sub>st</sub>) significance tests. F<sub>st</sub> was estimated using the method of (Slatkin 1991;1995) and the Weir and Cockerham's Theta (F<sub>st</sub>) (Weir and Cockerham 1984) using ARLEQUIN (Schneider et al. 2000). Significance of F<sub>st</sub> estimates were evaluated against the results of 5,000 permutations.

Maximum parsimony (MP) and Neighbor-Joining (NJ) analyses of relationships were performed within PAUP 4.0b10 (Swofford 2002), using *An. gambiae* (Beard et al. 1993) and *An. minimus* species A as outgroup taxa. *Anopheles sudaicus* and both outgroup species belong to subgenus *Cellia*; however, *An. sudaicus* is more closely related to *An. gambiae* than to *An. minimus* A because they both are members of the Pyretophorus Series (Harbach 1994). MP analysis was performed with unweighted characters and by a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with band swapping by tree bisection reconnection (TBR). Congruence of sequence data was tested with the Incongruence Length Difference test (ILD test) (Farris et al. 1994) using full heuristic searches based on 1,000 replicates. The NJ distance method was performed using Tamura-Nei's model + Gamma + I (Tamura and Nei 1993), which takes account of unequal base frequencies and has six substitution rates that are Gamma-distributed across sites. The distribution of substitution rates at variable sites estimated by the Gamma parameter and the assumed proportion of invariable sites (I) were calculated within PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). Bootstrap support values were calculated for MP trees by heuristic search and for NJ trees by NJ search using 500 stepwise addition sequences for each replicate and TBR branch swapping.

## RESULTS

**Mitochondrial DNA analysis.** Twenty-seven and 29 specimens (2-7 specimens/population) were sequenced for the COI and Cyt-b genes, respectively (Table II-3), with 23 specimens being sequenced for both regions. The 930-bp fragment, generated in two separate PCR reactions, comprised 445 bp and 485 bp of the COI and Cyt-b genes, respectively. Due to the protein coding nature of the two mitochondrial genes, indels and gaps were absent and the resulting alignments were unambiguous.

	COI				Cyt-b			
	Pos. 1	Pos. 2	Pos. 3	Total	Pos. 1	Pos. 2	Pos. 3	Total
Total sites	149	148	148	445	162	162	161	485
Variable sites	3	0	20	23 (5.1%)	1	0	15	16 (3.3%)
Parsimony informative sites	3	0	15	18 (78.3%)	1	0	13	14 (87.5%)
%AT	56.0	52.7	89.2	66	60.9	62.3	90.7	71.3

**Table II-3 : percentage of AT richness and relative positions (Pos.) of variable/parsimony informative nucleotides associated with codon positions 1, 2, and 3 for the amino-acid translation of the respective partial sequences of COI and Cyt-b generated in this study. Percentage values in parentheses indicate the proportion of variable sites compared to all sites and the proportion of parsimony informative sites compared to all polymorphic sites.**

The mean AT richness of both gene regions reached 68.3% (COI, 66 %; Cyt-b, 71.3%), which is congruent with published values for mtDNA of other *Anopheles* (Beard et al. 1993, Mitchell et al. 1993). This AT bias is strongly associated with the third codon position, where it accounts for an average of 90% (COI, 89.2%; Cyt-b, 90.7%) of all nucleotide substitutions at this position (Table II-4). Using the expected reading frame based on the whole mitochondrial sequence of *An. gambiae* (Beard et al. 1993), both partial nucleotide gene sequences were translated into amino acids (AA). Translated protein sequences were 148 AA for COI and 161 AA for Cyt-b. Neither sequence contained stop codons, indicating that the data were free from pseudogenes, non-functional nuclear copies of mitochondrial genes. With the exception of nucleotide position 387 (AA129) in the COI sequences of both specimens TTR15 and MAL12 from Trat, Thailand and Lundu, Malaysia, which induced an isoleucine (ATT) to methionine (ATA) change, all other amino acid substitutions were silent. The amino acid sequences generated for the Cyt-b fragments were identical.

The 445-bp fragment of the COI gene amplified for 27 specimens showed a polymorphism of 5.1%. From 23 variable sites, 18, representing 78.3% of all polymorphic sites, were parsimony informative (Table II-3). Comparatively lower levels of variability were detected in the Cyt-b sequences of the 29 specimens examined. In the 485 bp of Cyt-b, 16 polymorphic sites (3.3%) were detected, 14 of which (87.5 %) were parsimony informative (Table II-4). Both markers were highly conserved at the first and second codon positions; the polymorphism was mainly located at the third codon position with 20 variable sites on 23 (86.9%) for COI and 15 on 16 (93.8%) for Cyt-b (Table II-3). Transition was the major substitution type for both markers, with an overall transition:transversion ratio (Ti:Tv) equal to 3.0 for COI and 42.6 for Cyt-b. Transitions appeared to have a linear relationship with Tamura-Nei genetic distances over the range of divergence within the ingroup. However, when substitutions between ingroup and outgroup were considered, the level of transition increased and saturation effect was detected for Cyt-b when sequence divergence reached approximately 8 to 9%. In mitochondrial genes, saturation of transitions often occurs when the total divergence reaches 8 to 10% (Hackett 1996, Griffiths 1997, Bloomer and Crowe 1998, Martin and Bermingham 1998). Apart from the distances associated with the outgroup taxa, the largest distance for Cyt-b data among haplotypes was 2.6%. Thus, the distances within the ingroup were all less than the limit where saturation occurs.

Twenty-two and 10 nucleotide haplotypes were determined for COI and Cyt-b, with a total sequence diversity of 1.6% and 1.5%, respectively.

		Vietnam		Thailand		Malaysian Borneo	
		VBL	VHCM	TTR	TPG	MAL	MAM
VBL			0	0.006	0.007	0.026	0.028
VHCM		0.004		0.006	0.007	0.026	0.028
TTR		0.018	0.019		0.006	0.022	0.025
TPG		0.017	0.017	0.011		0.023	0.025
MAL		0.021	0.022	0.026	0.023		0.003
MAM		0.018	0.018	0.026	0.023	0.009	
Sequence diversities	COI	0.003	0.006	0.005	0.011	0.010	0.005
	Cyt-b	0	0	0.004	0.005	0.001	0.002

**Table II-4 : values of Tamura-Nei genetic distances between populations. Genetic distances for COI (below diagonal line) and Cyt-b (above diagonal line) as well as sequence diversities for COI and Cyt-b.**

Intrapopulation sequence diversities ranged from 0.3 to 1.1% per site for COI and up to 0.5% per site for Cyt-b, indicating a low level of divergence (Table II-5). Genetic distances for Cyt-b were small between Miri and Lundu populations (0.3%) and among Thai and Vietnamese populations, ranging up to 0.7% (Table II-5). Malaysian Borneo populations (shaded area in Table 8) were genetically more distant to the Thai and Vietnamese populations, with values of 2.2% to 2.8% (Table II-5). Genetic distances based on COI revealed the same pattern of genetic difference, with 0.4% divergence between both populations from Vietnam (VBL, VHCM) and 1.1% between those from Thailand (TTR, TPG), and also values ranging from 1.8% to 2.6% between the Thai or Vietnamese populations and those from Malaysian Borneo (shaded area in Table 8). Genetic divergences between the Thai and Vietnamese populations were higher for COI (1.7% to 1.9%) than Cyt-b (0.6% to 0.7%). Based on genetic divergence, two genetically distant groups are apparent, one consisting of populations from Malaysian Borneo (MAL and MAM) and the other comprising the continental populations of Thailand and Vietnam (VBL, VHCM, TTR, and TPG). Mean genetic distance values between these two groups reached 2.2% for COI and 2.5% for Cyt-b. Moreover, no haplotype was common between these two groups, whereas one haplotype was shared by Vietnamese populations for COI, two Cyt-b haplotypes present in the populations from Bac Lieu (Vietnam), Ho Chi Minh (Vietnam), and Trat (Thailand), and two in the populations from Miri and Lundu. Intra-group sequence diversities were close to intra-population values, with 0.8% in specimens from Malaysian Borneo and 1.2% in the continental ones for COI, and 0.2% and 0.5%, for Cyt-b, respectively, indicating homogeneity among haplotypes in each group. Genetic structure, as described above, is supported by the coefficients of differentiation:  $F_{st}$  (Slatkin 1995) between these two groups reached 0.5 ( $p < 0.01$ ) for COI and 0.82 ( $p < 0.01$ ) for Cyt-b. Also, Theta values (Weir and Cockerham 1984) were higher than  $F_{st}$ , with 0.7 ( $p < 0.01$ ) for COI and 0.90 ( $p < 0.01$ ) for Cyt-b. Highly significant  $F_{st}$  values for Cyt-b indicate negligible gene flow between groups. Although  $F_{st}$  for COI was lower, it still described limited gene flow. These values are indicative of two distinct species. Fixed nucleotide substitutions characterized each species. Three substitutions (positions 216, 294, and 378) among 19 polymorphic sites in COI and seven (positions 12, 24, 138,

267, 297, 469, and 474) among 16 in Cyt-b were identified. Position 216 of the COI fragment showed three nucleotide substitutions, which were country-specific.

**Evolutionary relationships.** Maximum parsimony (MP) and Tamura-Nei based Neighbor-joining (NJ) analyses were rooted with the outgroup taxa, *An. gambiae* and *An. minimus* species A. The congruence of the mitochondrial markers (ILD test P value = 0.08 > 0.05) allowed the joined analysis of the COI and Cyt-b sequences in the MP approach. Trees constructed in both analyses showed congruent basal topologies with *An. minimus* A most basal, followed by *An. gambiae* and a monophyletic *An. sundaicus* clade (Figure II-3). Both analyses revealed two distinct clades for *An. sundaicus* populations, one (Clade I) corresponding to *An. sundaicus* s.s. from both sites in Malaysian Borneo, and the second (Clade II) representing the continental populations from Thailand and Vietnam (Figure II-3), NJ trees not shown). The joined data MP analysis strongly supported the separation of these clades with bootstrap values of 97 for Clade I and 86 for Clade II (Figure II-3). The analyses confirmed the occurrence of two genetic species in the Sundaicus Complex: *An. sundaicus* s.s. in Sarawak, Malaysia on the island of Borneo (Linton et al. 2001a), and *An. sundaicus* species A in coastal areas of Vietnam and Thailand.

**Differentiation of continental and island populations using multiplex PCR.** Of the 62 RAPD primers screened (list available upon request from S.Manguin), only five (B7, F6, S5, S8, S9) showed polymorphism with reproducible banding patterns, discriminating continental populations (Thailand and Vietnam) from those of Malaysian Borneo. Of these five primers, only the S9 produced SCAR fragments with the expected RAPD polymorphism showing two bands, one at 870 bp, specific to the continental species, and one at 970 bp for *An. sundaicus* s.s. in Malaysian Borneo (data not shown). After cloning and sequencing these two SCAR fragments, four species-specific primers were designed for an optimization of the multiplex PCR. Amplified products obtained with these species-specific SCAR primers presented bands at 692 bp and 958 bp for *An. sundaicus* from Malaysian Borneo, and only one band at 692 bp for the continental populations (Figure II-4). The band at 692 bp served as the common band to identify *An. sundaicus* s.l. and the one at 958 bp was specific to *An. sundaicus* s.s.

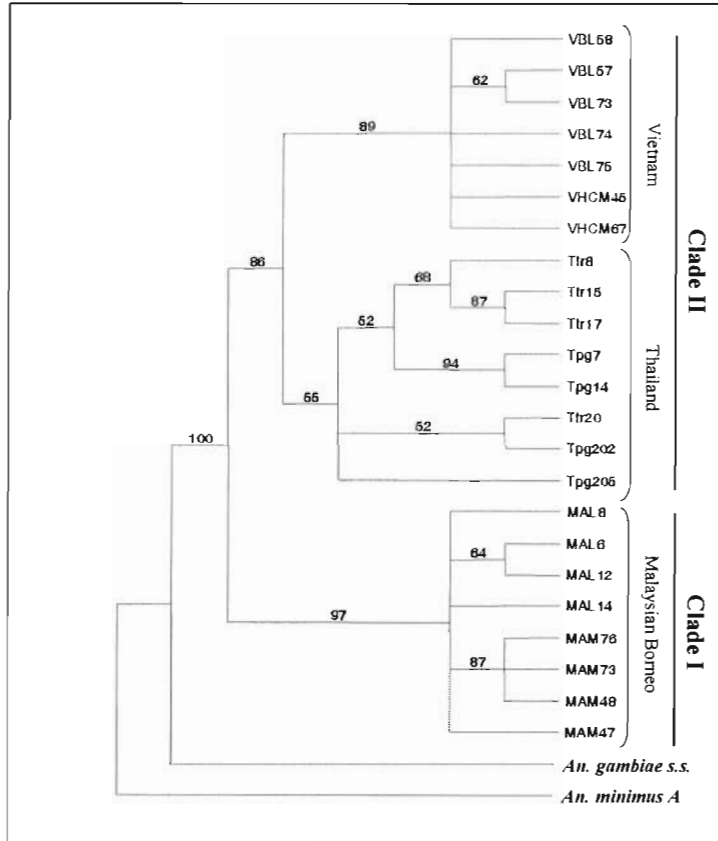


Figure II-3 : maximum parsimony tree derived from the analysis of 930 bp of combined COI and Cyt-b nucleotide sequences. The analysis was performed with unweighted characters and by a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with band swapping by tree bisection-reconnection. Bootstrap support values were calculated by a heuristic search using 500 stepwise addition sequences for each replicate and TBR branch swapping. See Table 6 for abbreviations for populations.

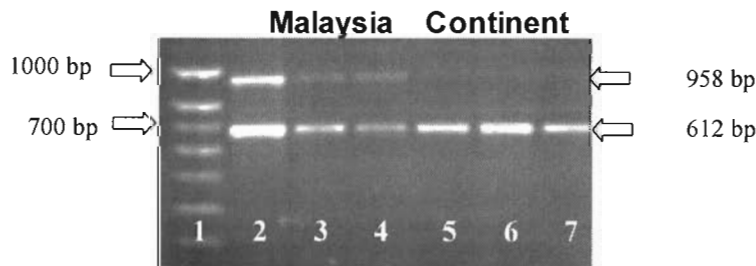


Figure II-4 : multiplex PCR for the identification of *An. sundaicus* s.s. (lanes 2–4; Malaysian Borneo) and *An. sundaicus* species A from coastal areas of continental Southeast Asia (lane 5, Thailand; lanes 6–7, Vietnam). Lane 1 = 100 bp ladder.

## DISCUSSION

The existence of a species complex within *An. sundaicus* was first suggested from ecological and behavioral variations (Chow 1970, Brandling-Bennett et al. 1981, Kumari et al. 1993, Nguyen Tang Am et al. 1993, Kumari and Sharma 1994, Das et al. 1997, Chang Moh Seng et al. 2001). Subsequently, Sukowati and Baimai (1996) and Sukowati et al. (1999) defined cytogenetic and isoenzymatic forms among *An. sundaicus* populations in Thailand and Indonesia. This study is the first to present molecular evidence for recognizing two separate genetic species within the complex. Based on COI and Cyt-b partial mtDNA gene sequences, two well supported clades, each representing a separate species, were revealed by MP and NJ analyses of relationships among *An. sundaicus s.l.* populations. In addition to this differentiation, a genetic homogeneity within each entity, unlikely gene flow between entities, and a genetic distance greater than 2% between the two defined taxa (Foley et al. 1998, Beebe et al. 2000), further support the recognition of the two species. The neotype of *An. sundaicus* from Lundu Province in Sarawak on the island of Borneo designated by Linton et al. (2001b) is geographically isolated and genetically distinct from the species A that occurs in coastal areas of Vietnam (Ho Chi Minh and Bac Lieu Provinces) and Thailand (Trat and Phangnga Provinces). Populations of *An. sundaicus s.s.* in Malaysian Borneo breed in both brackish and freshwater habitats (Chang Moh Seng et al. 2001, Linton et al. 2001a); thus differences in larval ecology in this area do not support the hypothesis of a Sundaicus Complex. Tolerance to different levels of salinity is not an exception for species of subgenus *Cellia*. Larvae of *An. farauti s.s.* of the Australasian Punctulatus Group (Sweeney 1987), and *An. bwambae*, *An. gambiae*, *An. merus*, and *An. melas* of the Afrotropical Gambiae Complex (Thelwell et al. 2000, Krzywinski and Besansky 2003) commonly occur in both brackish and freshwater habitats.

The two species reported here are completely allopatric due to their wide geographic separation by the South China Sea, and introgression is not likely to occur. Consequently, due to this allopatric situation and also to the haploid property of the mtDNA (Page and Holmes 1998), heterozygotes are absent and gene flow cannot be fully studied. According to the biological species concept, extended allopatry is considered as a mechanism for speciation by enforced reproductive isolation of populations and subsequent genetic divergence (Turelli et al. 2001). Based on calculations of the mitochondrial molecular clock with 2.3% divergence per million years (myr) (Brower 1994), the genetic divergence between these two species was estimated at 0.9 myr for both markers, with approximated values of 0.91 myr for COI and 0.94 myr for Cyt-b. This estimated time of divergence seems to be correlated with the historical geography of Southeast Asia. Alternating glaciation and warm periods occurred during the Pleistocene between 1.8 million and 11,000 years ago. During ice ages, sea levels decreased from 50 to 200 m and land links formed between the islands and mainland of Southeast Asia. The creation of a land mass (Sundaland) that included Borneo, the continent, and Indonesia was possible only when sea levels decreased by 200 m (Tougaard 2001). This situation occurs 0.8 myr Before Present (BP). After 0.8 myr BP, sea levels fluctuated from only -50 to -135 m, thus providing a water barrier between continental and island populations that facilitated species divergence and speciation.

Further investigation with molecular markers, in particular by increasing the number of collection sites within the geographical distribution of *An. sundaicus s.l.*, is necessary to more fully understand the Sundaicus Complex. Moreover, the results of previous cytogenetic and isoenzymatic studies need to be confirmed by molecular studies. Chromosomal inversions and molecular markers are not always in congruence for species discrimination in *Anopheles* species complexes. Mukabayire et al. (1999) examined the mtDNA (Cyt-b) and rDNA (ITS2) of karyotyped *An. funestus* and found that neither was correlated with different chromosomal arrangements. Similarly, the M and S molecular forms of *An. gambiae* do not always coincide with the Mopti and Savana + Bamako chromosomal forms (Wondji et al. 2002, Krzywinski and Besansky 2003). Clearly molecular study of Indonesian populations of *An. sundaicus s.l.* that are characterized by different polytene chromosome banding patterns (Sukowati and Baimai 1996) and enzyme profiles (Sukowati et al. 1999) is essential to better understand the Sundaicus Complex. Since Sukowati and Baimai (1996) found only chromosomal form A in Trat Province of Thailand, it is most likely the continental species recognized in this paper as *An. sundaicus* species A. Sukowati et al. (1999) also found that form A is widespread in Indonesia; hence the first step to test for congruence between the molecular, cytogenetic, and enzymatic markers will be to use the identification PCR method presented here to confirm the presence of the continental species in Indonesia. In addition, the PCR technique will need to be redesigned and validated if the existence of other species of the Sundaicus Complex is confirmed with molecular markers. The development of a cheap, rapid, reproducible method of identification is important for studying the ecology and behavior of vector species, a prerequisite for improving the effectiveness and selectivity of vector control methods.

**Dusfour I. et al.** Speciation and phylogeography of the Southeast Asian *Anopheles sundaicus* complex. **Submitted to Mol. Ecol. in Oct 2004**

Cyclical climate fluctuations during the quaternary period are believed to have an impact on the colonization and lineage divergence across Southeast Asia. Glacial cycles exposed vast areas of the Southeast Asian continental shelf and created land bridges between islands and mainland. These land bridges may have enabled migrations that explain the current distribution of mammals. However, the distribution would have been influenced by environmental changes, the consequences of climate variations, variously described as savannah-like (Verstappen 1997, van der Kaars et al. 2001) or tropical rainforest vegetation (Sun et al. 2000). More recently, indications of persistent rain forest habitats, despite widespread arid conditions throughout the Pleistocene, was hypothesized (Brandon-Jones 1996, Gathorne-Hardy et al. 2002, Gorog et al. 2004). The importance of periodic connections and refugia on dispersal and vicariance events have been studied for some groups of vertebrates (Heaney 1986, Schmitt et al. 1995, Ruedi 1996, Ruedi and Fumagalli 1996, Karns et al. 2000, Inger and Voris 2001), but little is known for invertebrates (Gathorne-Hardy et al. 2002), and particularly on *Anopheles* biogeography in this region. One reason for this is the lack of fossil records; another is that the main interest in *Anopheles* has been the identification and characterization of malaria vector species in relation to malaria transmission. Elucidating the genetic population structure of *Anopheles* species complexes is a prerequisite for determining which genetic units of the complex are vectors of malaria, and unravelling the ecological and ethological differences that are relevant to disease transmission. Such knowledge will improve the understanding of malaria epidemiology and will help in implementing appropriate vector control strategies.

The main distribution of *An. sundaicus s.l.* is on the coastal areas of the mainland and islands of Southeast Asia. Its reported distribution ranges from northern India and Myanmar, southwards through Thailand, Cambodia and Vietnam to the Malaysian Peninsula, and the islands of Nicobar, Andaman, Borneo, Java, Sumatra and Sulawesi (Reid 1968, Sukowati et al. 1996, Linton et al. 2001a). *Anopheles sundaicus s.l.* is a malaria vector in these areas. It was suspected to be a species complex due to differences in its behavior and ecology, notably with immature stages occurring in brackish water or freshwater (Dusfour et al. 2004a). The presence of distinct genetic forms (A, B and C) in Indonesia and Thailand was first demonstrated by cytogenetics, and confirmed by isoenzymatic analysis (Sukowati et al. 1996, 1999). Form A was found in all study sites in both countries. Form B, strongly linked with freshwater, occurred only in northern Sumatra and central Java. Form C was restricted to Asahan in northern Sumatra. Asahan was the only site where all three cytotypes occurred in sympatry (Sukowati et al. 1996, 1999). A fourth cytotype, D, was identified

from the Nicobar Islands, India (Nanda et al. 2004). The identity of *An. sundaicus s.s.* was fixed with the designation of a neotype from material collected at Pandan Beach in the Lundu District of Sarawak, Malaysia (Linton et al. 2001a). Morphological characters and molecular sequences of the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) and Cytochrome Oxidase I (COI) were described. More recently, we confirmed the existence of two allopatric species based on the mitochondrial markers COI and Cytochrome b (Cyt-b) (Dusfour et al. 2004b). One of these species is *An. sundaicus s.s.* from freshwater and brackish water sites of Miri and Lundu in Sarawak, respectively; the other is *An. sundaicus* species A from brackish water sites in Thailand and Vietnam. The hypothesis of a species complex based on ecological differences, brackish vs freshwater, in Sarawak (Chang Moh Seng et al. 2001) was not confirmed by our results. We suggested a hypothesis of speciation by vicariance due to sea level variations during the Pleistocene epoch in this region, allowing emergence of the whole continental shelf or isolation of distinct islands (Dusfour et al. 2004b).

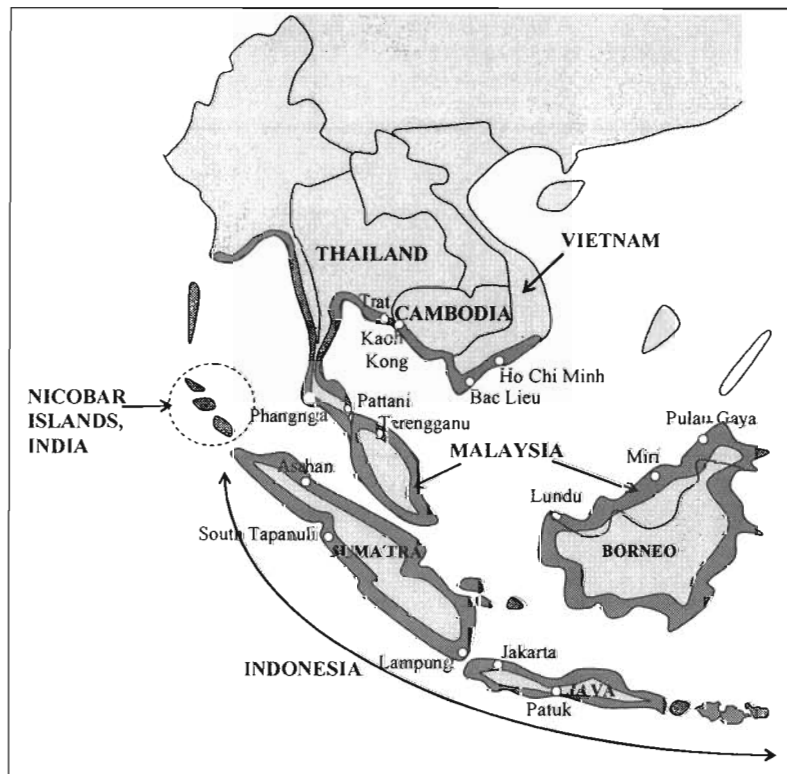
Mitochondrial markers have been used in studies of insect species complexes (Crozier et al. 1995, Besansky et al. 1997, Lyman et al. 1999, Mukabayire et al. 1999, Lachaise et al. 2000, Morrow et al. 2000, Krzywinski et al. 2001, Lin and Wood 2002, Linton et al. 2002a, Garros et al. 2004a), including phylogeographic approaches (Blondel 1995). The wide use of these markers is due to their maternal inheritance and their high rate of evolution (5 to 10 times more than nuclear markers) (Blondel 1995). The internal transcribed spacer 2 of rDNA (ITS2) is also commonly used, particularly for the identification of closely related anopheline mosquitoes (Fritz et al. 1994, Beebe and Saul 1995, Cornel et al. 1996, Porter and Collins 1996, Walton et al. 1999, Linton et al. 2001b, Linton et al. 2002b, Garros et al. 2004b). The ribosomal DNA of mosquitoes consists of tandemly repeated transcriptional units known to occur mostly at a single haploid locus (Collins and Paskewitz 1996) implying sequence similarity within copies of units among individuals in an interbreeding population or species (Dover 1982). However, heterogeneity observed among copies (Beebe et al. 2001, Leo and Barker 2002) may be due to recent hybridization or slow concerted evolution.

The first aim of the present work was to enlarge the study of the *An. sundaicus* complex to a wider geographic area. Populations from Cambodia, southern Thailand, Peninsular Malaysia, Sabah (Malaysia) and Indonesia were added to populations from Vietnam, Thailand and Sarawak (Malaysia) previously analyzed by Dusfour et al. (2004b). Secondly, the potential role of quaternary climate oscillations was explored to explain the present distribution of the *An. sundaicus* complex based on analyses of mitochondrial (cytochrome b and cytochrome oxidase I) and nuclear (internal transcribed spacer 2) markers.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Mosquitoes.** Specimens used in this study were identified as *An. sundaicus* s.l. using the morphological keys of Reid (1968), and the keys for the *Anopheles* of Vietnam prepared by IMPE (1987). Specimens were collected from 15 localities, including five from Indonesia, four from Malaysia and three from Thailand, two from Vietnam and one from Cambodia (Figure II-5, Table II-

6). Populations of Trat (Thailand), Asahan (Sumatra), South Tapanuli (Sumatra), Lampung (Sumatra), and Patuk (Java) were the same localities as those of Sukowati et al. (Sukowati et al. 1996). Breeding sites from Miri (Sarawak, Malaysia) and South Tapanuli (Sumatra, Indonesia) were the only two characterized as freshwater (Table II-6) (Sukowati et al. 1996, 1999, Chang Moh Seng et al. 2001, Linton et al. 2001a). Specimens previously identified by Dusfour et al. (2004b) as *An. sundaicus* s.s. and *An. sundaicus* species A based on cytochrome b (Cyt-b) and cytochrome oxidase I (COI) sequences were used to unambiguously assess the identity of new populations and infer the phylogeography of the complex. Chromosomally typed specimens from Asahan provided by S. Sukowati were also sequenced. Sequences of *An. minimus* A from Hoa Binh Province, Vietnam, and *An. gambiae* obtained from GenBank (Beard et al. 1993) were used as outgroup taxa to assess genetic relationships between populations of *An. sundaicus* s.l.



**Figure II-5 : map of Southeast Asia showing the locations of populations of *An. sundaicus* s.l. studied and its known distribution (in grey)**

Countries	Localities	PC	CD	LH	COI	Cyt-b	both
Vietnam	Bac Lieu	VBL	1999	Brackish	7	7	6
Vietnam	Ho Chi Minh	VHCM	1999	Brackish	8	7	7
Cambodia	Kaoh Kong	KKK	2003	Brackish	5	5	5
Thailand	Trat	TTR	1999	Brackish	6	6	6
Thailand	Phangnga	TPG	2000	Brackish	5	5	5
Thailand	Pattani	TPA	2003	Brackish	8	8	8
Malaysian Peninsula	Terengganu	MAT	2003	Brackish	3	6	3
Malaysia (Sarawak)	Lundu	MAL	2999	Brackish	7	7	7
Malaysia (Sarawak)	Miri	MAM	1999	Freshwater	6	6	6
Malaysia (Sabah)	Pulau Gaya	MAG	2003	Brackish	6	4	4
Indonesia (Sumatra)	Asahan	INA	2001	Brackish	6	7	6
Indonesia (Sumatra)	South Tapanuli	INST	2001	Freshwater	6	7	6
Indonesia (Sumatra)	Lampung	INL	2001	Brackish	7	7	7
Indonesia (Java)	Jakarta	INJ	2001	Brackish	1	1	1
Indonesia (Java)	Patuk	INP	2001	Brackish	5	5	5
TOTAL					86	88	82

**Table II-5 : origin of mosquitoes, population code (PC), year of collection (Y), type of larval habitat (LH) numbers of specimens analysed for COI and Cyt-b individually and in combination.**

**DNA extraction, amplification and sequencing.** DNA was extracted from individual mosquitoes using the phenol-chloroform procedure of Linton *et al.* (2001a). The 445-bp region of the mitochondrial COI gene was amplified with the universal primers C1-J-1718 and C1-N-2191 (Simon *et al.* 1994), using the conditions described by Linton *et al.* (2001a). The 485-bp fragment of Cyt-b was amplified with primers CBSunA 5'-AATGTTACAAGAATTCA-3' and CBSunB 5'-TTAGCTATACATTATGC-3', employing the reaction conditions described by Dusfour *et al.* (2004b). PCR products were purified (NucleoSpin extract 2 in 1, Machery-Nagel, Düren, Germany), diluted and directly sequenced using both original primers.

The COI fragments of *An. sudaicus s.l.* correspond to nucleotides 10580 - 11062 and those of Cyt-b to nucleotides 1649 - 2093 of the mtDNA sequence of *An. gambiae* (NC002084) (Beard *et al.* 1993). Difficulties in amplifying the cytotyped specimens of S. Sukowati led us to clone the PCR product with the pGem-T easy vector kit by insertion of PCR products in pGem-T easy vector (Promega, Madison, USA) and transformation within JM109 competent cells (Promega). Purified isolated clones (QIAprep, Qiagen, California) were sequenced with the standard primers T7 and Sp6.

The ITS2 of rDNA was amplified with universal primers published in Beebe & Saul (1995). To evaluate the presence of a distinct rDNA unit in an individual mosquito, each PCR product was cloned with the pGem-t easy vector kit; 2 or 3 specimens per population and 2 or 3 clones per individual were sequenced with the T7 and Sp6 primers. A total of 100 sequences from 26 individuals of 11 populations were compared: 4 individuals from Bac Lieu (Vietnam), 2 from Ho Chi Minh (Vietnam), 3 from Trat (Thailand), 1 from Phangnga (Thailand), 2 from Asahan (Sumatra), 3 from South Tapanuli (Sumatra), 1 from Jakarta (Java), 2 from Lampung (Sumatra), 2 from Patuk (Java), 3 from Lundu (Sarawak) and 3 from Miri (Sarawak). Sequence divergence within and among clades defined by mitochondrial phylogenetic reconstruction was calculated.

The sequences obtained during the study are available in GenBank under the following accession numbers: AY243788-AY243799, AY245283, AY245284, AY256954-AY256957, AY253150-AY253155, AY299094-AY299120, AY299339-AY299346 (sequences from Dusfour *et al.*, 2004b), AY672287-AY672404 for new haplotypes and AY768540-AY768543 for ITS2 types.

#### **Mitochondrial DNA analyses.**

**Sequence characteristics and phylogenetic analyses.** Multiple sequence alignments were achieved using BioEdit (Hall 1999) with Clustal W 1.4 (Thompson 1994). Polymorphic sites, parsimony informative mutations, the number of haplotypes and AT percentage were calculated in DNAsp4.0 (Rozas *et al.* 2003).

Incongruence of the combined markers was tested with the Incongruence Length Difference test (ILD test) (Farris *et al.* 1994) using full heuristic searches based on 1,000 replicates within PAUP4b10 (Swofford 2002). All phylogenetic analyses were performed for both separate (COI, Cyt-b) and combined markers. Trees were reconstructed unrooted as well as rooted with both *An.minimus* A and *An. gambiae* as outgroups for all three algorithms described below. *Anopheles sundaicus s.l.* and the outgroup taxa are members of subgenus *Cellia* (Harbach, 2004).

Maximum parsimony (MP) analyses were conducted using PAUP 4.0b10 (Swofford 2002), MP analysis was performed with unweighted characters and by a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with tree bisection reconnection (TBR) branch swapping options. Bootstrap support values (BSV) were calculated for MP trees by heuristic search using 10 stepwise addition sequences for each 1,000 replicates and TBR branch swapping. Maximum Likelihood (ML) were performed with PHYML v2.1b1 (Guindon and Gascuel 2003). The optimal model of molecular evolution for likelihood analysis was determined by the Akaike Information Criterion (AIC) run in Modeltest (Posada and Crandall 1998) using PAUP4.0b10 (Swofford 2002) with and without outgroups. Parameters of this model were introduced in the PHYML program to perform the ML analysis after data bootstrapping 1,000 times with Seqboot from PHYLIP (Felsenstein 1994). The Consensus program from this package was used to create the final consensus tree.

Bayesian phylogenetic reconstruction (Rannala and Yang 1996, Yang and Rannala 1997) was implemented using MrBayes3b4 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo (MCMCMC) sampling was performed with five incrementally heated chains that were simultaneously run for 1,000,000 generations, using the default program as starting values. Five hundred generations were burned-in. The remaining generations were used to reconstruct the topology and calculate prior probabilities for each node.

Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira and Hasegawa 1999) and Wilcoxon signed-rank (Templeton 1983) tests implemented in PAUP4b10 were used to determine whether some alternative topologies were significantly as good as the best ones obtained from the ML and MP analyses, respectively. Equivalent method to test topologies of trees obtained by Bayesian analysis does not yet exist.

**Estimation of time of divergence.** Tajima's relative test, which tests the constancy of evolutionary rates between two clusters of sequences, was performed using MEGA (Kumar *et al.* 2001). In the

case of constancy of evolutionary rates, the approximation of divergence time between lineages was calculated based on genetic divergence and corrected for ancestral polymorphism, as proposed by (Avice 2000), using the formula:  $P_{net} = P_{ab} - 0.5 (P_a + P_b)$ ,

where  $P_{net}$  is the corrected distance between isolated lineages A and B,  $P_{ab}$  is the mean genetic distance in pairwise comparisons of individual from A vs B and  $P_a$  and  $P_b$  are mean genetic distances among individuals within these lineages. MEGA was used to compute  $P_{net}$  based on the Tamura–Nei (TN) model, with gamma correction and its standard error (SE).

No fossil record is available to calibrate the molecular clock. However, as currently used for *Anopheles* (Sharpe et al. 2000), we used the molecular clock estimated for mitochondrial DNA of *Drosophila* (De Salle et al. 1987) at 2% per million years. Since the same molecular clock is used for all mitochondrial genes, we used combined COI and Cyt-b markers to estimate divergence time.

**Diversity and mismatch distribution.** Basic diversity estimates were calculated to track diversity from mitochondrial markers within *An. sudaicus s.l.* populations. Evaluation of shared haplotypes, estimation of haplotype diversity (h), nucleotide diversity (p) and the mean number of pairwise differences (k) were performed using DNAsp4.0 (Rozas et al. 2003). Distribution of the numbers of pairwise genetic difference between individual haplotypes (mismatch distribution) was analyzed using the sudden expansion model of Rogers and Harpending (1992) implemented in DNAsp4.0. The shape of a mismatch distribution is affected by historical demographic changes of the major lineages: recent sudden expansions or bottlenecks generate unimodal mismatch distributions, whereas stable or slowly declining populations produce a variety of multimodal distributions.

#### **Ribosomal DNA analyses.**

Due to the low polymorphism found among ITS2 sequences and the presence of genetically distinct units within some individuals, sequences of clones were grouped in types relevant to the most informative sites. The diversity of types was evaluated by the calculation of type proportion and intragenomic diversity within populations of each previously defined clade.

## **RESULTS**

#### **Sequence characteristics.**

The 445-bp fragment of the COI gene amplified from 86 specimens (Table II-5) showed a polymorphism of 14.3%. From 64 variable sites, 31 (48.4% of all polymorphic sites) were parsimony informative. Comparatively lower levels of variability were detected in the Cyt-b sequences of the 88 specimens examined (Table II-5). In the 485 bp of Cyt-b, 31 variable sites (6.3%) were detected, 21 of which (67.7%) were parsimony informative. The AT percentages were 50% for COI and 71.3% for Cyt-b. This latter value was congruent with published values for the mtDNA of *An. quadrimaculatus* (65.4%) (Mitchell et al. 1993) and *An. gambiae* (68.4%) (Beard et al. 1993), whereas the value for COI was lower. The 88 Cyt-b sequences are grouped in 33 distinct

haplotypes, the 86 COI sequences are grouped in 63 haplotypes and the combined markers exhibited 65 distinct haplotypes from 82 sequences (Table II-5).

#### **Phylogenetic reconstruction of mitochondrial DNA.**

The ILD test resulted in acceptance of the hypothesis of incongruence between the two mitochondrial markers ( $p = 0.003 < 0.005$ ). Despite this incongruence, the tree robustness was increased when both markers were combined. The best fit model for the combined data was defined by modeltest as K81uf+G+I ( $\gamma = 0.7867$  and  $\text{pinv} = 0.6227$  for data with outgroups) and HKY+G+I ( $\gamma = 0.7827$  and  $\text{pinv} = 0.7318$  without outgroups). In comparison, best fit for COI alone, including outgroup taxa, was defined as GTR+G+I ( $\gamma = 0.7527$  and  $\text{pinv} = 0.4946$ ) and that for Cyt-b alone by TIM+G ( $\gamma = 0.0989$  for COI and Cyt-b) when the outgroup taxa were excluded, the best fit for COI was defined by TrN+I+G ( $\gamma = 0.8278$  and  $\text{pinv} = 0.6876$ ), and that for Cyt-b by TrN+I ( $\text{pinv} = 0.8730$ ). All models were tested but only K81uf+G+I ( $\gamma = 0.7867$  and  $\text{pinv} = 0.6227$  for data with outgroup taxa) and HKY+G+I ( $\gamma = 0.7827$  and  $\text{pinv} = 0.7318$  without outgroup taxa) were used for reconstructing rooted and unrooted trees with combined markers whose results are presented below.

Rooted and unrooted phylogenetic reconstructions revealed a separation into three monophyletic clades that are congruent with geographical distribution. One clade, named Borneo (Figures 11-13), includes the populations from Miri and Lundu (Sarawak, Malaysia), as previously noted by Dusfour *et al.* (2004b), as well as the population of Pulau Gaya (Sabah, Malaysia) (Figure 11-13). This clade is represented by *An. sundaicus s.s.* The spread of this species toward northern Borneo is demonstrated. The second clade, called Continent, includes the populations from Vietnam, Cambodia, Thailand, and peninsular Malaysia, and is recognized as *An. sundaicus* species A. The third clade includes the Indonesian populations from Sumatra and Java. The analyses did not reveal distinctions between populations from fresh and brackish water. The freshwater sites at South Tapanuli (Sumatra) and Miri (Sarawak) were not genetically distinct, in accordance with our previous findings (Dusfour *et al.* 2004b).

Considering only rooted reconstructions, the Borneo clade is the more robust overall, with bootstrap values (BSV) ranging from 85 to 93.7 (Figure II-6) and a posterior probability of 0.97 (Figure II-7). The Continent clade was the least strongly supported, with BSV from 54 to 60.6 (Figure II-6), but it has a high posterior probability of 0.98 (Figure II-7). Finally, the Indonesian clade was well supported, with BSV from 76 to 79.2 (Figure II-6) and a posterior probability of 0.83 (Figure II-7). Given that the ILD test indicated some conflict between the data sets, the unresolved basal node and different topologies were not surprising. Topologies resulting from both ML analyses (parameters evaluated with or without outgroup) were the same: Borneo and Indonesia were sister clades with similar BSV (90/93,7 and 79,2/78 respectively) at each node (Figure II-6). The MP analyses revealed the same topology with lower support values at the main nodes ranging from 54 to 85

(Figure II-6). The topology of the Bayesian tree differed from the MP and ML trees in having the Borneo and Continent clades as sister clades (Figure II-7).

To determine the best topology, three possible tree topologies were tested against the best ones obtained by ML and MP analyses. The Borneo and Continental clades were sister clades in the first topology, the Indonesian and Continental clades were sister clades in the second, and the relationships of the three clades were unresolved in the third topology. The results of the SHtest (Shimodaira and Hasegawa 1999) and the Wilcoxon sign rank (Templeton 1983) indicated that all the alternative tree topologies were as good as the best topologies (data not shown) with  $p > 0.05$  (threshold).

The unrooted trees strongly supported monophyly for the three clades (BSV > 80 and PP= 1 for all clades) and the basal branches of the unresolved clades had equivalent lengths. Figure II-8 shows the unrooted ML tree with supporting values for each clade. Unrooted trees showed higher BSV than rooted trees. Indeed, ML reconstruction exhibited BSV ranging from 86 to 99 and MP one from 82 to 98. Posterior probabilities of the BA equalled 1.

#### **Time estimation of clade divergence based on mtDNA.**

Tajima's relative-rate test agreed with the homogeneity of molecular evolution rates of all the branches (Table II-7), with  $p > 0.05$ , allowing the time of divergence of the clades to be calculated based on an evolution rate of 2% divergence per million years (Myr). Corrected times of divergence, according to Avise (Avise 2000), are presented in Table 10, including estimated intervals of time for divergence of the clades. *Pnet* ranged between 1.2% and 1.4% with a standard error of 0.3%. Consequently, the intervals of time for divergence of the clades were all equivalent, ranging between 450,000 and 850,000 years, corresponding to the middle Pleistocene epoch (Tougaard 2001).

	<b>Continent/Borneo</b>	<b>Borneo/Indonesia</b>	<b>Continent/Indonesia</b>
Relative rate test: chi-square (p-value)	0.06 (0.808)	0.69 (0.405)	1.14 (0.285)
<i>Pnet</i> (SE)	0.0140 (0.003)	0.0130 (0.003)	0.0120 (0.003)
Time of divergence (years)	550,000-850,000	500,000-800,000	450,000-750,000

**Table II-6 : results of Tajima's relative rate test (chi-square and p value) between clades. Tamura Nei (93) net genetic distances and standart error (SE) are indicated and were used to calculate, based on 2% divergence per myr, the interval of time for divergence.**

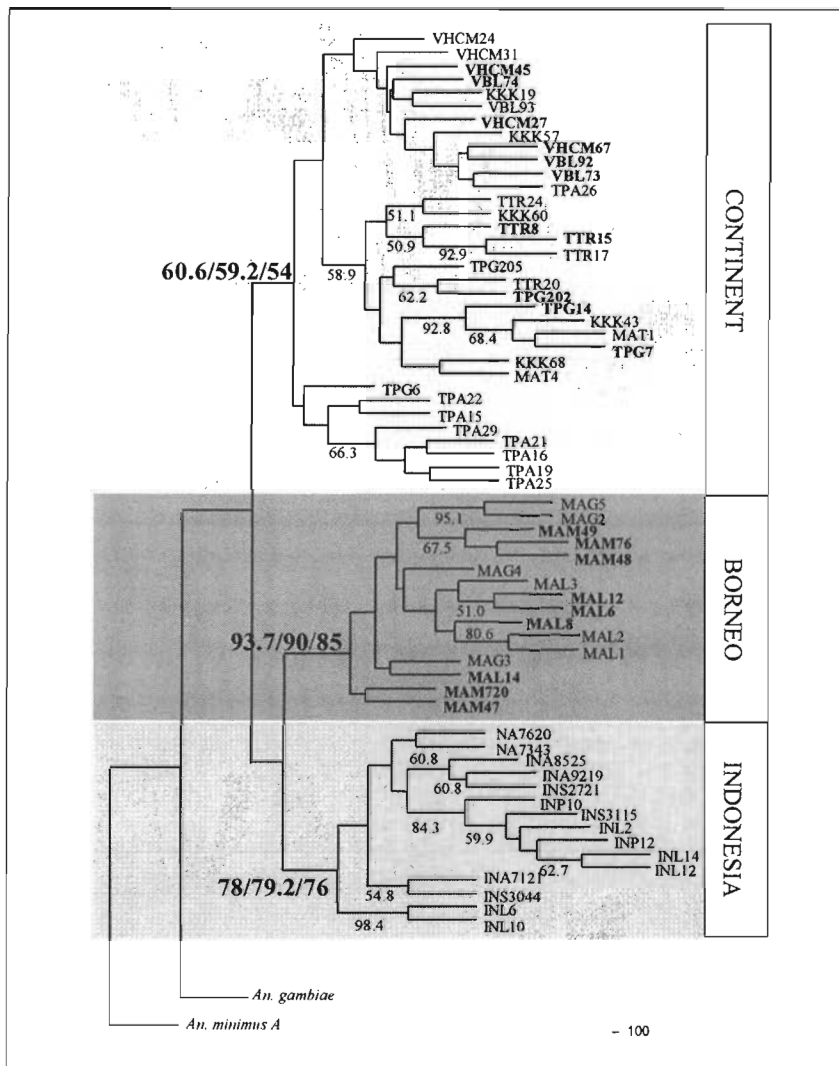


Figure II-6 : ML rooted tree after bootstrapping 1,000 times. Support values are for reconstruction based on the K81uf+G+I, gamma = 0.7867 and pinv = 0.6227 model (values on the left). The additional support values correspond to ML reconstruction based on HKY+G+I, gamma = 0.7827 and pinv = 0.7318 model (central values) and MP reconstruction (values on the right) with unweighted characters and a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with tree bisection reconnection branch swapping options. Bootstrap support values were calculated by heuristic search using 10 stepwise addition sequences for 1,000 replicates and TBR branch swapping. Specimens in bold were studied by Dusfour *et al.* (2004b).

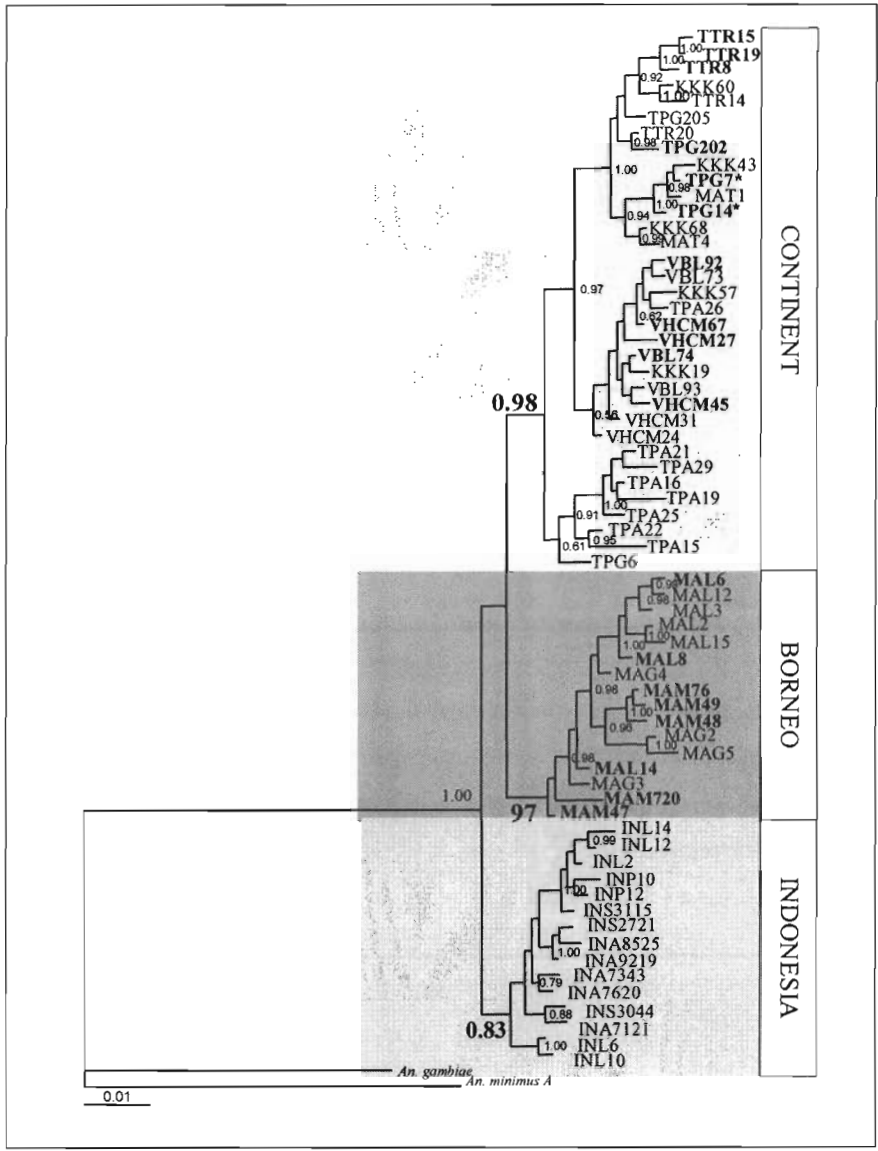
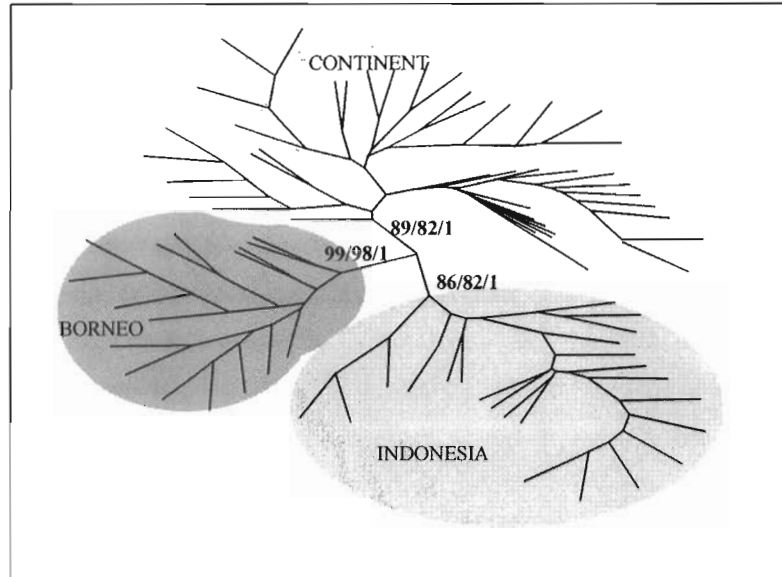


Figure II-7 : bayesian tree derived using MrBayes3b4. MCMCMC sampling was performed with five incrementally heated chains that were simultaneously run for 1,000,000 generations, using the default program for starting values. Five hundred generations were burned-in. The remaining generations were used to reconstruct the topology and calculate prior probabilities for each node. Specimens in bold were studied by Dusfour *et al.* (2004b).



-10

**Figure II-8 :** unrooted ML tree after 1,000 bootstraps. Support values indicated on branches are for ML reconstruction based on the HKY+G+I,  $\gamma = 0.7827$  and  $\text{pinv} = 0.7318$  model (values on the left). The additional support values correspond to the MP tree constructed with unweighted characters and by a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with tree bisection reconnection branch swapping options (central value). Bootstrap support values calculated for trees by heuristic search using 10 stepwise addition sequences for 1,000 replicates and TBR branch swapping. Posterior probabilities of BA analysis are on the right side.

#### **Diversities and mismatch distribution.**

Nucleotide diversity ( $p$ ) and mean number of pairwise differences ( $k$ ) calculated from mitochondrial markers were low within each clade (Table II-8). Nucleotide diversity values ranged from 0.77 to 1.44% for COI and from 0.23 to 0.56% for Cyt-b. The Continental clade presented the highest nucleotide diversity (0.0144 for COI and 0.0056 for Cyt-b) and the Indonesian clade yielded the lowest (0.0077 for COI and 0.0023 for Cyt-b). Haplotype diversity values were high, from 0.927 to 0.994 for COI and 0.743 to 0.899 for Cyt-b, except for the Indonesian lineage with a mean value of 0.501 for Cyt-b (Table II-8). The pool of sequences for each clade and for each marker comprised a large number of different haplotypes with few differences among them. No haplotype was shared between groups whereas some were shared by populations within a group. The Indonesian clade was composed of a lesser number of Cyt-b haplotypes with few differences. According to Avise (2000), such pattern of low nucleotide and high haplotype diversity suggests rapid population growth from an ancestral population with small effective size. The time for recovering haplotype variation via mutation is too short for the accumulation of large sequence differences. Thus, recent bottlenecks or foundation effects were likely events. The observation of  $p$  and  $k$  gradients between Indonesia and the Continent indicates either a successive colonization of Borneo from the Continent and then to the Indonesian archipelago, or stronger bottlenecks for Indonesia and Borneo than for the Continent. The mismatch distributions for all lineages were also congruent, with a recent demographic

expansion or bottleneck in accordance with the expected value of Poisson distribution (data not shown).

	COI					Cyt-b				
	N	S	p	h	k	N	S	p	h	k
Borneo	19	21	0.0104	0.994	4.643	17	6	0.0027	0.743	1.338
Continent	42	40	0.0144	0.973	6.415	44	17	0.0056	0.899	2.742
Indonesia	25	23	0.0077	0.927	3.447	27	8	0.0023	0.501	1.123

**Table II-7: mtDNA diversity parameters: number of specimens (N), segregation sites (S), nucleotide diversity (*p*), haplotype diversity (*h*) and mean number of pairwise differences (*k*) for each mitochondrial marker and each lineage.**

### ITS2 ribosomal analysis.

Genetic divergence of the ITS2 sequences was low and equivalent between clades (0.6% to 0.9%) and within clades (0.5% to 0.6%). Seventy polymorphic sites (12.1%) were found containing 11 parsimonious sites (1.9%) and three informative sites. The phylogenetic reconstruction was unresolved due to the lack of informative polymorphism and the presence of different copies within one individual. Therefore, four main types of sequences were designed by taking into account the most informative sites at positions 413, 472 and 537 of the GenBank ITS2 sequence. These types were characterized by the combination of mutations at the three nucleotide positions (Table II-9). Distributions of the types within and between individuals and clades were compared (Table II-9). Types I and II were found in the continental and Indonesian populations. Type I was mainly representative of the Continental group, with 91.6% of the sequenced copies. Much less was present in the Indonesian group (13.6%). Type II had a low frequency on the Continent (8.4%) and represented 36.4% of counted copies in Indonesia. Type III was only present in the Indonesian mosquitoes, where it was the predominant type (50%). Type IV was unique to Borneo, with a deletion in nucleotide position 537 as a genetic signature. This result indicates a significant isolation of the Borneo lineage despite the low number of nucleotide differences. In addition, intragenomic variation was detected within the Continent and Indonesian clades. Intragenomic variation comprised types I and II at 5.7% in the Continent clade and types I and II (20%), types II and III (70%) and types I, II and III (10%) in the Indonesia clade. The presence of types I and II in the Continental and Indonesian populations, as well as intragenomic variation, provides evidence of historic gene flow between these two lineages. The frequency of copies in the two groups was different, indicative of contact in the past. This pattern could indicate an early divergence of populations with a secondary contact and separation.

	Type I : TGC	Type II : CTC	Type III : CGC	Type IV : CT-
Borneo				100 %
Continent	91.6 %	8.4 %		
Indonesia	13.6%	36.4 %	50 %	

**Table II-8 : proportions of the four ITS2 types distributed among clades. The types are characterized by the nucleic acid in positions 413, 472 and 537 of the ITS2 sequence.**

### Separate analyses for cytotyped individuals.

The inclusion of cytotyped individuals from Asahan, Sumatra, in the molecular analysis provided an opportunity to compare the cytogenetic identification of three forms (A,B and C) (Sukowati et al. 1996, 1999) with molecular profiles. However, the small number of specimens (3), as well as difficulty in amplifying the DNA of these individuals, probably due to the poor conservation of DNA, limited the interpretation. Thus, of the three available specimens, only two (forms B and C) yielded Cyt-b and ITS2 sequences. These sequences were treated separately from the main molecular study.

Previous work showed that populations from Lampung (Sumatra), Trat (Thailand) and Phangnga (Thailand) were exclusively form A (Sukowati et al. 1996). The results cited above showed that the Indonesian and Thai populations belong to two different clades. Thus, form A is polyphyletic. Forms B and C were analyzed using Cyt-b. Net genetic distances (*Pnet*) indicated a divergence from the Indonesian group at 0 and 0.2% whereas distances from the Continental and Borneo clades were from 0.9 to 1.6%. Each of these forms is monophyletic and both belong to the Indonesia clade in the MP reconstruction based on Cyt-b. The analysis of ITS2 clones found 100% of type II in form B (4 clones analyzed) and 50% of types I and II in form C (4 clones). The analysis of neither marker confirmed the genetic divergence of forms A, B and C from Indonesia, but did confirm the divergence of form A in Thailand and Indonesia.

## DISCUSSION

**Phylogeographical pattern.** Dusfour et al. (2004b) hypothesized that the divergence and speciation of *An. sondaicus s.s.* and species A was due to vicariant events associated with an increase of sea level between the Continent (species A) and Borneo (*An. sondaicus s.s.*) during the Quaternary. The present study provides further insight into the impact of sea level variations on the current distribution of the members of the *An. sondaicus* complex.

Three lineages were identified herein, one included continental populations and the others island populations. These island lineages are characterized by a lower level of genetic diversity compared to the Continental one. Moreover, a gradient of diversity appeared from north to south, suggesting island colonization from the Continent and/or stronger bottleneck events for islands than for the Continental lineage. The scenario of species complex evolution can be described in three steps.

First of all, the colonization of the Sundaland occurred during the emergence of the shelf from continent to Borneo and Indonesian archipelago. This event is consistent with the migration routes of mammals from India southwards through Java and Borneo during the middle or late Pleistocene, as well as across the Indonesian islands (Tougaard 2001). Subsequently, all three lineages were geographically isolated during the period of high sea level. Finally, this isolation was reinforced by the presence of each lineage in tropical refugia during low sea level period. *An. sondaicus s.l.* is currently linked with tropical climate (Dusfour et al. 2004a). This hypothetical scenario assumed the affects of both island creation and tropical refugia on biogeography and divergence of species (Gorog et al. 2004). In the Sunda shelf region, refugia were identified as tropical climate areas surrounded by arid areas during the glacial period when sea level was low, and especially intensive during the late Pleistocene (Gorog et al. 2004). Refugia were present in northern Sumatra, northern and eastern Borneo, and peninsular Malaysia. Both island and refugia creations resulted in a drastic and cyclical decreases of population size implying a decrease in diversity. The Indonesia and Borneo lineages underwent the two bottleneck processes which implied a strong decrease of diversity. In contrast, the Continent lineage underwent only refugia creation and exhibited a higher level of diversity than both island lineages. The Borneo lineage was restricted to island during the high sea level period and to the refugium during the emergence of Sundaland, separated by a significant distance from other refugia. This isolation allowed, under the genetic drift and bottleneck mechanisms, a stronger distinction of Borneo lineage than for both others as suggested by the unique ITS2 type. In contrast, the proximity of Indonesia and the continent favoured contact between the two hypothetical refugia of these regions during sea level fluctuations allowing hybridization events. The evolutionary rates of mtDNA and ITS2 are considered to be equal 2% and 2.4%, respectively, for *Anopheles* (Sharpe et al. 2000). In the present study, however, ITS2 is less informative than mtDNA. This difference could be explained by the hypothesis of vicariance and refugia events and the intrinsic properties of both DNA markers. Mitochondrial DNA is maternally inherited and non-recombinant. Successive bottlenecks further isolated the lineages by drastically decreasing polymorphism, and no later recombination was possible. ITS2 is biparentally inherited and undergoes recombinations and concerted evolution. Dissimilarity in polymorphism could have been caused by genetic admixture with unequal nuclear and mitochondrial gene flow during coexistence of different mtDNA lineages during the last contact. This would result in relative homogenization of allele frequencies at nuclear loci while retaining the original mtDNA (Garcia-Paris et al. 2003b). This phenomenon would be strongly reinforced by concerted evolution and cyclical bottlenecks, which could erase or modify the ITS2 polymorphism (Gandolfi et al. 2001, Gorog et al. 2004). The strong impact of the most recent bottleneck during the last glacial period (11,000 yr ago) could be observed today as a pattern of recent population expansion based on a low level of diversity within ITS2 sequences, mismatch distributions and both low nucleotidic and high haplotypic diversities of mtDNA sequence.

**Discrepancy between ecological hypothesis, chromosomal investigations and molecular analyses.** Chang Moh Seng (2001) supposed that the ecological patterns reflected the presence of a species complex. However, no differences were detected between freshwater and brackish water populations in Indonesia (Sumatra) and Malaysia (Sarawak) by molecular markers. Moreover, based on published observations on biology, *An. sundaicus s.l.* was suspected to exhibit a large spectrum of saline adaptation (Dusfour et al. 2004a) and not species-dependent preferences for fresh or brackish water.

Combined analysis of forms A, B and C showed an absence of congruence between cytogenetic/allozyme and molecular data. This is not the first time that such incongruences have been noted in *Anopheles* species (Besansky 1999), and this has also been observed in Coleoptera (Clark et al. 2001). The presence of chromosomal inversions correlated with larval habitat salinity within *An. sundaicus s.l.* was noted by (Sukowati et al. 1996, 1999). Chromosome inversions are known to be related to environmental adaptation (White 1973, Coluzzi 1982, Toure et al. 1998b) but are not necessarily linked to speciation (Rieseberg 2001). We could suppose as Besansky (1999) did for *An. funestus*, that the adaptation at a local scale is recent. Chromosome rearrangements indicated this difference but this is not evident from genes that indicate current gene flow. Incongruence between isoenzyme and molecular studies is rarely reported (Clark et al. 2001). As explained above for incongruence between ITS2 and mtDNA, genes could react differently prior to extrinsic events due to their inherent properties. Therefore, isoenzymes could have also been subjected to a differential evolution in correlation to environmental constraints.

**Taxonomic status.** Three distinct lineages of *An. sundaicus s.l.* were identified. Allopatric populations, i.e. those from the Continent (*An. sundaicus* species A) and Borneo (*An. sundaicus s.s.*) described by Dusfour et al. (2004b), were strongly supported by the addition of samples and populations. The presence of a deeper characteristic ITS2 copy confirmed the specific status of *An. sundaicus s.s.* The present study extended the known distributions of both species. *Anopheles sundaicus s.s.* was found in Sabah in addition to Sarawak in northern Borneo, and *An. sundaicus* species A, previously known from southern Vietnam and southwestern Thailand (Dusfour et al. 2004b), was identified in Cambodia and southeastern peninsular Malaysia. The status of the third mtDNA lineage (Indonesia) was slightly different. Based on ITS2 and Cyt-b of mtDNA, this clade was distinct from *An. sundaicus s.s.* and *An. sundaicus* A, i.e. it is a distinct third species based on the phylogenetic species concept (Cracraft 1983). Divergence from a common ancestor of the Indonesian and Continental lineages certainly occurred slightly later than the divergence of *An. sundaicus s.s.* (Borneo), with a time divergence ranging from 450,000 to 750,000 years ago. Consequently, the Indonesian and Continental lineages are more closely related than they are to *An. sundaicus s.s.*. Based on phylogenetic differentiation, comparison with evidence among *Anopheles* species complexes, and recent hybridization revealed by ITS2, the Indonesian and Continental lineages can be characterized as “incipient genetic species”.

Whether the Indonesian lineage corresponds to form C of Sukowati *et al.* (1996, 1999) in Sumatra or form D of Nanda *et al.* (2004) on Nicobar Island of India is uncertain. To avoid confusion, we refer to the Indonesian lineage as *An. sundaicus* species E.

Additional work in peninsular Malaysia and Sumatra is needed to further investigate the distributions and systematics of these two species. Indeed, this is the area, particularly on islands in the Malacca strait, that is most likely to have a zone of sympatry for these species.

### STATUT TAXONOMIQUE

Les reconstructions phylogénétiques des marqueurs mitochondriaux combinés ont montré la présence de deux (Article 2), puis trois clades monophylétiques fortement soutenus (Article 3). Ces clades ont été reconnus en tant qu'espèces, d'un part par les reconstructions mais aussi par l'observation de distances génétiques équivalentes à celles connues entre des espèces d'autres complexes et des divergences intra-clades très faibles. Trois espèces ont pu être ainsi discriminées dans le Complexe Sundaicus : *An. sundaicus* s.s., *An. sundaicus* espèce A et *An. sundaicus* espèce E. *Anopheles sundaicus* s.s. s'est avéré être génétiquement plus éloigné d'*An. sundaicus* espèces A et E que ces deux dernières espèces ne le sont entre elles, par la présence d'un ribotype<sup>1</sup> distinct, caractéristique de cette première espèce. Par contre, *An. sundaicus* espèces A et E ont certains ribotypes en commun. C'est pourquoi, afin de souligner le niveau de différenciation inférieur entre *An. sundaicus* espèces A et E, ces deux espèces définies comme des espèces incipientes.

*An. sundaicus* espèce A vient d'être décrit en tant que *An. epiroticus* (Linton et al. accepté.). Le néotype a été collecté en 1998 au village de Van Duc A, commune de An Trach, District de Gia Rai, province de Bac Lieu au Vietnam.

Le Complexe Sundaicus comprend désormais 3 espèces reconnues par marqueurs moléculaires dont deux décrites :

*An. sundaicus* s.s. (Rodenwaldt)

*An. epiroticus* Linton & Harbach

*An. sundaicus* espèce E

Ces résultats ne sont pas en congruence avec ceux obtenus précédemment par Sukowati et al. (1996, 1999) qui font état de trois formes A, B et C par des techniques de cytogénétique et des analyses isoenzymatiques. La forme A est polyphylétique, alors que les formes B et C appartiennent à la même espèce (*An. sundaicus* espèce E). De même, la première hypothèse d'un complexe d'espèces basé sur des différences écologiques, gîte d'eau saumâtre *versus* eau douce, n'a pas été soutenue par nos résultats.

<sup>1</sup> Type de copie de l'ADN ribosomal

## DISTRIBUTION GENERALE

Une distribution géographique des trois espèces du complexe a été établie par extrapolation de la présence des espèces aux zones côtières reliant les différents sites de cette étude. Ces espèces sont allopatriques et corrélées avec des régions géographiques distinctes.

On sait avec certitude qu'*An. sundaicus* s.s. est présent dans trois sites du nord de Bornéo (Sarawak et Sabah), sur la côte et les îles jusqu'à l'intérieur des terres (site de Miri) où l'eau des gîtes larvaires est douce. Aucune donnée n'est disponible pour le sud de l'île (partie indonésienne) mais la distribution de cette espèce peut être supposée sur les côtes du Kalimantan.

*Anopheles epiroticus* (=espèce A) est présent dans des sites des régions côtières du Cambodge, de la Thaïlande et du Vietnam (en dessous du 11<sup>ème</sup> parallèle) jusqu'à la péninsule malaise. La partie ouest de la péninsule est dépourvue d'*An. epiroticus* à cause du manque de gîte larvaire dû à la construction de digues pour contenir l'entrée d'eau de mer dans les terres. De la même manière que pour *An. sundaicus* s.s., la distribution d'*An. epiroticus* pourrait être étendue au Myanmar (Oo et al. 2004) et, éventuellement aux côtes indiennes. *An. sundaicus* s.l. semble cependant avoir disparue de la côte Est de l'Inde et n'a jamais été reportée sur la côte ouest (Article I).

*Anopheles sundaicus* espèce E est présente en Indonésie, sur les îles de Java et Sumatra. Sur Sumatra, le site de South Tapanuli possède des gîtes larvaires d'eau douce. Les autres îles de l'archipel ainsi que les îles Nicobar et Andaman n'ont pas été prospectées dans ce travail.

*Anopheles sundaicus* forme D décrite par Nanda et al. (2004), est présent sur les îles de l'archipel Nicobar, Inde. Cette forme a été collectée dans des gîtes larvaires d'eau douce et d'eau saumâtre. Sa relation phylogénétique avec les trois espèces décrites au cours notre étude, reste encore à étudier.

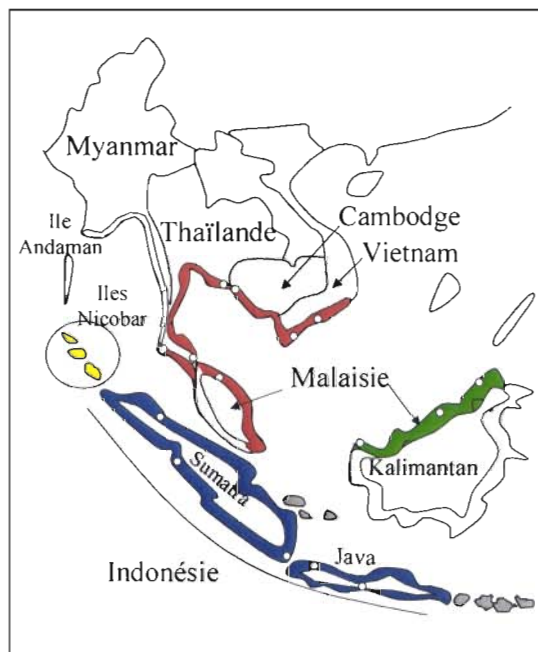


Figure II-9 : carte de la distribution du Complexe Sundaicus avec extrapolation à partir des sites où les espèces sont connues. Vert: *An. sundaicus* s.s.; Rouge: *An. epiroticus*; Bleu: *An. sundaicus* espèce E; Jaune: *An. sundaicus* forme D.

---

## PHYLOGEOGRAPHIE

Les étapes majeures du scénario évolutif du Complexe Sundaicus en Asie du sud-est sont liées aux variations du niveau de la mer lors des cycles glaciaires du Pleistocène (1.8 Ma - 11,000 ans) (Quaternaire). Ce scénario est basé sur trois étapes :

**1. Colonisation de la plaque continentale « Sundaland » émergée lors du niveau bas de la mer.**

La relation étroite entre les anophèles et les mammifères qui sont nécessaires à leur cycle de développement, nous a permis de supposer une probable corrélation entre la migration des grands mammifères et des ancêtres du Complexe Sundaicus.

**2. Isolement des 3 lignées lors de la création des îles lors de la remontée des eaux pendant les périodes interglaciaires.** L'isolement de ces lignées a eu lieu entre 550 000 et 850 000 ans pour les espèces *An. sundaicus* s.s. et *An. epiroticus*, 500 000 et 800 000 ans entre *An. sundaicus* s.s. et *An. sundaicus* E et 450 000 et 750 000 ans entre *An. epiroticus* et *An. sundaicus* E.

**3. Renforcement de la divergence des trois lignées par leur présence dans des refuges tropicaux distincts lors de l'émergence de la plaque.** Ces refuges ont été présents dans le nord et l'est de Bornéo, au niveau de la péninsule malaise et dans l'ouest de Sumatra lors de la période glaciaire lorsque toute la plaque continentale émergée subissait un climat aride.

La lignée présente sur Bornéo a été maintenue isolée des deux autres par la création de l'île lorsque le niveau de la mer était élevé, et par la formation d'un refuge tropical situé au nord-est de Bornéo lors de la période interglaciaire. Les lignées continentale et indonésienne ont aussi subi l'influence des refuges et de l'isolement géographique. Cependant, les variations du niveau de la mer ont vraisemblablement permis le contact des deux lignées par la proximité géographique des deux zones refuges (péninsule malaise et Sumatra).

Les diversités nucléotidiques plus faibles affichées par *An. sundaicus* s.s. et *An. sundaicus* espèce E reflètent une perte de diversité plus forte en Indonésie et sur Bornéo certainement due à deux types de goulot d'étranglement : la création des îles et celle du refuge. *Anopheles epiroticus* sur le continent n'a subi que le goulot d'étranglement dû à la création du refuge et donc une perte de diversité moins drastique.

D'autre part, les trois espèces ont un profil démographique de lignées en expansion ayant subies un récent goulot d'étranglement. Ces indications nous permettent de supposer que c'est la dernière grande période glaciaire, il y a 11 000 ans, qui est à l'origine de la perte drastique de diversité sur les trois lignées.

---

## CONGRUENCE ET INCONGRUENCE DES MARQUEURS

Au cours de cette étude, nous avons utilisé et comparé plusieurs types de marqueurs. L'utilisation des marqueurs mitochondriaux, Cyt-b et COI, a montré que les deux marqueurs combinés augmentent significativement la robustesse des reconstructions phylogénétiques. Le COI est plus polymorphe que le Cyt-b, cependant le nombre de sites parcimonieux et celui de mutations caractéristiques d'espèces, sont plus importants pour le Cyt-b que pour le COI.

Les séquences de l'ITS2 de l'ADN ribosomal (rDNA) se sont montrées peu informatives comparées à celle de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Dans le genre *Anopheles*, la divergence génétique standard est de 2,4% par million d'années pour l'ADNr et de 2% pour l'ADNmt (Sharpe et al. 2000). L'ITS2 devrait donc être plus polymorphe que le COI et/ou le Cyt-b, ce qui n'est pas le cas pour le Complexe Sundaicus. De plus, les espèces *An. epiroticus* et *An. sondaicus* E partagent les mêmes ribotypes et la divergence génétique intra-individuelle est équivalente à celle interspécifique. La présence de variations intragénomiques ne fait pas de l'ITS2 une séquence fiable pour distinguer *An. sondaicus* E d'*An. epiroticus*. Jusqu'à présent cette séquence avait été largement utilisée pour l'identification d'espèces d'autres complexes (Hackett et al. 2000, Van Bortel et al. 2000, Garros et al. 2004b). Cependant, peu d'études comparables d'un complexe dont les espèces ont une répartition insulaire et continentale ont été réalisées. La preuve de variations intragénomiques chez les anophèles, a été faite dans le Groupe *An. farauti* par l'étude des hétéroduplexes puis séquençage (Beebe et al. 2001). La présence de ces variations n'a cependant pas permis de distinguer les espèces identifiées morphologiquement. Le manque d'information de l'ITS2 pour résoudre les relations entre les espèces de complexe n'est pas un cas propre à *An. sondaicus* s.l. En effet, de tels résultats ont déjà été observés chez d'autres insectes et chez les végétaux. Dans le complexe *Simulium damnosum*, la variabilité intragénomique de l'ITS2 est plus élevée que celle entre les espèces jumelles. L'hypothèse avancée dans ce complexe est l'hybridation (Tang 1996). Dans un cadre plus général mais non exhaustif, d'autres fragments de l'ADNr n'ont pas été des marqueurs de choix pour différencier les espèces de chênes (*Quercus petraea* et *Quercus robur*) (Muir et al. 2001) ou pour sept espèces d'écrevisses (Harris and Crandall 2000).

L'hypothèse exposée dans l'Article 3 pour expliquer les différences entre les types de marqueurs chez *An. sondaicus* est liée à une évolution différentielle essentiellement basée sur leurs propriétés intrinsèques.

Premièrement, la propriété de l'ADNr d'avoir une évolution concertée des copies (Buckler et al. 1997) (Encadré II-4), ainsi que l'action des goulots d'étranglement cycliques sont certainement à l'origine de la perte de polymorphisme chez l'ITS2. Contrairement, l'ADNmt qui ne possède pas cette propriété (Simon et al. 1994), a une perte de polymorphisme moins marquée.

#### Encadré II-4: ADNr et évolution concertée

L'ADN ribosomal est une famille multigénique composée d'unités répétées en tandem. Il est positionné sur le chromosome X chez les anophèles. Comme toute famille multigénique, les unités sont soumises à l'évolution concertée. Ce phénomène est en fait l'homogénéisation de chaque unité entre elles. Les mécanismes qui permettent l'évolution concertée des copies sont les "crossing overs" inégaux, la conversion des gènes ou d'autres recombinaisons illégitimes.

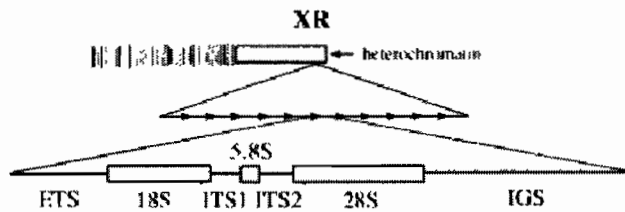


Figure II-10 : structure de l'ADN ribosomal. Chaque copie est composée de trois gènes (18S, 5.8S, 28S) et des régions non codantes l'ETS (External Transcribed Spacer), les ITS1 et 2 (Internal Transcribed Spacer 1 et 2) et l'IGS (Intergenic Spacer).

Deuxièmement, l'ITS2 a fourni des indications précieuses sur l'histoire récente du complexe en mettant en évidence la présence d'hybridations entre *An. epiroticus* et *An. sudaicus* E. Les propriétés, caractéristiques de l'ADN nucléaire, d'héritabilité biparentale et de recombinaison ont rendu possible la mise en place de la variabilité intragénomique lors des hybridations interspécifiques. L'ADNmt reflète la divergence ancestrale (Hendry et al. 2000, Garcia-Paris et al. 2003a). Cette différence peut être due à un flux de gène inégal entre les deux types de marqueurs, expliquée soit par la présence d'une barrière semi-perméable (Harrisson 1990) ou par introgression sélective (della Torre et al. 1997) entre ces deux espèces. Ce phénomène a déjà été évoqué pour les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* (Gentile et al. 2002) où, inversement à *An. sudaicus* s.l., seuls l'ITS2 et l'intron du DIIS6 du gène codant pour le canal sodium montrent une absence de flux de gène.

L'intégration d'individus typés B et C par cytogénétique, ainsi que la connaissance du statut cytogénétique des populations de Phangnga et Trat (Thaïlande), ainsi que de Lampung (Indonésie), nous a permis de mettre en évidence les différences entre nos marqueurs et d'autres marqueurs génétiques. De telles incongruences entre cytogénétique et marqueurs moléculaires ont déjà été observées chez les anophèles (Besansky 1999, Cohuet 2003). Dès 1973, White (1973) a évoqué la relation entre formes chromosomiques et environnement. Cette constatation a été confirmée par la répartition des cytotypes chez l'espèce *An. gambiae* s.s selon des faciès écologiques (Coluzzi 1982, Toure et al. 1998a). De telles observations pourraient expliquer la forte liaison de la forme B à des gîtes d'eau douce, mais ne permet en aucun cas de conclure à un phénomène de spéciation. En effet, le rôle mineur des réarrangements dans la spéciation est largement argumenté. Premièrement, beaucoup de réarrangements ont peu d'effet sur la fertilité (Coyne 1933, Dobzhansky 1933, Sites and Moritz 1987). Les translocations, fusions, fissions et inversions, phénomènes rares, ont un plus grand impact que les inversions paracentriques et péricentriques sur la mise en place de barrière

reproductive post-zygotique, c'est-à-dire la production d'hybride stérile ou non viable. Chez les drosophiles, la baisse de fertilité due aux inversions chromosomiques est d'ailleurs quasiment nulle. Deuxièmement, la fixation des réarrangements pour une espèce est rare (Walsh 1982, Lande 1985). Troisièmement, les différences chromosomiques semblent ne pas composer une barrière aux flux de gènes (Barton 1979, Futuyama and Mayer 1980, Spirito 2000). Enfin, les barrières écologiques ou de reproduction semblent intervenir avant les réarrangements et seraient donc les processus les plus vraisemblables de la spéciation (Coyne and Orr 1998, Schuller 1998, Schemske 2000). Les réarrangements chromosomiques chez *An. sudaicus s.l.* sont des inversions d'hétérochromatine, mais aussi une translocation non réciproque sur le chromosome X pour la forme C. Cependant, aucune différence sur les marqueurs moléculaires n'a pu confirmer la présence d'une espèce «C» distincte. Il est possible que la structuration mise en évidence par les réarrangements chromosomiques et partiellement liée à un profil écologique (eau douce/eau saumâtre), puis confirmée par l'analyse isoenzymatique en Indonésie, soit récente et donc non détectable par les marqueurs moléculaires utilisés (Besansky 1999). L'incongruence ne serait donc qu'apparente tout comme les différences entre l'ITS2 et les marqueurs mitochondriaux. Les isoenzymes ont rarement été incongruent avec des marqueurs moléculaires. Cependant, chez des coléoptères du genre *Diabrotica* (Clark et al. 2001), une incongruence dans les relations phylogénétiques et la reconnaissance des espèces entre ces deux types de marqueurs pour des niveaux inférieurs de la taxonomie a déjà été observée. De plus, il ne faut pas oublier que les isoenzymes sont des isomères d'enzymes qui entrent dans les réactions du métabolisme et qui subissent donc des pressions de sélection. La production de différents isomères, tout comme les inversions chromosomiques, pourrait donc provenir d'une adaptation à l'environnement mais ne romprait pas pour autant les flux de gènes entre les différentes formes comme le suggère l'ADNmt et l'ITS2 en Indonésie. Il faut enfin souligner, que la comparaison entre l'étude isoenzymatique de Sukowati et al. (1999) et la nôtre ne s'est portée que sur des populations indonésiennes dont les individus ont été identifiés par cytogénétique. Cependant, Sukowati et al. (1999) n'ont pas étudié le statut isoenzymatique des populations continentales de Trat et Phangnga (Thaïlande). Ces populations sont considérées comme génétiquement distinctes des populations indonésiennes par marqueurs moléculaires mais Sukowati et al. (1996) la identifient en tant que forme A par cytogénétique. Jusqu'où l'incongruence entre les isoenzymes et marqueurs moléculaires porte-t-elle ?

La confrontation de plusieurs marqueurs et plusieurs types de marqueurs semble donc nécessaire dans les niveaux inférieurs de la taxonomie afin de voir quel est le degré de différenciation des formes ou des espèces étudiées, et ceux afin de conclure sur le statut réel des clades formés.

L'histoire de la région a eu un impact considérable sur l'évolution des espèces et des gènes. La connaissance de cette histoire a permis de mieux comprendre les différences observées aujourd'hui entre les marqueurs ou de soulever des hypothèses susceptibles de répondre à ces questions. L'ajout d'autres marqueurs est donc important pour approfondir les relations entre espèces et le statut d'*An. epiroticus* envers *An. sudaicus* E.

---

## METHODES D'ANALYSES UTILISEES

Nous avons utilisé au cours de la première étude moléculaire sur le Complexe Sundaicus (Article 2) des analyses de génétique basées sur les séquences. Ces analyses de comparaison de distances et de détection de flux de gènes sont communément utilisées pour mettre en évidence structuration et différenciation entre les espèces. Cette approche a montré que les divergences génétiques intraspécifiques étaient largement inférieures à celles interspécifiques (entre *An. sudaicus* s.s. et *An. epiroticus*). De plus, les coefficients de différenciation entre espèces étaient élevés, alors qu'ils étaient faibles entre les populations d'une même espèce (Article 2), et ceux bien que les populations soient allopatriques et les propriétés de l'ADNmt ne permettent l'observation de l'hétérozygotie. Ce résultat associé aux reconstructions phylogénétiques (NJ et MP), a confirmé la présence de deux espèces, l'une en Thaïlande et au Vietnam et l'autre dans le nord de Bornéo, Malaisie. Les méthodes de reconstruction phylogénétique ont été utilisées pour mettre en évidence une troisième espèce (Article 3). Les trois méthodes (MP, ML et analyse bayésienne) se sont montrées équivalentes dans la mise en évidence des trois clades. Parmi les analyses conventionnelles, l'analyse en ML est la plus robuste. La méthode bayésienne, quant à elle, a montré des probabilités *a posteriori* très élevées mais il est connu que cette méthode surestime la robustesse des clades (Suzuki et al. 2002, Douady et al. 2003). Cette reconstruction reste congruente en terme de monophylie des trois clades. Cependant, le nœud basal, qui renseignerait sur les relations entre les trois groupes, reste non résolu pour chacune des reconstructions. Afin de comparer les différentes possibilités dans les relations entre ces trois groupes, les topologies ont été testées avec le test de Shimodaira-Hasegawa et de Wilcoxon test rank pour respectivement la ML et la MP. Toutes les topologies testées sont équivalentes, quelque soit les groupes formés ou la polytomie. Quatre hypothèses peuvent être avancées :

**Hypothèse 1:** une conséquence de l'incongruence des marqueurs. Le test ILD donne un résultat  $p=0.03$  proche du seuil 0.05 au-dessus duquel la congruence des marqueurs est acceptée. Le test ILD est le plus utilisé pour tester l'incongruence. Cependant, la robustesse des trois clades a été augmentée en combinant les deux marqueurs, Cyt-b et COI. De plus, ces deux marqueurs n'ont pas le même taux d'évolution et donc un nombre de sites non informatifs différents entre les deux marqueurs. Les « bruits de fond » créés par ces sites non informatifs pour chacun des marqueurs, peuvent créer une perturbation du signal phylogénétique qui entraîne l'acceptation de l'incongruence des marqueurs. (Dolphin et al. 2000, Darlu and Lecointre 2002).

**Hypothèse 2:** le choix de l'« outgroup » n'a pas été judicieux. En effet, le choix de l'« outgroup » est un choix délicat à faire (Morrison 1996). Nous avons choisi deux « outgroups » l'un dans la même série qu'*An. sudaicus* s.l., *An. gambiae* s.s., et l'autre dans le même sous-genre, *An. minimus*

A. L'utilisation d'un « outgroup » génétiquement trop éloigné implique une augmentation de la saturation et une perte du signal phylogénétique (Lopez et al. 2002).

**Hypothèse 3** : un manque d'informativité et/ou un « bruit de fond » créé par le jeu de données, peut induire des difficultés pour la reconstruction robuste des phylogénies (Lopez et al. 2002).

**Hypothèse 4** : la concomitance de la divergence des trois espèces. Cette hypothèse a été supposée à la suite du résultat précédent dans lequel la polytomie augmentait la robustesse de la reconstruction. Elle a été soutenue par les phénomènes qui ont entraîné la spéciation et supporterait la polytomie de l'arbre. En effet, un isolement quasi concomitant des trois groupes est en corrélation avec la montée des eaux lors d'une période interglaciaire.

Les deux premières hypothèses sont difficilement testables. En effet, le test ILD est le plus répandu et plus facilement utilisable. D'autres analyses testent la topologie ou les données mais leur algorithme n'était pas disponible. Pour tester la seconde hypothèse, nous avons utilisé *An. subpictus* en tant qu' « outgroup » (résultats non montrés). Cette espèce est très proche d'*An. sundaicus* s.l. (Anthony et al. 1999). Les résultats obtenus en terme de robustesse et de résolution du nœud basal n'ont pas été améliorés. Par contre, le résultat de la reconstruction d'un arbre non enraciné a généré l'augmentation des valeurs de bootstrap. Les deux dernières hypothèses semblent donc les plus recevables. L'augmentation de la longueur des fragments des marqueurs utilisés ou de l'ajout d'un nouveau marqueur à l'analyse permettra de confirmer l'une ou l'autre des deux dernières hypothèses.

## **PARTIE III • METHODES D'IDENTIFICATION**

L'identification rapide des espèces est toujours passée par la recherche de différences morphologiques, immédiatement identifiables, de l'anophèle femelle. Cependant, les différences morphologiques discriminantes au niveau des espèces d'un complexe sont rares voire absentes. Au-delà des caractères morphologiques, les connaissances sur l'écologie peuvent aussi donner des caractères discriminants aidant à l'identification des espèces i.e. Complexe Gambiae, Complexe Maculipennis (Mouchet et al. 2004).

Avec l'avènement de la génétique, d'autres techniques, telles que la cytogénétique, les sondes nucléiques ou des approches isoenzymatiques, ont été utilisées pour mettre à jour de nouvelles espèces et les identifier. Cependant, ces techniques sont difficiles à mettre en œuvre et demandent du matériel vivant ou congelé, à des stades précis. Le développement de l'amplification de fragments spécifiques d'ADN par PCR a permis de mettre plus facilement en place des techniques d'identification fiables, rapides et pouvant utiliser des moustiques séchés. Deux types majeurs de techniques sont aujourd'hui utilisés chez les espèces d'anophèles : la PCR multiplexe allèle-spécifique et la PCR-RFLP<sup>1</sup> (Scott et al. 1993, Van Bortel et al. 1999, Walton et al. 1999, Garros et al. 2004b, Garros et al. 2004c). La PCR allèle spécifique est basée sur la définition d'amorces dans des zones où une ou plusieurs mutations sont fixées pour l'espèce concernée. Les fragments sont de tailles différentes, spécifiques d'espèce et facilement visualisable sur gel d'agarose. La réalisation d'une PCR multiplexe permet de combiner plusieurs amorces spécifiques dans un seul mélange réactionnel et donc de déterminer le statut du moustique en une seule réaction. La PCR-RFLP est basée sur deux réactions : l'amplification puis la restriction par des enzymes des gènes ou régions de l'ADN connus. Les sites d'action de l'enzyme se trouvant sur des mutations fixées pour chacune des espèces, les profils de restriction sont caractéristiques.

*Anopheles sundaicus* s.l. est connu comme un complexe d'espèces jumelles, mais aucune comparaison morphologique entre les formes cytogénétiques ou moléculaires n'a encore été publiée. La recherche de caractères discriminants facilement utilisables pour l'identification n'a donc jusque là jamais été faite. D'autre part, une première méthode d'identification par PCR d'*An. sundaicus* s.s. et *An. epiroticus* avait été développée (Article 2), mais celle-ci demande à être améliorée face à la discrimination d'une troisième espèce (Article 3).

Le but de cette troisième partie est de mettre en place des outils d'identification des trois espèces du Complexe Sundaicus. Premièrement, une comparaison morphologique a été faite afin de détecter les éventuelles différences entre espèces. Deuxièmement, une méthode d'identification moléculaire rapide et fiable, a été développée. L'objectif final est d'utiliser ces outils d'identification afin d'affiner la distribution et de définir les capacités de transmission vectorielle, la biologie et l'écologie de chacune des trois espèces du complexe.

---

<sup>1</sup> PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

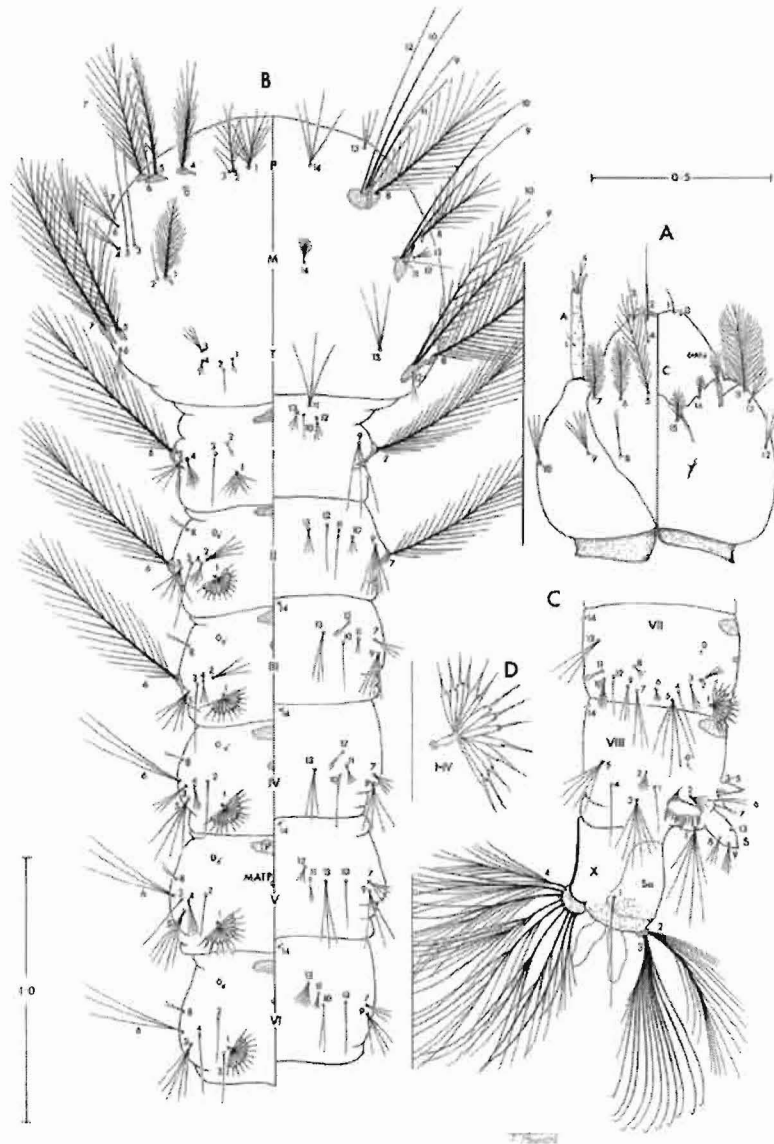
CHAPITRE 1 • IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE D'*AN. SUNDAICUS* S.L.

L'identification de chacun des stades de développement d'*An. sundaicus* s.l. passe par l'observation des différences morphologiques. Les clés d'identification les plus couramment utilisées sont celles de Reid (1968) et de l'IMPE (1987). Une des clés de l'identification d'*An. sundaicus* s.l. au sein de la série *Pyretophorus* est décrite ci-dessous, d'après Linton et al. (2001a), pour chacun des stades de développement (Annexe 1).

**L'ADULTE** se distingue des autres membres de la série présents dans la région orientale par des pattes tachetées (distinction d'*An. indefinitus*, *An. subpictus* et *An. vagus*), la tâche sombre subapicale des palpes maxillaires est égale ou supérieure à la moitié de la longueur de la bande pâle apicale (distinction d'*An. indefinitus*, *An. limosus* et *An. vagus*), l'aire préhumérale de la costa est faite d'écailles sombres (distinction d'*An. limosus*, *An. litoralis*, *An. ludlowae* et *An. parangensis*) (Figure III-3).

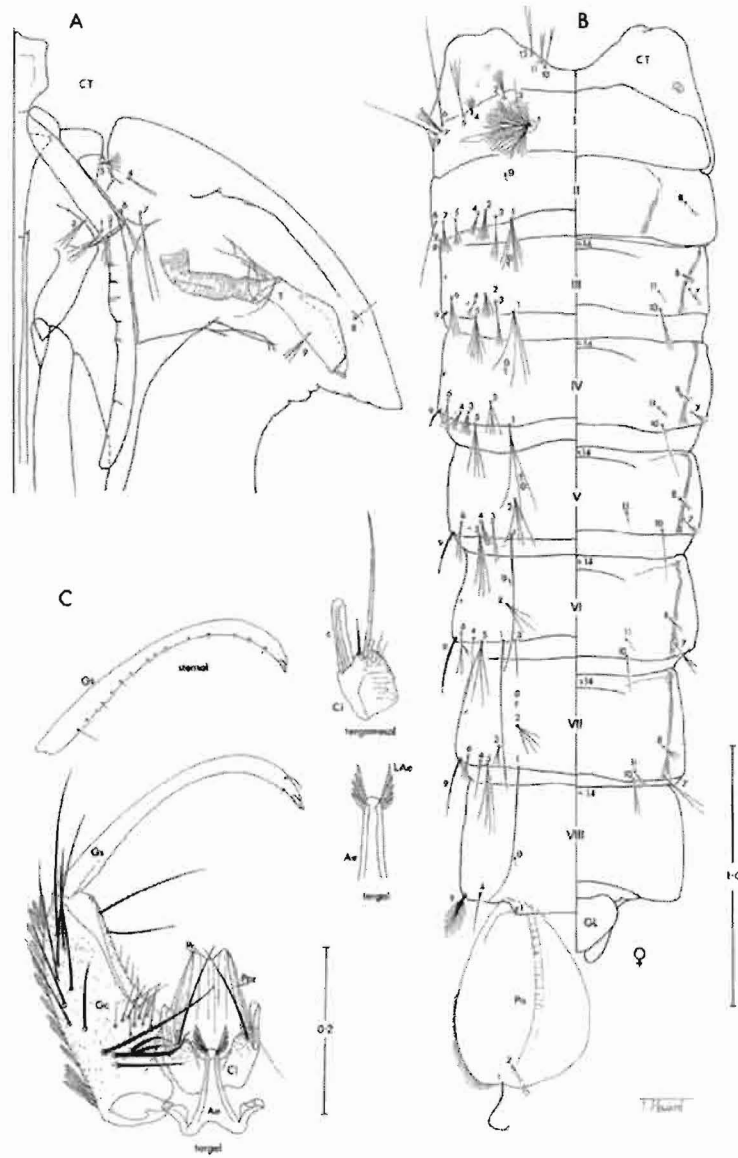
**LA LARVE** est plus facilement identifiable que la pupe. La soie 3-C est égale ou supérieure à la moitié de la longueur de la soie 2-C (distinction d'*An. limosus* et *An. vagus*), les soies 9, 10, 12-P, M ont une ramification simple (distinction d'*An. parangensis*). Les soies 6-IV-VI sont ramifiées à la base (distinction d'*An. ludlowae*). La soie 3-C est inférieure au  $\frac{3}{4}$  de la soie 2-C et la soie 1-P a communément plus de 8 branches (distinction d'*An. litoralis*). La soie 4-M est ramifiée (normalement 3 ramifications) à partir de la base (distinction d'*An. subpictus* et *An. indefinitus*) (Figure III-1).

**LA PUPE** a la soie 6-IV ramifiée (distinction d'*An. litoralis*, *An. ludlowae* et *An. vagus*), les spicules marginales de la palette natatoire ont des crochets (distinction d'*An. litoralis*, *An. limosus* et *An. vagus*), l'index réfractile de la palette natatoire ne dépasse pas 0.75 mm (distinction d'*An. ludlowae* et *An. subpictus*), la soie 1-P mesure moins des  $\frac{2}{3}$  de la palette natatoire (distinction d'*An. parangensis*). La pupe d'*An. sundaicus* est indifférenciable de celle d'*An. indefinitus* (Reid, 1968) (Figure III-2).



© 2001 Blackwell Science Ltd, *Systematic Entomology*, 26, 357–366

Figure III-1: schéma de la larve de quatrième stade, A: tête, B: thorax et abdomen C: Segment VII, VIII et X d'*An. sundanicus* s.s., D: soie 1-IV (d'après Linton et al. 2001)



© 2001 Blackwell Science Ltd, *Systematic Entomology*, 26, 357-366

Figure III-2 : schéma de la puppe (A et B) et du génitalia (C) de la larve mâle d'*An. sundaicus* s.s. (d'après Linton et al. 2001)

## CHAPITRE 2 • MISE AU POINT DE METHODES D'IDENTIFICATION

---

**COMPARAISON MORPHOLOGIQUE DES 3 ESPECES**

La comparaison morphologique présentée dans ce chapitre fera l'objet d'une publication dans le cadre de la description d'*Anopheles epiroticus* : Linton Y.-M., Dufour I. et al. *Anopheles (Cellia) epiroticus*, a new malaria vector species in the Southeast Asian Sundaicus Complex . **Submitted to Bull Entomol Res.**

Les différences morphologiques discriminantes au niveau des espèces d'un complexe sont rares voire absentes. L'adulte possède une grande variabilité intraspécifique notamment au niveau des ailes (Coluzzi 1964, Reinert et al. 1997), mais des caractères uniques discriminants ne sont pas toujours fixés entre les espèces des complexes (Antonio-Nkondjio et al. 2002).

Dans le Complexe Quadrimaculatus, c'est la combinaison de caractères qui permet l'identification des espèces du complexe à tous les stades du développement (Reinert et al. 1997). Dans le Complexe Minimus, *An. minimus A* présente un spot pâle au niveau présectoriel de la costa de l'aile et *An. minimus C* possède un spot pâle au niveau présectoriel et un au niveau huméral (Sucharit et al. 1988, Green et al. 1990). Cependant, ce caractère est aujourd'hui remis en cause par sa comparaison avec des méthodes d'identification moléculaire plus fiables (Garros & Harbach comm. pers.).

*An. bwambae* ne se distingue des autres membres du Complexe Gambiae que par une plus grande taille de bande pâle apicale sur le palpe et une tâche noire sub-apicale plus étroite (White 1985). Coluzzi (1964) a montré que chez le Complexe Gambiae, le nombre de sensilles coeloconiques de l'antenne adulte, le ratio des palpes et la forme des œufs sont discriminants pour *An. melas*, *An. merus* et *An. gambiae*. Le nombre de sensilles coeloconiques permet aussi de distinguer *An. gambiae s.s.* d'*An. arabiensis* en Afrique de l'Est, alors que se sont les branches de la soie n°1 prothoracique de la larve qui les distinguent en Afrique de l'Ouest.

Ces exemples illustrent la multitude de caractères et sommes de caractères pouvant discriminer des espèces de complexe chez les anophèles. Cette diversité est encore plus importante lorsque pour un couple d'espèces, le caractère discriminant est différent selon la localité (*An. gambiae* et *An. arabiensis*).

L'approche morphologique sur les complexes d'espèces demande donc le criblage d'un grand nombre de caractères afin de trouver le ou les caractères qui ont le plus grand pouvoir discriminant. Dans le cas d'*An. sundaicus*, des études morphologiques menées sur des populations en Malaisie (Reid 1968) essentiellement sur la taille des spots alaires et la comparaison des palpes maxillaires sur des populations des îles Andaman (Nagpal and Sharma 1983) ont montré l'existence d'un polymorphisme intra-populationnel et inter-populationnel.

L'analyse morphologique des trois espèces identifiées dans la partie précédente a pour but de mettre en évidence les caractères discriminants pour la distinction des espèces. La méthodologie est basée sur la comparaison des caractères morphologiques d'*An. epiroticus* et *An. sundaicus* espèce E aux caractères précédemment décrits pour *An. sundaicus* s.s. aux trois stades, larve de 4<sup>ème</sup> stade, pupes et adulte (Linton et al. 2001a). Le placement des soies pour la pupes et la larve chez *An. sundaicus* s.s. et *An. epiroticus* s'est révélé identique (R.E. Harbach comm. pers.). L'examen s'est porté alors sur la chaetotaxie des stades immatures, en particulier sur le nombre de branches à chaque soie. La comparaison de l'adulte a surtout été focalisée sur la comparaison des ailes.

## MATERIEL ET METHODES

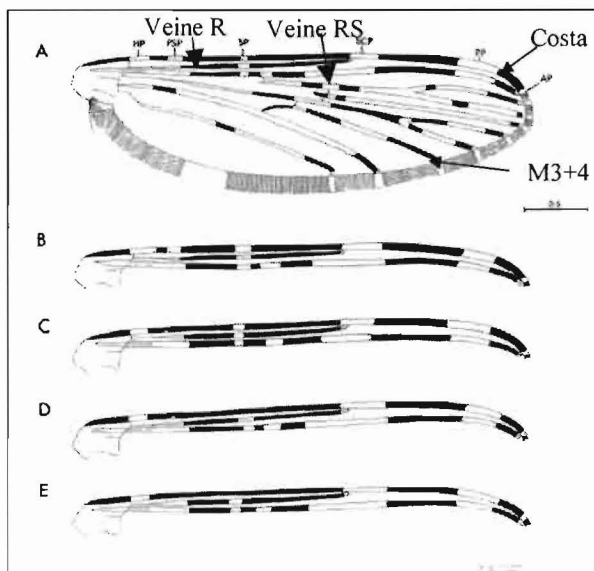
**Collection de moustiques.** Les spécimens d'*An. sundaicus* s.s. analysés morphologiquement ont été collectés à Pandan beach, Lundu, Sarawak, Malaysia (Linton et al. 2001a) et constituent les paranéotypes d'*An. sundaicus* s.s. Les spécimens d'*An. epiroticus* proviennent de la province de Bac Lieu, sud Vietnam et sont les paranéotypes d'*An. epiroticus*. Les spécimens d'*An. sundaicus* espèce E proviennent de la même femelle que les individus reconnus comme appartenant à cette espèce par analyse moléculaire, et collectés dans les provinces d'Asahan et de South Tapanuli, Indonésie. Ces individus ont été identifiés au préalable comme *An. sundaicus* s.l. par les clés décrites par l'IMPE (1987) et Reid (1968). La liste des individus et leur provenance sont données dans la Table III-1.

**Caractères observés.** Sur la base des caractères décrits pour *An. sundaicus* s.s. (Annexe 1) puis pour *An. epiroticus* (Article 4), 89 et 160 soies ont respectivement été observées et décrites sur les pupes et les larves ou leurs exuvies. Les soies 0 II-VIII, 12CT, 14III-VIII des pupes et 0C, II-VIII, 14C, P, M et 15 C des larves n'ont pas été observées. Quatre-vingt-neuf caractères ont été comparés chez les femelles. Cinq femelles par espèce ont été entièrement comparées, puis les ailes de 7 adultes supplémentaires (Figure III-3) ont été analysées. Le **ratio du palpe** (taille du spot pâle apical / (taille du spot noir + taille du spot pâle apical)) a été calculé. Le type d'aile a été identifié en comparaison de ceux observés par Linton et al. (2001a). De plus, le **Ratio costal** a été calculé comme suit (taille de la tâche noire subcostale / (taille de la tâche subcostale pâle + tâche subcostale noire + tâche pâle préapicale)) en accord avec la description donnée par Reid (1968). Enfin, le **Ratio M3+4** a été évalué en tant que (taille de la tâche pâle apicale de la veine M3+4/ (taille tâche pâle apicale + tâche noire apicale)), car les premiers résultats obtenus semblaient discriminer *An. sundaicus* s.s. et *An. epiroticus*.

**Analyses.** Une comparaison manuelle des caractères a tout d'abord été réalisée puis, afin d'avoir une vision globale des individus, une Analyse en Coordonnées Principales (ACP) a été faite sur les caractères obtenus pour les pupes et les larves. L'ACP consiste à exprimer un ensemble de variables quantitatives, ici le nombre de branches par soie, en un ensemble de combinaisons linéaires de facteurs non corrélés entre eux, ces facteurs rendant compte d'une fraction de plus en plus faible de la variabilité des données. Cette méthode permet de représenter les données originelles (individus et variables) dans un espace de dimension inférieure à l'espace original, tout en limitant au maximum

Espèces	Stade (nombre)	Numéro de spécimens	Provenance	Année de collecte
<i>An. sudaicus</i> s.s.	Larve (n=10)	MA80-7, MA90-6, MA94-3a, MA102-51, MA102-47, MA79-1, MA102-46, MA94-4, MA103-32, MA103-24	Pandan Beach Lundu, Sarawak, Malaysia	1999
	Pupe (n=10)	MA94-8, MA91-1, MA92-7, MA71-1, MA103-32, MA73-3, MA80-10, MA81-9, MA102-52, MA90-2		
	Adulte (n=12)	MA103-23, MA103-25, MA79-1, MA102-21, MA80-7 (Entier) MA103-32, MA92-3, MA81-8, MA74-14, MA70-3, MA90-2, MA80-10 (ailes)		
<i>An. epiroticus</i>	Larve (n=10)	DP29-30, DP28-22, DP30-2, DP31-1, DP34-9, DP34-1, DP24-5, DP26-4, DP35-10, dp22-9	An Trach, province de Bac Lieu, Vietnam	1998
	Pupe (n=1)	DP34-9, DP35-10, DP35-8, DP29-36, DP30-30, DP31-10, DP32-6, DP28-20, DP29-32, DP30-12		
	Adulte (n=12)	DP34-9, DP35-10, DP35-8, DP29-36, DP29-23, DP29-24 (Entier) DP31-11(mâle), DP32-10, DP34-6, DP28-1, DP29-10, DP32-8, DP33-10 (Ailes)		
<i>An. sudaicus</i> E	Larve (n=9)	IN37-17, IN37-18, IN31-12, IN36-16, IN31-13 (ST) IN92-29, IN73-23, IN71-34, IN71-13 (AS)	South Tapanuli Indonesia (ST) Asahan, Indonesia (AS)	2001
	Pupe (n=10)	IN37-17, IN36-10, IN37-8, IN31-17, IN36-17 (ST) IN92-13, IN73-38, IN71-17, IN92-15, IN73-18 (AS)		
	Adulte (n=12)	IN37-8, IN31-14 (ST, entier) IN73-5, IN71-42, IN92-9 (AS, entier) IN37-9, IN31-8, IN31-13 (ST, aile) IN73-7, IN92-30, IN71-11, IN92-26 (AS, aile)		

**Table III-1 : liste et nombre (n) de spécimens étudiés par espèce et par stade, lieu et année de collection.**



**Figure III-3 : types d'ailes observés chez *An. sudaicus* s.s., schéma d'après Linton et al. (2001a). AP= spot pâle apical, HP = spot pâle humeral; PP = spot pâle préapical; PSP = spot pâle présectoriel; SCP = spot pâle subcostal; SP = spot pâle sectoriel.**

la perte d'information. La représentation des données dans des espaces de faible dimension en facilite considérablement l'analyse. L'ACP a été réalisée en utilisant le programme XLSTAT (Addinsoft) exécuté sous Excel. Les variables ayant un nombre constant de soies, ont été enlevées de l'analyse comme le demande l'algorithme. Les individus ont été positionnés dans un graphe à deux dimensions. Les coordonnées des individus ont été calculées avec toutes les variables et représentées dans un graphe où les dimensions sont les deux premiers facteurs de l'analyse (F1 et F2). Ces facteurs expriment la plus grande variabilité des données. Enfin, une comparaison de moyenne, faite dans Excel par le test de Student bilatéral au seuil 0,05, a été effectuée pour comparer les ratios des palpes, de la costa et de la veine M3+4.

Le but d'une telle analyse est de pouvoir identifier un ensemble de caractères discriminants ou différentiels.

## RÉSULTATS

**Larves.** L'analyse de vingt-neuf spécimens (9-10 individus par espèce) (Table III-1) et de 130 caractères n'a pas pu révéler un ou des caractères spécifiquement discriminants. Un total de 30 caractères était constant pour les trois espèces. Les deux premiers et meilleurs facteurs de l'ACP, représentaient 8 et 9% de la variance totale de ces données (Figure III-4). Ce faible pourcentage était le reflet de la faible différenciation morphologique entre les individus et les espèces. De plus, les facteurs ne sont pas fortement expliqués par une ou quelques variables, i.e. l'axe F1 est représenté à 72% par 30 variables avec des valeurs entre 1 et 5,375%. Ce qui confirme l'absence d'un caractère unique ou de la combinaison d'un faible nombre de caractères discriminants et utilisables pour l'identification. On observe cependant que les individus appartenant à une même espèce sont plus proches entre eux qu'avec ceux des autres espèces. Les individus des populations d'*An. epiroticus* et d'*An. sundaicus* s.s. proviennent d'une population par espèce (Table III-1). Les spécimens d'*An. sundaicus* E proviennent de deux populations de sites distincts de collection. Ce regroupement d'individus montre une tendance à trois groupes qui, cependant, se recoupent. L'ajout de populations est nécessaire pour confirmer que l'ensemble des caractères morphologiques tend à regrouper les individus selon leur espèce.

**Pupes.** Comme pour les larves, l'analyse de trente spécimens (10 par espèce) (Table III-1) sur 73 caractères polymorphes n'a pas pu révéler de caractères spécifiquement discriminants. Un total de 16 caractères était constant. Les deux premiers facteurs représentaient 10 et 9% de la variance totale de ces données (Figure III-5). Le même constat que pour les larves peut être fait : aucune différenciation n'est faite mais les individus de même espèce sont plus proches, aucune variable ou combinaison de variables n'explique fortement les axes. Les conclusions sont donc les mêmes que pour l'analyse des larves et, de même, l'ajout de populations serait nécessaire pour renforcer l'analyse.

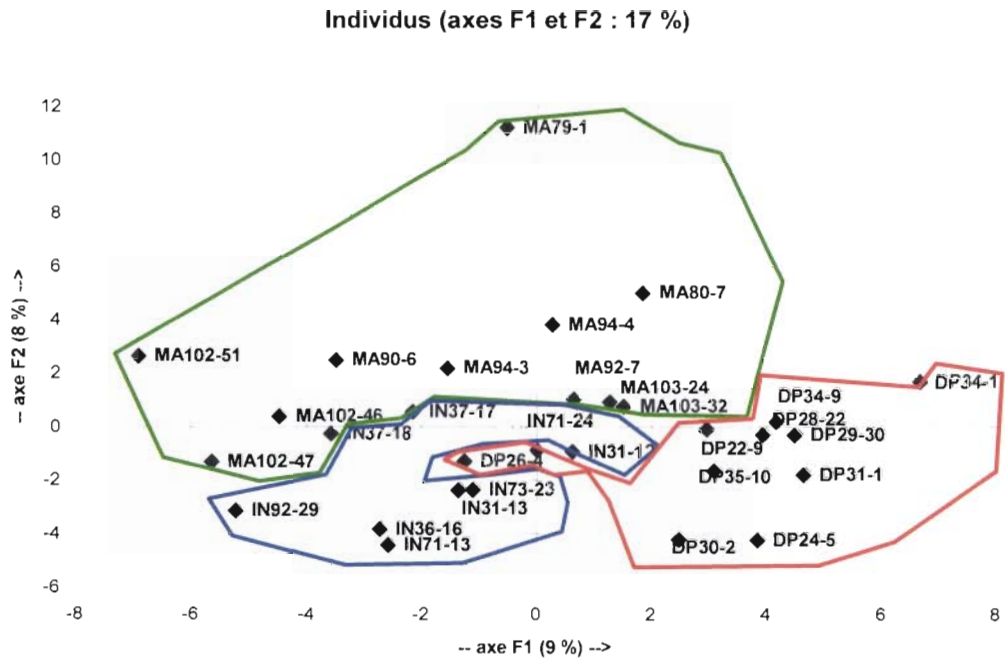


Figure III-4 : résultats de l'Analyses en Coordonnées Principales (ACP) sur les caractères observés pour les larves. Représentation des axes F1 et F2. *An. sudaicus* s.s. est représenté en vert, *An. epiroticus* en rouge et *An. sudaicus* espèce E en bleu.

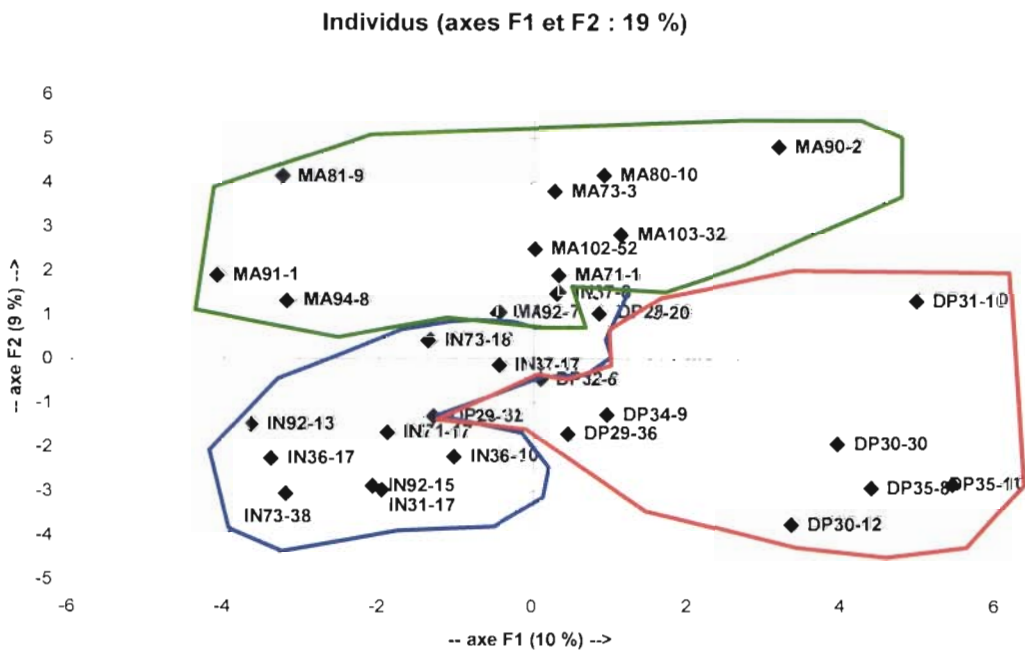


Figure III-5 : résultats de l'ACP sur les caractères observés pour les pupes. Représentation des axes F1 et F2. *An. sudaicus* s.s. est représenté en vert, *An. epiroticus* en rouge et *An. sudaicus* espèce E en bleu.

**Adultes.** Sur la totalité des caractères, seuls ceux des ailes se sont avérés variables. Le ratio des palpes (Table III-2) varie de 0,59 à 0,66 chez *An. sudaicus s.s.*, de 0,60 à 0,80 pour *An. epiroticus*, et de 0,33 à 0,76 pour *An. sudaicus E*. Les moyennes sont significativement différentes mais les intervalles présentés ici sont chevauchants (Table III-2 et Table III-3). Linton et al. (2001a) ont décrit cinq types de profils alaires pour *An. sudaicus s.s.* sur la base de la costa et de la veine R (Figure III-3). Sur les 12 adultes observés chez *An. sudaicus s.s.*, quatre profils A, six B et deux D ont été retrouvés sur les cinq types de profils alaires observés par Linton et al. (2001a). Pour les 12 adultes observés chez *An. epiroticus* (dont 1 mâle), quatre profils A sont présents et 8 profils B. Les 12 individus identifiés *An. sudaicus E* présentent deux types A, sept types B, un type C et deux types D. Quelle que soit l'espèce, la variabilité intraspécifique des spots alaires est importante du fait de la présence ou de l'absence de certains spots, mais aussi par la taille de ceux-ci. Ces variations sont localisées sur la costa et les veines R, RS, mais aussi sur les autres veines de l'aile. Les ratios calculés pour les ailes ont des moyennes équivalentes ou significativement différentes selon les espèces comparées (Table III-2 et III-3). Les moyennes du ratio de la costa sont significativement différentes entre *An. sudaicus E* et *An. sudaicus s.s.* et entre *An. sudaicus E* et *An. epiroticus*. Elles sont aussi significativement différentes entre *An. sudaicus s.s.* et *An. epiroticus* ainsi qu'entre *An. sudaicus E* et *An. epiroticus*. Cependant, tout comme pour les ratios des palpes, les intervalles de valeurs sont chevauchants pour les trois espèces (Table III-2 et III-3).

Espèces	Ratio palpe maxillaire	Ratio costal	Ratio M3+4
<i>An. sudaicus s.s.</i>	Min 0,59 Max 0,66 Moy 0,62 Ecart Type 0,03	Min 0,33 Max 0,56 Moy 0,45 Ecart Type 0,05	Min 0,20 Max 0,66 Moy 0,49 Ecart Type 0,15
<i>An. epiroticus</i>	Min 0,66 Max 0,75 Moy 0,69 Ecart Type 0,06	Min 0,32 Max 0,5 Moy 0,43 Ecart Type 0,05	Min 0,51 Max 0,66 Moy 0,62 Ecart Type 0,05
<i>An. sudaicus E</i>	Min 0,33 Max 0,76 Moy 0,54 Ecart Type 0,11	Min 0,43 Max 0,60 Moy 0,53 Ecart Type 0,04	Min 0,00 Max 0,62 Moy 0,42 Ecart Type 0,18

**Table III-2 : valeurs de minima, maxima, moyennes et écart-types calculés pour chaque espèce.**

	<i>An. sudaicus s.s.</i>	<i>An. epiroticus</i>
<i>An. epiroticus</i>	Pa=0,037* C=0,39 M=0,017*	
<i>An. sudaicus E</i>	Pa=0,048* C=0,000* M=0,312	Pa=0,003* C=0,008* M=0,004*

**Table III-3 : probabilités résultantes de la comparaison des moyennes des ratios entre deux espèces. Pa pour les palpes maxillaires, C pour celui de la costa et M pour le ratio de la veine M3+4. Les valeurs avec une étoile sont significatives. Les moyennes des espèces pour lesquelles cette valeur a été trouvée sont donc différentes.**

## **CONCLUSIONS**

Aucun caractère ou combinaison de caractères observés n'est radicalement discriminant entre les espèces. En fait, la combinaison de tous les caractères laisse à penser que les individus appartenant à chacune des trois espèces tendent à être morphologiquement plus proches entre eux. Cependant, le chevauchement des intervalles ne permet pas de distinguer à 100% les espèces et ceux pour chacun des stades. Les moyennes des ratios pour les trois espèces sont significativement différentes, mais les intervalles de valeurs sont chevauchants. Nous avons focalisé cette étude sur des caractères facilement observables de l'adulte et des stades immatures. Cette comparaison pourrait être complétée par l'observation de caractères, tels que le génitalia des mâles et la forme des œufs déjà utilisée pour les Complexes *Gambiae* (Coluzzi 1964) et *Maculipennis* (Missiroli et al. 1933).

---

#### ARTICLE 4 - PCR ALLELE SPECIFIQUE POUR IDENTIFIER LES MEMBRES DU COMPLEXE SUNDAICUS

**Dusfour I. et al.** Allele-specific PCR assay for identifying members of the *Anopheles sundaicus* complex, malaria vector in Southeast Asia. **To be submitted in Am J Mosq Control Assoc**

*Anopheles* mosquitoes of the *Cellia* subgenus are responsible for human malaria transmission in tropical area of the Old World. Most of the important malaria vectors on Southeast Asia are members of complexes in which species are morphologically closed or indistinguishable. The difficulties in the identification of sibling species stimulated the development of molecular tools (Scott et al. 1993, Collins and Paskewitz 1996, Favia et al. 1997, Sharpe et al. 1999, Walton et al. 1999, Kengne et al. 2001, Fettene et al. 2002, Koekemoer et al. 2002, Manguin et al. 2002, Kengne et al. 2003, Garros et al. 2004b) for precisely and reliably determining members of complexes. Among major vectors in Southeast Asia, *An. sundaicus* Rodenwaldt, occurs on coastal areas and Islands (Dusfour et al. 2004a). It is considered as either a major vector or a secondary vector of malaria depending on region and country (Schaefer and Kirnowardoyo 1983, Meek 1995). Regarded as a secondary vector in Thailand in the past (Gould et al. 1966, Harinasuta et al. 1974), it is now considered as a potential major vector because of its occurrence near touristic sites (Chowanadisai et al. 1989). In contrast, it is known as the main vector in coastal areas of India (Rao 1984), Vietnam (Nguyen Tang Am et al. 1993) and Indonesia (Soeparmo and Lair 1954, Miyagi et al. 1994). Moreover, Kirnowardoyo and Yoga (1987) noticed that malaria transmission at Chilacap on Java, mainly due to *An. sundaicus*, fluctuated widely, not only from year to year, but also from locality to locality during the same year. Thus, the wide geographical distribution, ecological and behavioural diversity of *An. sundaicus* s.l. suggested the presence of a species complex (Chang Moh Seng et al. 2001). Since the type described by Rodenwaldt did not exist (Bonne-Webster and Swellengrebel 1953, Reid 1968), the identity of *An. sundaicus* s.s. was fixed recently by a neotype designated from material collected at Pandan Beach, Lundu District in the Province of Sarawak on Malaysian Borneo (Linton et al. 2001a). Consecutive studies based on cytogenetics and isozymes showed the presence of three distinct forms (A, B and C) in Indonesia and Thailand (Sukowati et al. 1996, 1999). A fourth cytotype, D, was recently identified on the Andaman Islands (Nanda et al. 2004). However, these species were not confirmed by our molecular work based on partial mitochondrial DNA markers: Cytochrome Oxydase I (COI) and Cytochrome b (Cyt-b) (Dusfour et al. 2004b, 2005) and a ribosomal marker (rDNA), the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) (Dusfour et al. 2005). Our studies discriminated a total of three genetic species distributed (1) in Northern Borneo with *An. sundaicus* s.s. which includes freshwater and brackish water populations, (2) on the continent with *An. sundaicus* species A that occurs from Thailand, Cambodia, southern Vietnam down to peninsular Malaysia and characterized by brackish water populations only, and (3) in Indonesia with *An. sundaicus* species E also including fresh and brackish water population. Recently, the species A

occurring on the continent was described and named *An. epiroticus* (Linton et al. in prep.). Few recent studies have been done on *An. sundaicus s.l.* and no specific data are yet available on each distinct species. Moreover, the respective distribution of each species is still uncomplete. A first PCR method was developed based on the recognition of SCAR (Sequence Characteristic Amplified Region) from RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) study (Dusfour et al. 2004b). *Anopheles sundaicus s.s.* and *An. epiroticus* were thus differentiated through this PCR. The recent discrimination of a third species, *An. sundaicus* species E, implied the development of an improved PCR method.

The aim of the present study was to develop a simple and reliable molecular method of identification. The method was based on mtDNA fixed mutations specific of each of the three species described by Dusfour et al. (2004b, 2005).

## **MATERIALS AND METHODS**

**Mosquito collections.** Specimens used were identified as *An. sundaicus s.l.* using the morphological key of Reid (1968) and the one prepared by IMPE (1987) for the *Anopheles* of Vietnam. Specimens were collected from 11 localities, widespread across the distribution area (III-4). Populations of Trat and Phangnga (Thailand) as well as Asahan, South Tapanuli, Lampung and Patuk from Indonesia, were the same localities where Sukowati's collections were done (Sukowati et al. 1996, 1999). Breeding sites from Miri (Sarawak, Borneo, Malaysia) and South Tapanuli (Sumatra, Indonesia) were both characterized as freshwater.

**DNA extraction, mtDNA amplification and sequencing.** DNA was individually extracted following the protocol described in Linton et al. (2001a) based on phenol-chloroform procedure. A total of 524-bp of the COI gene was amplified with universal primers C1-J-1718 and C1-N-2191 (Simon et al. 1994), employing the reaction conditions described in Linton et al. (2001a). A total of 575-bp of mitochondrial Cyt-b was amplified with primers CBSunA 5'-AATGTTACAAGAATTCA-3' and CBSunB 5'-TTAGCTATACATTATGC-3', using the reaction conditions described in Dusfour et al. (2004b). Fragment sequencing was done on both directions. The sequences obtained are available in GenBank under the following accession numbers: AY243788-AY243799, AY245283, AY245284, AY256954-AY256957, AY253150-AY253155, AY299094-AY299120, AY299339-AY299346, AY672287-AY672404 (Dusfour et al. 2004b, 2005).

**Allele Specific PCR.** mtDNA sequences were aligned within BioEdit (Hall 1999) by Clustal W (Thompson 1994) and then species specific alleles were identified. From these data, we designed allele specific primers (Figure III-6 et III-7). Each species specific PCR was tested independently before developing the multiplex assay. In a final volume of 20µL, concentrations within the PCR reaction mix were 1X reaction buffer (Qiagen, California), 0.4mM of dNTPs, 1mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.5µM of each primer, 0.5U of Taq polymerase (Qiagen, California), and 2µL of DNA template diluted 1/10.

The PCR cycles were one cycle at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 sec, gradient test 42°C from 50°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec. An additional autoextension at 72°C for 10 min was included at the end of the reaction. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 2.5 % agarose gel stained with ethidium bromide.

**Multiplex PCR.** To detect simultaneously each *Anopheles* species, all primers were used in combination to develop a one-step reaction. Combining six primers implies interactions among them during the PCR reaction. To limit this phenomenon, we optimized the PCR reaction by doing gradients on annealing temperature, MgCl<sub>2</sub> and primer concentrations. We tested temperatures from 46°C to 54°C, MgCl<sub>2</sub> concentrations from 0.5 to 1 mM and primer ones from 0.2 to 1 µM. We based the development of the single PCR assay on specimens determined as *An. sundaicus* s.s., *An. epiroticus* and *An. sundaicus* species E by phylogenetic analyses (Dusfour et al. 2004b, 2005).

**Validation of the assay.** The reliability of this method was tested on a sample of 59 specimens from different localities (Table III-4). These specimens were collected in the same sites as those used in the PCR development. The DNA from the specimens used in the single assay development was subjected to electrophoresis on an agarose gel as positive controls.

Country, locality	Number of specimens
Malaysia, Sarawak, Miri	8
Malaysia, Sarawak, Lundu	17
Vietnam, Ho Chi Minh	2
Vietnam, Bac Lieu	14
Thailand, Trat	1
Thailand, Phangnga	4
Indonesia, Sumatra, Asahan	2
Indonesia, Sumatra, South Tapanuli	2
Indonesia, Sumatra, Lampung	2
Indonesia, Java, Jakarta	1
Indonesia, Java, Patuk	6
Total	59

**Table III-4 : list of collection sites and number of specimens tested during the PCR validation phase**

## RESULTS

**Alignment, determination of nucleotide specificity and primer design.** Alignment of all the 86 and 88 sequences from COI and Cyt-b, respectively, obtained from Dusfour et al. (2005), showed the presence of 2 and 6 species specific nucleotides. Primers were designed using the sequences aligned in Figures 19 and 20. We designed 5 primers for the 3 species of the *An. sundaicus* complex. *Anopheles sundaicus* s.s. and *An. sundaicus* species E specific primer, SS and E respectively, were chosen on Cyt-b partial gene (Figure III-6, Table III-5). Both are in complementary of the primer CBSunA for the amplification of each specific gene fragment. One couple of primers, SpCO and Epi, was designed on the COI gene for the identification of *An. epiroticus* (Figure III-7, Table III-5). Finally, a primer, SpCB, common of all complex species was designed on the Cyt-b and complementary of CBSunA (Figure III-6, Table III-5). The oligonucleotide sequence for each primer and their respective melting temperature (T<sub>m</sub>) are shown in Table III-5. The expected lengths of specific amplifications are 435 bp for all the complex species, 313 bp for *An. sundaicus* s.s., 167 bp

for *An. epiroticus*, and 498 bp for *An. sundaicus* species E (Table III-5). Criteria for primer design were that the PCR products after amplification had to be specific of each species and easily visualized on an agarose gel. PCR reactions agreed with these criteria without any non-specific band (data not shown).

Name	Gene	Specificity	Sequence (5'→3')	Annealing T°	Fragment Size (bp)
CBsunA	Cyt-b	Universal	AATGTTACAAGAATTCA	42	-
SpCB	Cyt-b	Sundaicus Complex	ATGTTGGACGTGGAGTT	50	435
S.S.	Cyt-b	<i>An. sundaicus</i> s.s.	TATCATTCTGAGGAGCC	50	313
E	Cyt-b	<i>An. sundaicus</i> E	ATGATTTTTACGAATTTGC	48	498
SpCO	COI	<i>An. epiroticus</i>	GAACGGTTTATCCTCCT	48	-
Epi	COI	<i>An. epiroticus</i>	TATTCGATCTAAAGTAATC	48	167

**Table III-5 : list of primers with their characteristics: name, gene where they were designed, specificity, primer sequences, annealing temperature and fragment size.**

**Multiplex.** The five primers specific of species were combined into a single PCR reaction to identify in one-shot reaction the three species of the complex. The aim was to maximize the yield of the desired product while retaining specificity. Then, the SpCB primer was added to the reaction mix to obtain the *An. sundaicus* s.l. common band of the complex. After testing different conditions, we defined the best ones for a final volume of 20µL as 0.5mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.25µM of each primer, 0.5U of Taq polymerase (Qiagen, California) and 52°C for 30 sec for the annealing temperature. This PCR multiplex was developed on individuals which was identified as *An. sundaicus* s.s. from Lundu (Sarawak, Borneo), *An. epiroticus* from Bac Lieu (Vietnam) and *An. sundaicus* E from Asahan (Indonesia) (Dusfour et al. 2004b, 2005). Figure III-8 show the result of the PCR identification with and without the common band of the whole Sundaicus Complex.

**Validation.** The DNA from the standard specimens was subjected to electrophoresis on an agarose gel as positive controls. A total of 59 specimens were tested for the validation of the PCR. As expected, all tested specimens were identified as the same species of the original populations. This result reinforced the geographic distribution of the three species on the three distinct geographic regions (Table III-4). *Anopheles sundaicus* s.s. is distributed in Northern Borneo and suspected in the south part by following the coast. *Anopheles epiroticus* is present on the coastal part of the continent from the 11th parallel in southern Vietnam to peninsular Malaysia. *Anopheles sundaicus* species E occurs on Java and Sumatra, Indonesia.

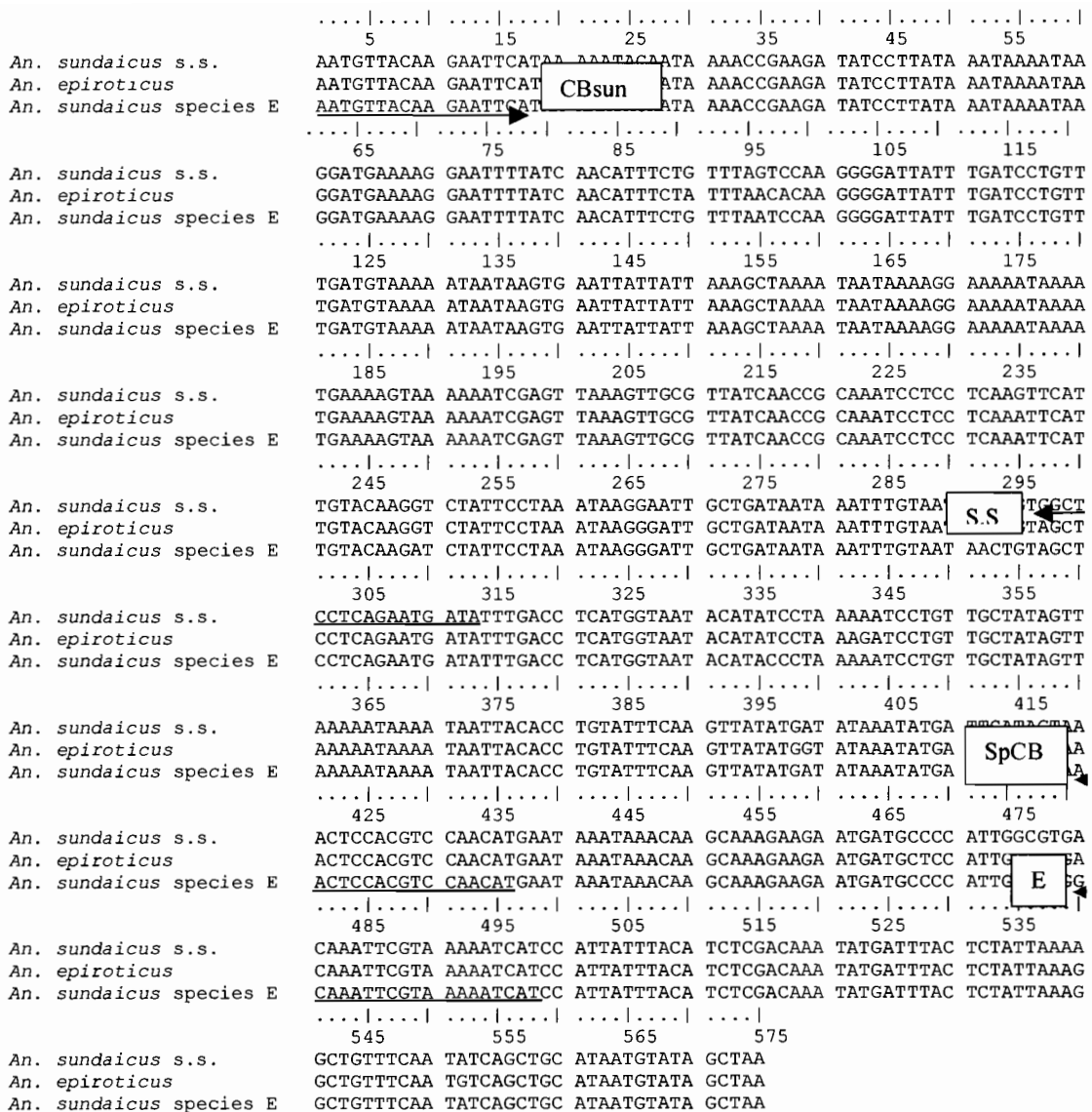


Figure III-6 : positioning of primers on the Cyt-b sequence alignment of the three species

	5	15	25	35	45	55	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	GGAGGATTTG	GAAATTGATT	AGTTCCTCTT	ATATTAGGAG	CTCCAGACAT	AGCATTCCCCT	
<i>An. epiroticus</i>	GGAGGATTTG	GAAATTGATT	AGTTCCTCTT	ATGTTAGGAG	CTCCAGACAT	AGCATTCCCCT	
<i>An. sundaicus</i> species E	GGAGGATTTG	GAAATTGATT	AGTTCCTCTT	ATGTTAGGAG	CTCCAGACAT	AGCATTCCCCT	
	65	75	85	95	105	115	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	CGAATAAATA	ATATAAGATT	TTGAATACTA	CCGCCTTCTT	TAACACTGCT	AATTTCTAGT	
<i>An. epiroticus</i>	CGAATAAATA	ATATAAGATT	TTGAATACTA	CCACCTTCTT	TAACACTGCT	AATTTCTAGT	
<i>An. sundaicus</i> species E	CGAATAAATA	ATATAAGATT	TTGAATACTA	CCACCTTCTT	TAACACTGCT	AATTTCTAGT	
	125	135	145	155	165	175	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	AGAATGGTAG	AAAATGGGGC	AGGTACAGGA	TGAACGGTTT	ATCCCCCTCT	ATCTTCTGGG	
<i>An. epiroticus</i>	AGAATGGTAG	AAAATGGGAGC	AGGTACAGGA	TGAACGGTTT	ATCCTCCTCT	GG	
<i>An. sundaicus</i> species E	AGAATGGTAG	AAAATGGGGC	AGGTACAGGA	TGAACGGTTT	ATCCTCCTCT	GG	SpCO
..	185	195	205	215	225	235	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	ATTGCTCAGC	CAGGAGCATC	AGTTGATTTA	GCTATTTTTT	CTTACATT	AGCTGGGATT	
<i>An. epiroticus</i>	ATTGCTCAGC	CAGGAGCATC	AGTTGATTTA	GCTATTTTTT	CATTACATT	AGCTGGGATT	
<i>An. sundaicus</i> species E	ATTGCTCAGC	CAGGAGCATC	CGTTGATTTA	GCTATTTTTT	CATTACATT	AGCTGGGATT	
	245	255	265	275	285	295	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	TCTTCAATTT	TAGGGGCTGT	AAATTTTATT	ACTACAGTAA	TTAATATACG	GGG	
<i>An. epiroticus</i>	TCTTCAATTT	TAGGGGCTGT	AAATTTTATT	ACTACAGTAA	TTAATATACG	GGG	Epi
<i>An. sundaicus</i> species E	TCTTCAATTT	TAGGGGCTGT	AAATTTTATT	ACTACAGTAA	TTAATATACG	GGG	
	305	315	325	335	345	355	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	ATTACTTTAG	ATCGAATACC	TTTATTTGTT	TGATCTGTAG	TTATTACAGC	TATTTATTA	
<i>An. epiroticus</i>	ATTACTTTAG	ATCGAATACC	TTTATTTGTT	TGATCTGTAG	TTATTACAGC	TATTTATTA	
<i>An. sundaicus</i> species E	ATTACTTTAG	ATCGAATACC	TTTATTTGTT	TGATCTGTAG	TTATTACAGC	TATTTATTA	
	365	375	385	395	405	415	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	TTATTATCAT	TACCTGTATT	AGCCGGAGCT	ATTACTATAT	TATTAAGTGA	TCGAAATTTA	
<i>An. epiroticus</i>	TTATTATCAT	TACCTGTATT	AGCCGGAGCT	ATTACTATAT	TATTAAGTGA	TCGAAATTTA	
<i>An. sundaicus</i> species E	TTATTATCAT	TACCTGTATT	AGCCGGAGCT	ATTACTATAT	TATTAAGTGA	TCGAAATTTA	
	425	435	445	455	465	475	
<i>An. sundaicus</i> s.s.	AATACTTCTT	TCTTTGACCC	CGCAGGAGGA	GGAGACCCTA	TTTTATATCA	ACACTTATTT	
<i>An. epiroticus</i>	AATACTTCTT	TCTTTGACCC	CGCAGGAGGA	GGAGACCCTA	TTTTATATCA	ACACTTATTT	
<i>An. sundaicus</i> species E	AATACTTCTT	TCTTTGACCC	CGCAGGAGGA	GGAGACCCTA	TTTTATATCA	ACACTTATTT	
	485	495	505	515			
<i>An. sundaicus</i> s.s.	TGATTTTTTG	GACACCCAGA	AGTTTATATT	TTAATTTTAC	CGGG		
<i>An. epiroticus</i>	TGATTTTTTG	GACACCCGGA	AGTTTATATT	TTAATTTTAC	CGGG		
<i>An. sundaicus</i> species E	TGATTTTTTG	GACACCCGGA	AGTTTATATT	TTAATTTTAC	CGGG		

Figure III-7 : positioning of primers on the COI sequence alignment of the three species

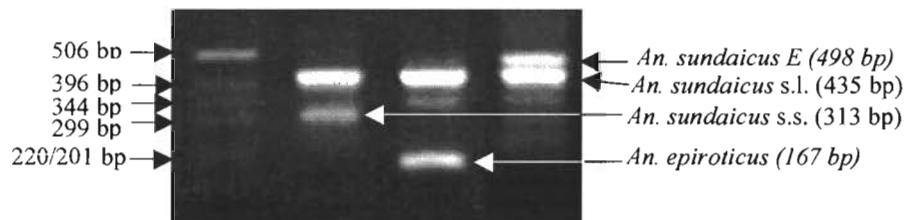


Figure III-8 : multiplex PCR for the identification of *An. sundaicus* s.s. (lane 1), *An. epiroticus* (lane 2) and *An. sundaicus* species E (lane 3) with the specific band for the complex. Lane 1 = 1 kb ladder.

## DISCUSSION

The development of identification PCR on the base of mtDNA is innovative for *Anopheles* complexes. Indeed, rDNA has been mostly used for the design of primers in such methods, especially based on ITS2 and IGS sequences (i.e. Scott et al. 1993, Garros et al. 2004b, Dusfour et al. 2005). However, despite the specific ITS2 sequence for *An. sundaicus* s.s., the presence of intragenomic variations and shared ITS2 types between *An. epiroticus* and *An. sundaicus* E (Dusfour et al. 2005) eliminated the possibility to use this marker. Moreover, our multiplex PCR is based, for the first time in *Anopheles* genus, on two genes. Between both markers, Cyt-b was the most informative. Five primers were designed on this gene fragment. One fixed mutation was observed for *An. epiroticus*. However, the specific band size was not easily visualized on agarose gel. In consequence, we designed *An. epiroticus* specific primers on the COI fragment. Primer designs were based on only one nucleotide difference from the general sequences. This characteristic generated non-specific amplifications during the development of the multiplex assays. Improvement of PCR conditions by increasing annealing temperature and decreasing MgCl<sub>2</sub> concentration limited such amplifications. Moreover, the intensity of specific band implies the non-ambiguity in the result. The addition of SpCB primer acts as the positive control of PCR reaction.

Separate studies on the different species of the Sundaicus Complex are still poorly documented. However, such single PCR assay will be useful in future investigation. For instance, the geographic distribution of each species in the complex has to be more precisely defined. In addition to a basic use in entomological survey, the PCR could detect potential new species shown by the sole presence of the common band of the complex. The PCR will be useful in prospective missions such as in Andaman islands where the cytogenetic form D was described (Nanda et al. 2004). However, the molecular status of this form is still unknown. Moreover, all three species are known as allopatric species. The objective is now to define if they are really allopatric or if sympatric areas exist. A region of interest for such study is the island of Malacca strait which is at equal distance from the continent and Sumatra island. Both *An. epiroticus* and *An. sundaicus* E could occur in this region. The development of such rapid and reliable PCR is also essential for technology transfer, as well as for the assessment of further investigation on epidemiology and ecology of the complex. Understanding *Anopheles* complexes is a prerequisite for precisely determining the vectors of malaria, for better studying malaria epidemiology and implementing appropriate vector control strategies. Nowadays, vectorial capacity of each species is poorly known. In Indonesia, Malaysia and Vietnam, *An. sundaicus* s.l. were considered as principal vector on coastal areas (Soeparmono and Lair 1954, Rao 1984, Nguyen Tang Am et al. 1993, Miyagi et al. 1994) although no recent malaria case was due to *An. sundaicus* in southern Vietnam. This method is a basic tool in the development of selective vector control.

---

## CONCLUSION

Le but de cette approche était d'identifier des différences diagnostiques entre les espèces du Complexe Sundaicus. Des caractères morphologiques et des séquences ont été comparés. Aucune différence morphologique n'a pu être utilisée en tant que marqueur discriminant, les espèces peuvent être définies comme cryptiques (Encadré III-1) pour les caractères observés. En l'absence de caractères morphologiques aisément identifiables, une méthode rapide et fiable d'identification moléculaire était nécessaire. Des mutations caractéristiques de chaque espèce ont été identifiées sur le Cyt-b et le COI. Sur la base de ces nucléotides spécifiques, des amorces ont été dessinées et utilisées dans une PCR multiplexe d'identification. L'identification des moustiques est réalisable en une seule étape et visualisable sur gel d'agarose. Ces deux conditions sont indispensables pour le transfert dans les pays du sud concernés. En effet, les entomologistes des pays d'Asie du sud-est dans lesquels se situe *An. sundaicus* s.l., ont des laboratoires équipés pour la biologie moléculaire. Le transfert de technologie sera donc possible et soutenu par des collaborations entre l'Asie et l'Europe au sein de projets tel que le projet MALVECASIA (voir Partie IV) ou d'enseignement tel que le Master international d'Entomologie, Université Kasetsart, Bangkok, Thaïlande. Le développement d'une telle méthode permettra de mieux comprendre la distribution, la biologie et la capacité vectorielle des membres du Complexe Sundaicus. De plus, son amélioration pourra aisément être faite si d'autres espèces du complexe sont mises en évidence, par le développement de nouvelles amorces spécifiques sur l'un ou l'autre des fragments de gènes.

### Encadré III-1 : espèces cryptiques, espèces jumelles.

Sont définies comme **espèces cryptiques** d'un complexe, des espèces qui ne peuvent pas être distinguées par des caractères morphologiques. Par contre, les **espèces jumelles** présentent quelques différences discriminantes.

**PARTIE IV • CARACTERISATION D'*AN.*  
*SUNDAICUS* S.L. DANS LE SUD VIETNAM**

Connaître la biologie, le comportement et l'environnement des vecteurs d'agents pathogènes humain sont des éléments essentiels dans le développement de stratégies de lutte antivectorielle efficaces. La distribution d'une maladie est dépendante de l'interaction d'une multitude de facteurs environnementaux, climatiques et biologiques qui définissent un milieu propice au développement de l'insecte et, ensuite, à la transmission de la maladie. Cependant, la détermination de ces facteurs demande l'étude à large échelle d'un grand nombre de paramètres. En fait, les avancées récentes sur les techniques de télédétection et les systèmes d'information géographique assistés par ordinateur ont donné l'opportunité aux scientifiques de cartographier les maladies à vecteur et d'analyser un grand nombre des facteurs environnementaux pouvant affecter leur distribution spatiale et temporelle. Ces techniques ont déjà été utilisées pour cartographier, surveiller et quelquefois prédire la présence et le développement de maladies telles que le paludisme, la trypanosomose, l'onchocercose, la leishmaniose et les shistosomiasés (Kitron et al. 1994, Hassan et al. 1998, Indaratna et al. 1998, Hay et al. 2000, Thomson and Connor 2000, Cattand et al. 2001, Brooker et al. 2003, Rinaldi et al. 2004, Rizzoli et al. 2004, Srivastava and Nagpal 2004).

*Anopheles sundaicus* est considéré comme le vecteur majeur du paludisme dans les zones côtières du sud Vietnam (Nguyen Tang Am et al. 1993, Phan 1998). Sa distribution se situe en dessous du 11<sup>ème</sup> parallèle dans une région largement couverte par le delta du Mékong. Les programmes de lutte et les projets d'étude sur les vecteurs du paludisme dans cette région portent essentiellement sur cette espèce. Un programme national drastique de lutte contre le paludisme a débuté dans les années 90. Il a été couronné de succès avec une diminution des cas et de la mortalité en 2003 (Erhart et al. 2004).

L'étude sur *An. sundaicus* au sud du Vietnam comprend sa caractérisation environnementale en collaboration avec l'Institut National de Malarialogie, Parasitologie et Entomologie (NIMPE) de Hanoi, le Sub-IMPE d'Ho Chi Minh ville (institut régional) et l'Institut de Géographie de Hanoi et le traitement des données entomologiques collectées par les partenaires sur le terrain au cours du projet MALVECASIA (Encadré IV-1). Pour cela, un système d'information géographique a été développé dans le cadre du projet MALVECASIA.

#### Encadré IV-1 : le projet MALVECASIA

Le projet MALVECASIA, dans lequel s'intègre notre approche, réunit 8 partenaires dont 4 en Asie (Vietnam, Cambodge, Laos et Thaïlande) et 4 en Europe (Belgique, France et 2 en Grande Bretagne). C'est un projet INCO financé par l'union européenne. Son premier axe d'étude est la détermination des niveaux de résistance aux insecticides des anophèles et des mécanismes par bioessais des vecteurs du paludisme aux insecticides et essais biochimiques sur des populations d'anophèles de 115 sites du Cambodge (20), Laos (20), de Thaïlande (15) et du Vietnam (60). Le deuxième axe est le développement d'un Système d'Information Géographique (SIG) afin d'intégrer la distribution des anophèles, leurs caractéristiques environnementales, leur degré de résistance à différents insecticides dans trois pays (Cambodge, Laos et Vietnam). Des informations sur les cas de paludisme et l'utilisation d'insecticides seront aussi ajoutées. Enfin, un transfert des technologies pour consolider les capacités de recherche de l'actuel réseau d'Asie du sud-est effectué tout au long du projet. Le but final est de développer un outil de surveillance et de prédiction de la présence des vecteurs et du paludisme en Asie du sud-est permettant de mieux contrôler le paludisme dans ces trois pays.

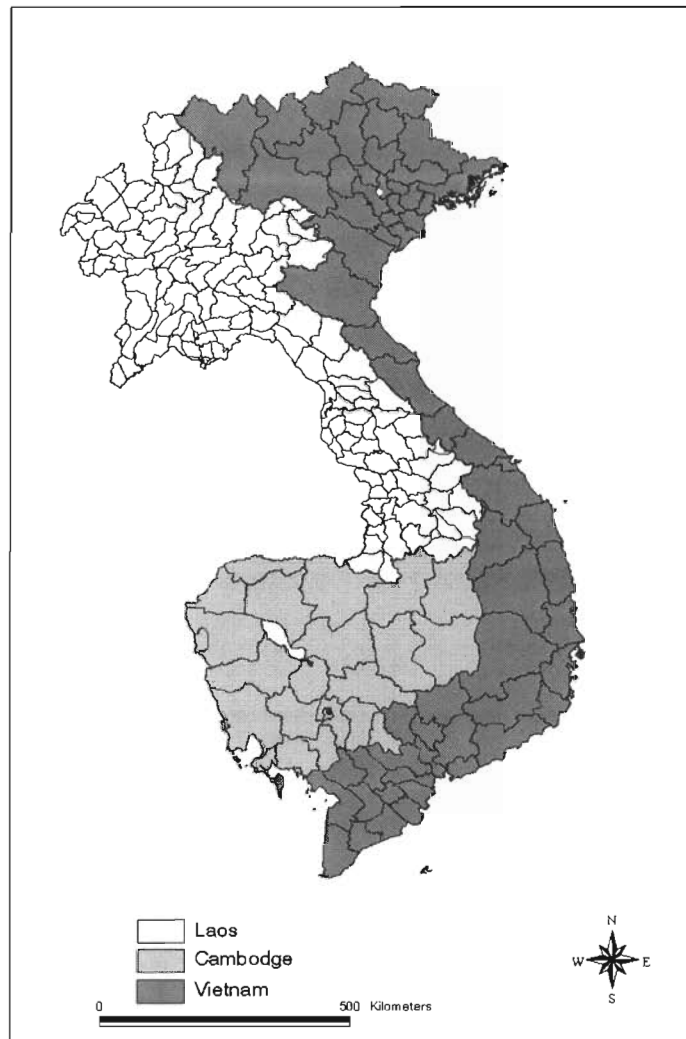


Figure IV-1 : carte des trois pays de la région du Mékong inclus dans le SIG du projet MALVECASIA

Ce chapitre a pour but de mettre en place le contexte général de l'environnement et de la situation du paludisme dans le sud Vietnam. Cette description permettra de mieux comprendre le milieu dans lequel évolue *An. sondaicus* et la vigilance portée à ce vecteur. Des données générales sur le Vietnam sont présentées dans l'Encadré IV-2.

**Encadré IV-2 : description du Vietnam**

Superficie : 335 000 km<sup>2</sup>

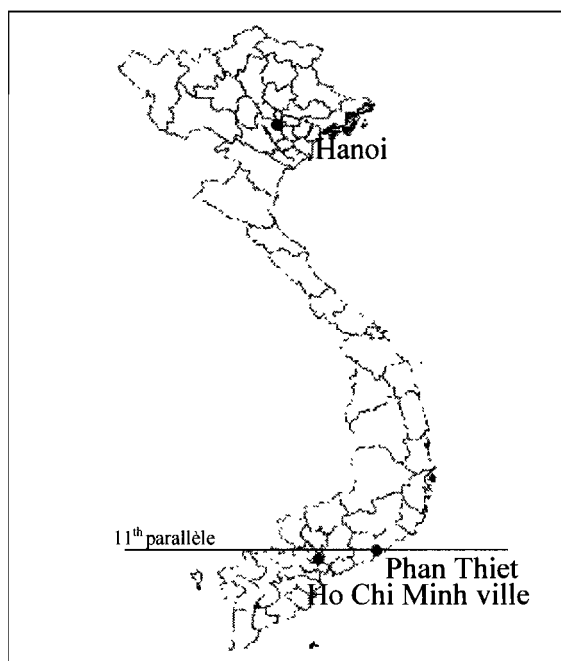
Population : > 74 000 000 habitants

Ethnie majoritaire : Khins

Coordonnées terrestres : 102° 10'-109° 30' longitude est 8° 30'-23° 22' latitude nord.

Découpage administratif : 54 provinces hiérarchisées en districts, communes et villages.

Le Vietnam est une bande de terre située au centre de l'Asie du sud-est, bordée au nord par la Chine, à l'ouest par le Laos et le Cambodge, et s'ouvre à l'est et au sud sur la mer Orientale (mer de Chine). La côte s'étire sur 3 260 km et les frontières terrestres sur 3 700 km. La distance nord-sud est de 1 650 km; la largeur maximale du territoire au nord atteint 600 km, au sud 400 km et la largeur minimale est de 50 km dans la région de Quang Binh au centre. Le Vietnam est un carrefour pour les déplacements entre l'océan Indien et l'océan Pacifique.



**Figure IV-2 : carte générale du Vietnam**

---

## PRESENTATION GENERALE DU SUD VIETNAM

**LA TOPOGRAPHIE.** Contrairement aux autres régions du Vietnam qui comporte des zones collinaires et montagneuses, le sud du Vietnam a une altitude très basse (<5m). En effet, le delta du Mékong (plaine du Nam Bo) en couvre une grande partie. Cette plaine est, avec le fleuve rouge au Nord, l'un des deux deltas du Vietnam. Il a une superficie de quelques 36 000 km<sup>2</sup>. Son influence s'étend largement dans la région au sud d'Ho Chi Minh ville jusqu'à la province de Soc Trang. La plaine dite alluviale s'étend jusqu'à la province de Kien Giang. Le sud Vietnam est quadrillé par des rivières et canaux (Illustration IV-1) nécessaires à l'irrigation pour l'agriculture, mais ils permettent dans certaines provinces l'entrée de la mer jusqu'à plus de 30 km à l'intérieur des terres lors de la saison sèche (Figure IV-3).

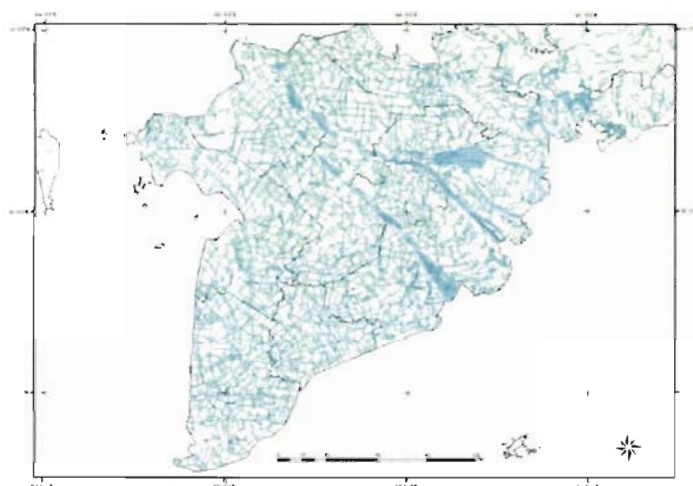


Figure IV-3 : représentation des canaux d'irrigation et des rivières dans le sud du Vietnam. Les bras du delta du Mékong sont représentés par des étendues bleues.



Illustration IV-1 : canal de la province de Ben Tre, Vietnam (photo I. Dusfour, 2003)

**LE CLIMAT.** Le sud du Vietnam se trouve dans une région de climat tropical avec des moussons, beaucoup d'ensoleillement, un abondant volume pluviométrique et une forte humidité (>70%). La pluviométrie varie en moyenne entre 800 et 2400 mm/an de la province d'Ho Chi Minh à celle de Ca Mau située à l'extrême sud du Vietnam. La température moyenne annuelle est de 26°C à Ho Chi Minh-ville. Elle est supérieure aux autres régions du Vietnam (23°C à Hanoi et 25°C à Hue). Le climat compte deux saisons : la saison sèche et froide (de novembre à avril) et la saison chaude et pluvieuse (de mai à octobre). Dans les provinces du sud, la différence de température est de 3°C environ.

**AGRICULTURE ET AQUACULTURE.** La topologie a une influence directe sur l'économie. En effet, la plaine du Mékong est fertile et propice à l'agriculture. La riziculture est l'activité majeure de cette région. Cependant, les intrusions cycliques de l'eau de mer à l'intérieur des terres, demandent aux habitants, soit une gestion de l'eau douce séparée de l'eau saumâtre, soit l'utilisation de ce phénomène. C'est pourquoi, depuis 10 à 20 ans selon les provinces, le développement des élevages de crevettes a pris un essor fulgurant. Cette activité a, d'une part, bouleversée l'économie en remplaçant la culture du riz beaucoup moins lucrative par cet élevage dans les zones intertidales et, d'autre part, entraînée la déforestation massive des mangroves déjà largement réduites à cause des défoliants. Les cultures secondaires sont soit pérennes (bananes, noix de coco, papayes, mangues) ou soit annuelles ou pluriannuelles, tels que l'arachide, le piment à des fins commerciales ou familiales. L'élevage de poissons d'eau douce ou de mer est aussi présent dans la plaine centrale et sur la côte. Peu ou pas de production animale est présente si ce n'est à titre familial.

**POPULATIONS.** Les densités de populations sont les plus fortes dans la région d'Ho Chi Minh ville et dans le delta. La population est à majorité rurale. L'habitat est largement dispersé le long des routes, autour des rizières et des élevages de crevettes.

---

## **PALUDISME**

**ESPECES DE PLASMODIES.** Phan (1998) et le Mekong Malaria Forum (2000) présentent *P. falciparum* comme l'espèce majoritaire vs *P. vivax* dans les provinces du sud Vietnam où *An. sudaicus* est le vecteur principal. Dans quelques foyers sporadiques de la plaine d'eau douce et le long du littoral où l'eau est moins saumâtre, *P. vivax* domine (Phan 1998).

**ESPECES VECTRICES.** Au Vietnam, 59 espèces d'anophèles ont été recensées, trois sont des vecteurs principaux : *An. dirus*, *An. minimus* et *An. sudaicus*. Dans la région du sud Vietnam deux types de zone physiogéographique et épidémiologique (Phan 1998) ont été reconnus. Premièrement, le littoral à eau saumâtre est situé dans la partie au sud de Phan Thiet. Le vecteur principal y est *An. sudaicus*. Les vecteurs secondaires sont *An. subpictus*, *An. aconitus*, *An. vagus* et *An. sinensis*. Les espèces *An.*

*lesteri* et *An. nimpe* sont suspectées d'être des vecteurs locaux importants (Nguyen Tang Am et al. 1993, Phan 1998). Dans la province de Binh Thuan le vecteur principal est *An. minimus*. Deuxièmement, les plaines à eau stagnante, pour lesquelles il n'y a pas de vecteur principal si ce n'est sporadiquement *An. minimus* transporté passivement. Les vecteurs secondaires sont *An. vagus*, *An. sinensis*, *An. aconitus* et *An. tessellatus*.

**TRANSMISSION.** La variation saisonnière de la densité anophélienne détermine les périodes de transmission palustre. Dans la région située au sud de Phan Thiet, la transmission se fait au début de la saison des pluies au moment du pic de densité d'*An. sundaicus*. Les derniers résultats de recherche de sporozoïtes chez *An. sundaicus* montrent que dans le village de Van Duc A (commune d'An Trach, district de Dong Hai, province Bac Lieu) aucun des 11 000 moustiques testés n'était positif (Erhart et al. 2004, Trung et al. 2004). Un tel contraste avec les années 1960-75, pendant lesquelles les indices sporozoïtiques atteignaient 0,2 à 2,4%, peut être expliqué par l'augmentation importante de la densité de vecteurs (jusqu'à 190 piqûres par homme par nuit) (Trung et al. 2004). En effet, une telle densité peut induire une baisse de longévité du moustique ne permettant pas l'accomplissement du cycle sporogonique du parasite (Erhart et al. 2004, Trung et al. 2004). Une autre explication est le déploiement, depuis 1991 au Vietnam, d'un programme de lutte nationale. Ce programme qui combine luttés contre le parasite et contre les vecteurs a montré son efficacité en diminuant significativement les cas de paludisme sur l'ensemble du pays (Erhart et al. 2004, Trung et al. 2004).

**EPIDEMIOLOGIE.** Le paludisme est instable dans ces régions avec des épidémies à caractère cyclique. Les épidémies dans le sud ont été cinq fois moins importantes que dans le nord. Entre 1976 et 1994, 229 épidémies ont été recensées dans le sud (70 692 cas, 1 516 cas graves et 904 décès), alors que dans le nord, 1.991 épidémies ont été comptabilisées (331 424 cas, 6 526 graves et 2 817 décès). En 1991, il y eut une résurgence du paludisme avec plus d'un million de cas au Vietnam et environ 5.000 morts. La mortalité causée par le paludisme au Vietnam a été, en 1998, inférieure à 3/100 000 (Phan 1998). Le nombre de cas a largement diminué entre 1991 et 2000 et le taux de mortalité est quasiment nul (MMF 2001).

**CONTROLE & RESISTANCE.** La lutte antipaludique a commencé au Vietnam dès 1958. Le contrôle du paludisme passe, depuis 1991, par l'information (Illustration IV-2), le suivi drastique des cas de paludisme, le traitement des cas, la diminution des densités de vecteurs par pulvérisations intradomiciliaires et moustiquaires imprégnées. Cette mission a été donnée au système hiérarchisé de l'Institut National de Malariologie, Parasitologie et Entomologie (NIMPE), aux sub-IMPE et aux centres de santé des provinces, districts et communes. La diminution des cas de paludisme est la preuve de la grande efficacité de ce système dans le cas de paludisme instable. Cependant, des résistances de *P. falciparum* à la chloroquine et à la sulfoxine-pyriméthamine ont été détectés dans les provinces de Soc Trang, Tien Giang et Ho Chi Minh (MMF 2001). Phan (1998) présente *An. sundaicus* comme résistant au DDT dans les zones côtières, les autres vecteurs sont sensibles.

A l'heure actuelle peu de cas de paludisme sont recensés dans le sud Vietnam (Vo Thi Long comm. Pers., Erhart et al. 2004). Cependant, *An. sudaicus* peut toujours être considéré comme une menace. En effet, ce vecteur est connu pour être impliqué dans des épidémies (Sen 1938, Nagpal and Kalra 1997, Phan 1998) ce qui demande le maintien de la surveillance.



Illustration IV-2 : exemple d'affichage pour la prévention du paludisme dans le sud Vietnam

---

## PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Les caractéristiques environnementales d'*An. sudaicus* ont déjà été décrites dans la littérature (voir Article 1). Cependant, il était nécessaire de vérifier et de préciser, sur un grand nombre de sites, les données écologiques concernant *An. sudaicus* au sud Vietnam. Ce travail de terrain m'a permis d'analyser des paramètres environnementaux et entomologiques, nécessaires pour mieux comprendre ce vecteur.

Nous nous sommes donc focalisés sur deux questions inhérentes à *An. sudaicus* :

- (i) Quels sont les paramètres environnementaux qui caractérisent la présence d'*An. sudaicus* au sud Vietnam?
- (ii) Quelles sont les caractéristiques comportementales et le statut de résistance d'*An. sudaicus* aux insecticides?

Les objectifs finaux de cette étude sont de :

- (i) pouvoir prédire la présence du vecteur
- (ii) pouvoir développer des stratégies de lutte antivectorielle efficaces contre *An. sudaicus*.

## SITES ET COLLECTES ENTOMOLOGIQUES

Dix-huit sites ont été sélectionnés dans la région au sud de la province d'Ho Chi Minh (Table IV-4, Figure IV-4). Le NIMPE<sup>1</sup> y a fait des campagnes de collectes d'adultes afin d'évaluer le niveau de résistance aux insecticides des anophèles. Toute la faune anophélienne a été capturée lors de ces collectes faites sur appât humain à l'intérieur (IH) et à l'extérieur (OH) des maisons, sur bovin à l'extérieur (OC) ou le matin dans les lieux de repos des anophèles dans les maisons (RMI). Les collectes ont eu lieu sur une semaine environ (Annexe 4). Les collectes sur humain ont toujours été faites pour tous les sites, alors que les deux autres types n'ont pas été systématique (Table IV-1). Ces collectes ont été faites dans deux maisons entre 19h00 et 1h00 et le nombre de moustiques collectés comptabilisé heure par heure. Deux campagnes ont eu lieu, l'une en avril-mai 2003 au moment du pic de densité d'*An. sundaicus* et l'autre en novembre 2003. Certains sites sont communs aux deux collectes (Table IV-2).

Des collectes additionnelles de larves ont été faites autour des villages lors de la mission de caractérisation de l'environnement en novembre et décembre 2003. Le but était de définir les caractéristiques des gîtes propices au développement des stades immatures d'*An. sundaicus*.

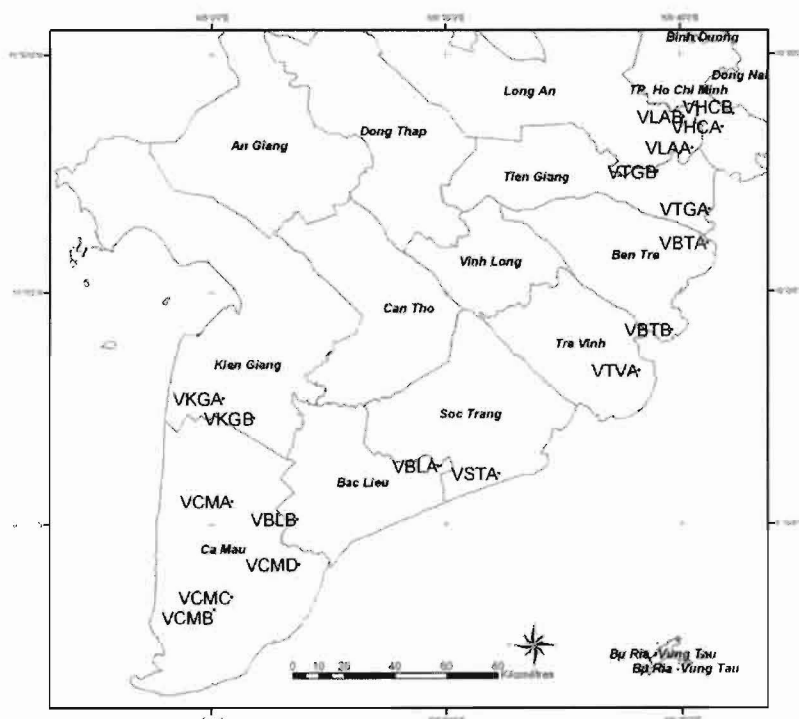


Figure IV-4 : répartition des sites d'étude dans les provinces du sud Vietnam. Les sites sont identifiés par leur code village (Table IV-1).

<sup>1</sup> National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology

CODE	COORDONNEES	PROVINCE	DISTRICT	COMMUNE	VILLAGE
VBLA	N9°22'13.4" E105°48'39.8"	Bac Lieu	Vinh Loi	Hung Thanh	Gia Hoi
VBLB*	N9°11'01.0" E105°18'12.4"	Bac Lieu	Dong Hai	An Trach	Van Duc A
VBTA	N10°09'57.56" E106°45'39.17"	Ben Tre	Binh Dai	Thua Duc	Thua Long
VBTB	N9°51'42.07" E106°38'04.7"	Ben Tre	Thanh Phu	Thanh Phong	Thanh Phuoc
VCMA	N9°14'47.04" E105°04'24.58"	Ca Mau	U Minh	Khanh An	Ap4
VCMB	N8°51'55.05" E105°0'51.4"	Ca Mau	Cai Nuoc	Tran Thoi	My Hung
VCMC	N8°54'30 66" E105°04'19 88"	Ca Mau	Cai Nuoc	Dong Thoi	Bao Tron
VCMD	N9°01'22 4" E105°18'37 5"	Ca Mau	Dam Dor	Tan Thuan	Thuan Hoa
VHCA*	N10°34'17.7" E106°48'51.8"	Ho Chi Minh	Can Gio	An Thoi Dong	An Dong
VHCB	N10°37'05.04" E106°51'21.0"	Ho Chi Minh	Can Gio	Tam Thon Hiep	Tran Hung Dao
VKGA	N9°36'54.9 E105°02'29.2"	Kien Giang	An Minh	An Minh Bac	An Thanh
VKGB	N9°32'47.66" E105°09'3.21"	Kien Giang	Vinh Tuan	Minh Tuan	Minh Kien
VLAA	N10°29'53.7" E106°42'33.9"	Long An	Can Duoc	Long Huu Dong	Long Ninh
VLAB	N10°36'29.3" E106°40'40.3"	Long An	Can Giuoc	Phuoc Lai	Tan Thanh
VSTA	N9°20'46 5 E106°01'13.4"	Soc Trang	Vinh Chau	Vinh Chau	Dai Rung
VTGA	N10°16'58.2" E106°46'06.9"	Tien Giang	Go Cong Dong	Tan Thanh	Cau Muong
VTGB	N10°24'35.4" E106°35'12.6"	Tien Giang	Go Cong Tay	Binh Phu	Tho Khuong
VTVA	N9°42'47 6" E106°31'10 5"	Tra Vinh	Duyen Hai	Long Huu	Ap11

**Table IV-1 : code village<sup>1</sup>, coordonnées et position administrative des villages étudiés. Les sites en gras sont ceux visités au mois d'avril, ceux signalisés avec \* ont été visités en avril et en octobre, et ceux en écriture normale ont été visités uniquement au mois d'octobre.**

	VBLA	VBLB	VBTA	VBTB	VCMA	VCMB	VCMC	VCMD	VHCA	VHCB	VKGA	VKGB	VLAA	VLAB	VSTA	VTGA	VTGB	VTVA
IH	X	X (X)	X	X	X	X	X	X	X (X)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OH	X	X (X)	X	X	X	X	X	X	X (X)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OC	X	(X)	X	X					(X)	X	X	X	X			X	X	X
RMI	X	X	X	X	X	X	X	X	X (X)	X	X	X	X		X	X	X	X

**Table IV-2 : méthodes de collecte utilisées en fonction des sites. Les cases cochées entre parenthèses indiquent la méthode pour la seconde collecte entomologique de ce site. (IH: collecte intérieure sur homme; OH collecte extérieure sur homme; OC collecte extérieure sur bétail; RMI collecte intérieure de faune résiduelle)**

## TESTS DE RESISTANCE AUX INSECTICIDES

Les bioessais ont été réalisés avec les insecticides suivants, DDT 4%, Alpha-Cyperméthrine 30mg/m<sup>2</sup>, Lambda-cyhalothrine 0,05% et Perméthrine 0,75%. Cinq répétitions ont été faites par test et environ 20 moustiques testés par répétition. Nous exposerons ici les résultats de ces tests pour les sites de VBLA, VBLB, VBTA, VBTB, VCMA, VCMB, VHCA, VHCB, VLAA, VLAB et VKGA. Ces sites ont été prospectés en avril 2003 et les résultats ont été contrôlés. Les données des autres sites sont en cours de traitements dans le cadre du projet. Une population est considérée comme résistante lorsque plus de 80% des individus testés survivent au test. Les deux types de données brutes, collectes et essais, ont été saisis en double aveugle dans deux bases de données ACCESS.

<sup>1</sup> les codes villages sont composés (1) du code pays, V pour le Vietnam (2) du code province (e g BL pour Bac Lieu) et (3) du numéro du village A, B,C ou D

---

## **CARACTERISATION DE L'ENVIRONNEMENT SUR LE TERRAIN ET EXTRAPOLATION AUX 100 KM<sup>2</sup>**

La caractérisation environnementale a été effectuée autour de 14 des 18 sites au cours d'une mission de trois semaines sur le terrain de l'équipe IRD en collaboration avec le NIMPE, le Sub-IMPE d'Ho Chi Minh et l'Institut de Géographie de Hanoi. Les sites correspondent aux villages prospectés lors du pic de densité d'*An. sudaicus* durant le mois d'avril (fin de saison sèche). Nos observations de l'environnement ont été faites en début de saison sèche (novembre/décembre). Comme nous l'avons vu, le climat est homogène et il n'y avait pas de réel changement de la végétation entre les saisons.

Les caractéristiques observées sont les suivantes :

### **1. Utilisation des sols (le long de la route empruntée et sur site)**

-Forêt (Mangrove)

-Agriculture

    Pérenne (bananier, cocotier)

    Annuelle (riz, canne à sucre, arachide, piment...)

-Aquaculture (poissons, crevettes)

### **2. Gîtes larvaires à proximité des sites d'études**

-Végétation des gîtes larvaires

-Plantes aquatiques émergées, immergées

-Algues flottantes, immergées, filamenteuses

### **3. Salinité**

-Canaux

-Mares

-Bassins d'élevage de crevettes

**EXTRAPOLATION.** Le vol moyen des anophèles est de 3 à 5 km, ainsi une zone, commune à tous les sites de 10x10 km, a été définie pour couvrir l'aire de vol des moustiques autour de chaque village. L'utilisation des sols a été définie sur la base d'observation de terrain et extrapolée à toute zone 10x10 km par analyse d'images satellites. Deux types d'image ont été utilisés : des images LANDSAT ETM+ avec pour composition colorée R=4 G=5 B=2 et fusion du canal panchromatique (à 15m), et des images SPOT 5 (à 10m) ou XS (Annexe 3). Ces images ont été utilisées comme cartes sur le terrain en complément des cartes topographiques (1/50 000) et du GPS (Global Positioning System, Etrex Vista) pour localiser précisément la longitude et latitude des villages d'étude. L'observation de l'environnement permet de déterminer l'origine de la signature spectrale de chaque élément sur les images. L'extrapolation peut alors être faite à la zone 10x10 km. Grâce aux observations acquises dans 14 sites, nous avons pu déterminer l'utilisation des sols dans les quatre autres sites où seules les enquêtes entomologiques avaient été faites au mois d'octobre (VCMC, VCMD, VSTA, VTVA) (Annexe 4).

Le résultat de cette extrapolation a été intégré dans une couche d'utilisation des sols, générée et insérée dans le système d'information géographique développé sous logiciel ARCGIS (ESRI). Les superficies en km<sup>2</sup> peuvent ainsi être calculées.

**CORRELATION SURFACES/DENSITES DE VECTEURS.** L'hypothèse de départ est basée sur l'observation de terrain d'un fort lien entre la surface des fermes d'élevage de crevettes et la densité d'*An. sundaicus*. Dans le but de déterminer si une corrélation significative existe, nous avons fait un test entre la superficie des bassins et la densité de vecteurs au mois d'avril 2003 dans les 14 sites d'étude par le test de corrélation de Spearman dans Xlstat 7.1 au seuil 0,05 (Addinsoft).

#### **Encadré IV-3 : Système d'Information Géographique**

Un Système d'Information Géographique (SIG) est une base de données géoréférencées, qui permet de cartographier, et de faire des analyses spatiales, par croisement des données. Cette base de données est composée de couches d'information géoréférencées. Deux types de données composent ces couches. Les données rasters ont pour unité de base le pixel, ce sont essentiellement des images (satellite, photo, carte). Les données de type vecteur sont des polygones, des lignes, des points. Ces dernières sont reliées à des tables attributaires contenant leurs caractéristiques. Dans l'étude des maladies, cet outil tend à être de plus en plus utilisé pour cartographier, entre autres, la distribution des vecteurs, la distribution et l'évolution des cas, les caractéristiques environnementales afin de déterminer les zones à risque et de développer des systèmes de suivi, d'alerte ou de prédiction (Rogers and Williams 1993, Kitron et al. 1994, Sabesan et al. 2000, Rakotomanana et al. 2001, Sithiprasasna et al. 2003, Srivastava and Nagpal 2004).

### **DEVELOPPEMENT DU SIG**

Le SIG (Encadré IV-3) développé dans le cadre du projet MALVECASIA, est composé de deux niveaux. Le niveau 1 est à l'échelle 1/500 000. Il couvre les trois pays (Cambodge, Laos et Vietnam) et comporte des couches de données sur la topologie, le découpage administratif, le climat, les données météorologiques, les zones écogéographiques, l'occupation des sols et la localisation des 100 sites réparties dans les trois pays (20 au Cambodge, 20 au Laos et 60 au Vietnam). Le niveau 2 est actuellement focalisé sur les 60 sites répartis dans tout le Vietnam à l'échelle 1/50 000. L'étude d'*An. sundaicus* se situe à ce niveau au sud Vietnam. La structure et les liaisons du SIG niveau 2 sont présentées dans la Figure IV-5 et les données utilisées sont comme suit :

#### **1. Données géoréférencées (UTM WGS84)**

- Fond de carte province, district et commune (Données vecteurs)
- Images satellites et cartes topologiques sur une surface de 100 km<sup>2</sup> autour du village étudié (Données rasters)
- Positionnement des villages et la table attributaire qui les caractérise, rivières et routes (Données vecteurs)
- Utilisation des sols (identifiée à partir des images satellites) (Données vecteurs)

## 2. Données stockées dans la base ACCESS

- Données entomologiques
- Résultats des bioessais de test de résistance
- Surface de l'utilisation des sols
- Salinité
- Météorologie

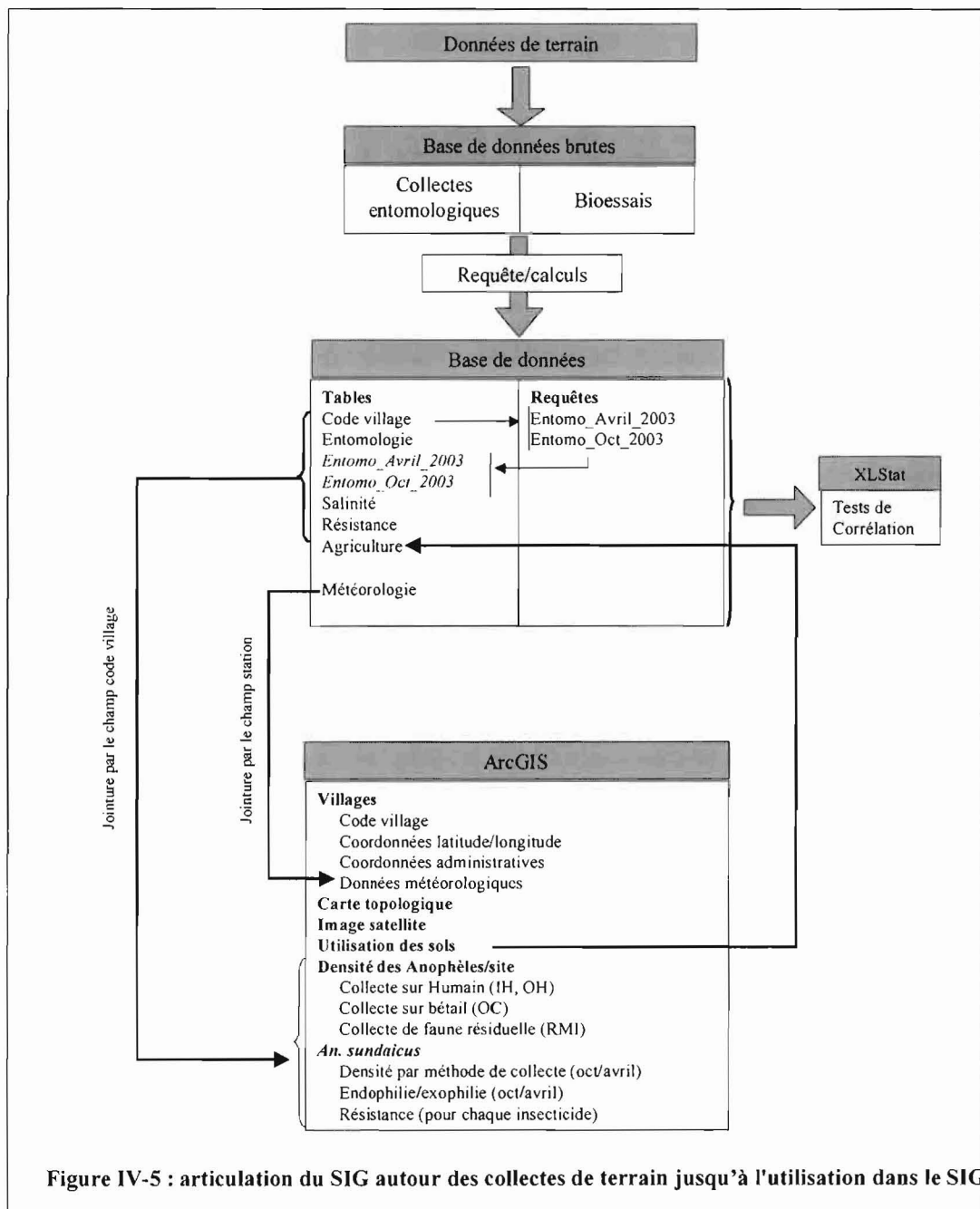


Figure IV-5 : articulation du SIG autour des collectes de terrain jusqu'à l'utilisation dans le SIG

Les données brutes collectées sur le terrain ont été saisies dans des bases ACCESS, à partir desquelles des requêtes de calculs ont été faites et dont les tables de résultats peuvent être insérées dans notre base ACCESS de données du SIG.

Le positionnement des villages à l'aide d'un GPS et la couche de données vecteurs les représentant dans ARCGIS (ESRI) a pour table attributaire : les codes village, le positionnement du village par coordonnées et références administratives, des données météorologiques, ainsi que les références des cartes topographiques et des images satellites de chaque site. Grâce au code village, des données provenant de la table ACCESS (Figure IV-5), peuvent être jointes dans le SIG. Des données complémentaires de météorologie pour toutes les stations du Vietnam et par mois peuvent être jointes à la table village par le champ "station". On peut ainsi représenter les différentes données spatialement. Le logiciel ARCGIS (ESRI) nous a aussi permis de réaliser la table « surface agricole » en créant pour chaque site une couche de données de type vecteur représentant l'utilisation des sols à partir d'image satellite (raster) et nous permettant de calculer les superficies de chaque classe d'occupation des sols.

## DIVERSITE ET DENSITE ANOPHELIENNE

Un total de 9 espèces a été collecté sur les 18 sites prospectés au sud Vietnam :

<i>An. barbirostris</i>	<i>An. subpictus</i>	vecteur secondaire
<i>An. campestris</i>	<i>An. sundaicus</i>	vecteur principal
<i>An. indefinitus</i>	<i>An. tessellatus</i>	vecteur secondaire
<i>An. nimpe</i>	<i>An. vagus</i>	vecteur secondaire
<i>An. sinensis</i>		vecteur secondaire

*An. sundaicus* est majoritaire dans 16 des 18 sites sur appât humain et quelque soit la saison (Figures IV-7, IV-8, IV-9, IV-10). Il était absent du site VKGB (collecte avril/mai 2003) et en faible densité à VTGB (avril/mai 2003). Aux mois d'octobre/novembre, *An. sundaicus* est toujours majoritaire mais la densité relative d'*An. nimpe* par rapport à celle d'*An. sundaicus* est plus importante qu'au mois d'avril. *Anopheles sundaicus* est largement collecté sur appât humain (Figures IV-7, IV-8, IV-9, IV-10, IV-11, IV-12) et en faune résiduelle (RMI) (Annexe 5). Les densités d'*An. sundaicus* sur appât humain sont comprises entre 0 et 156,81 moustiques par nuit et par homme (Annexe 4). Elle est l'unique espèce dans les sites VCMA, VCMB, VCMD, VLAB (Figures IV-7, IV-8, IV-9, IV-10). Les espèces secondaires énoncés par Phan (1998), ont été collectées excepté *An. aconitus*. Cependant, ces espèces sont en faible densité comparée à *An. sundaicus*.

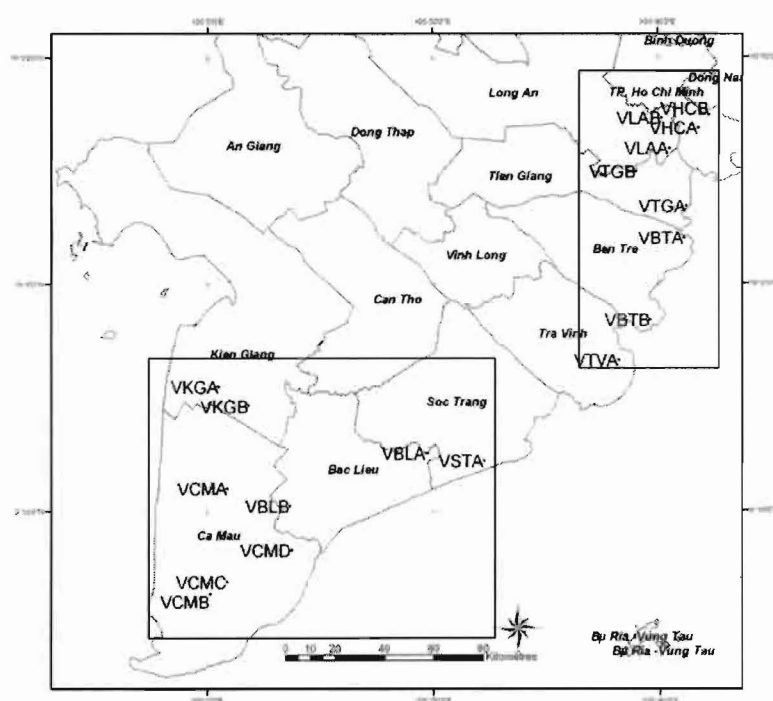


Figure IV-6 : répartition des sites d'étude dans les provinces du sud Vietnam. Les sites sont identifiés par leur code village (Table IV-2). Les rectangles représentent le découpage réalisé pour les cartes présentées ci-après

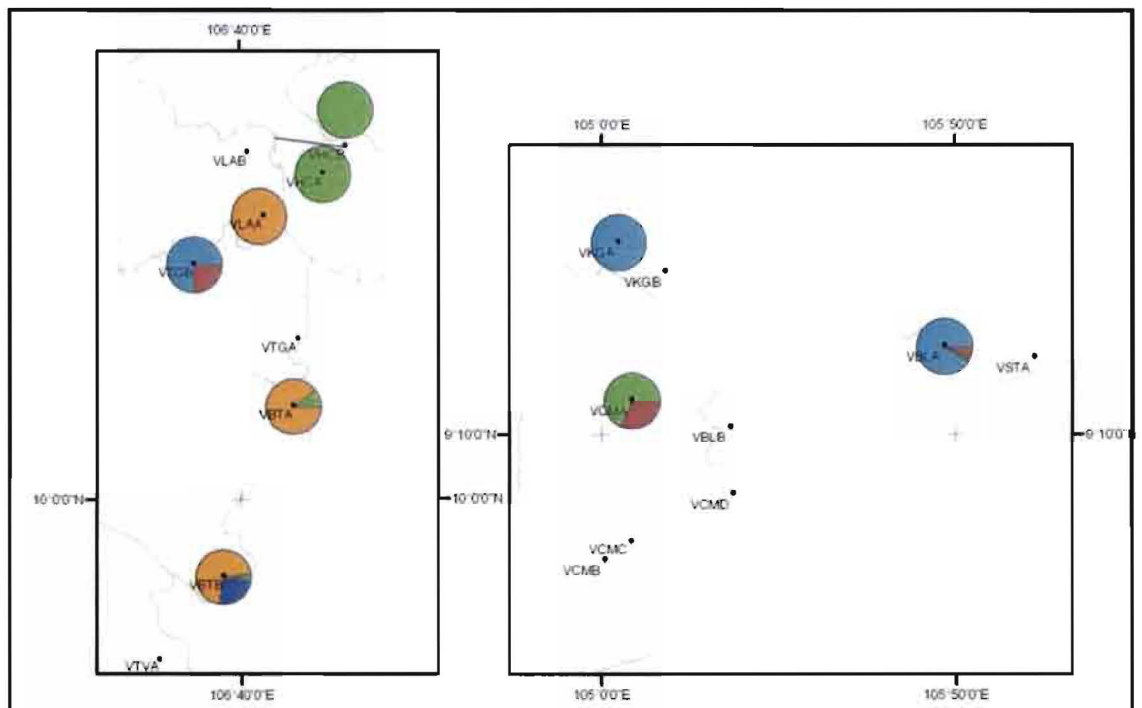
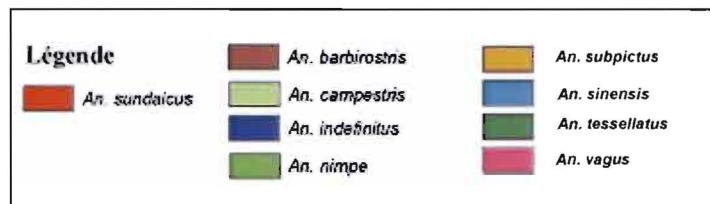
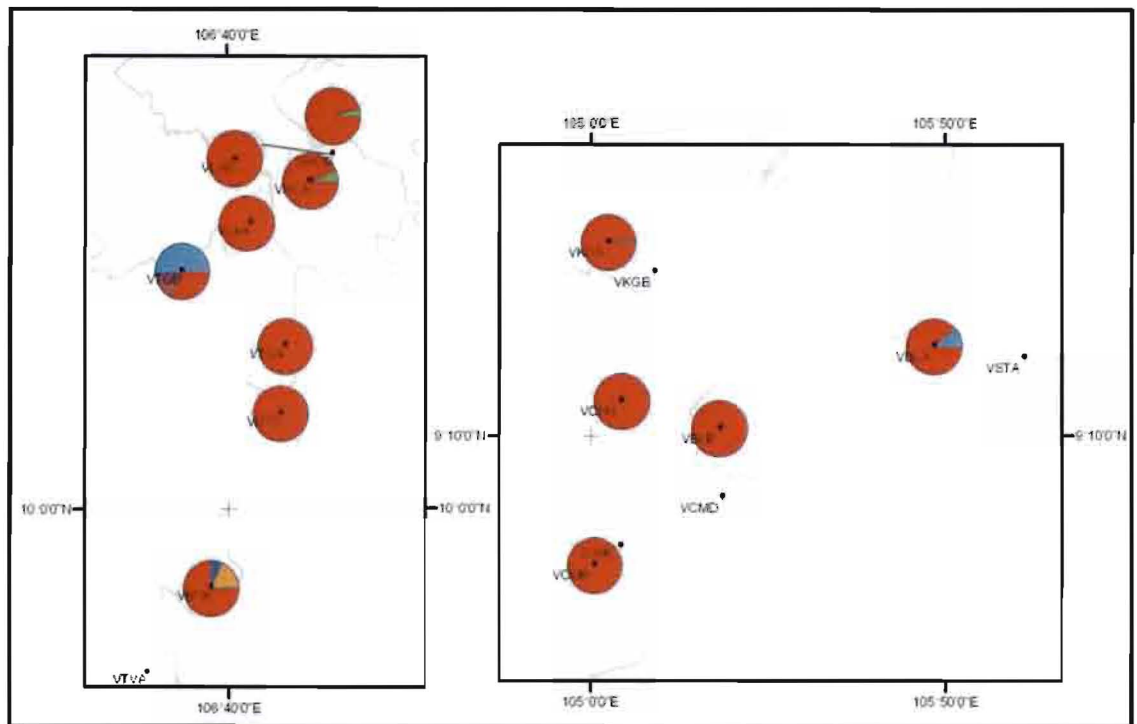


Figure IV-7 (en haut) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes (nombre de moustiques capturés par maison par nuit) capturées sur appât humain en avril/mai 2003 incluant les densités d'*An. sudaicus*.

Figure IV-8 (en bas) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur appât humain en avril/mai 2003 n'incluant pas les densités d'*An. sudaicus*

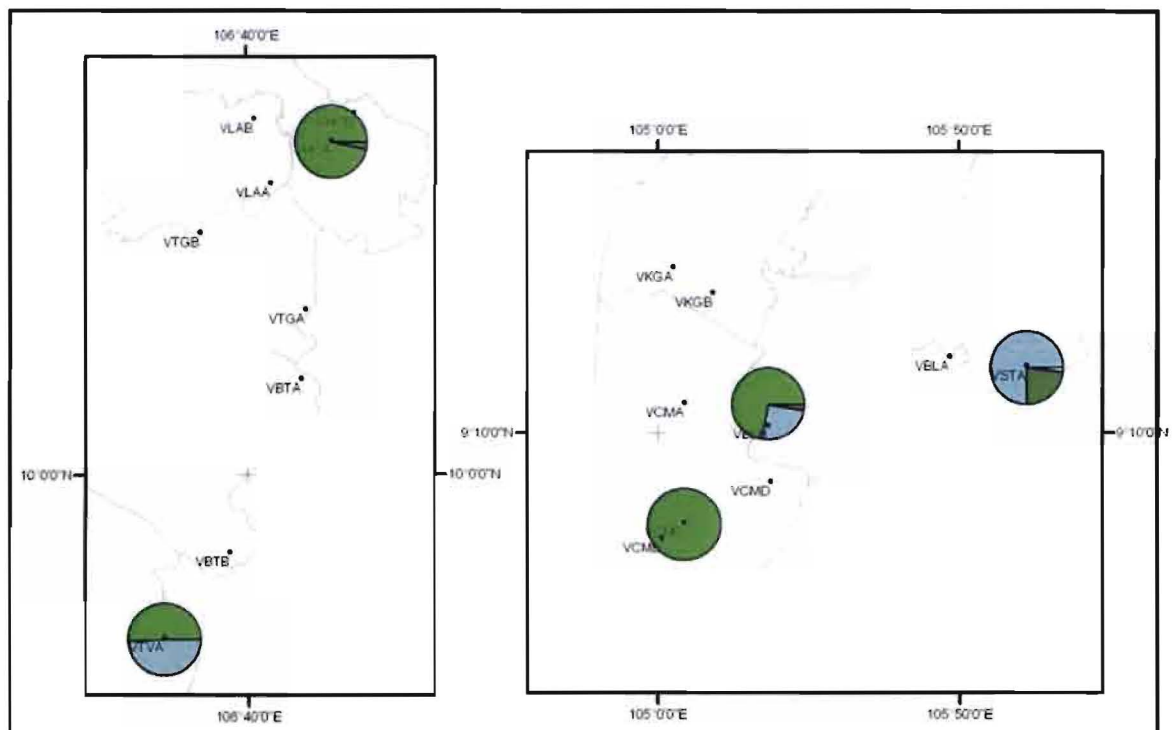
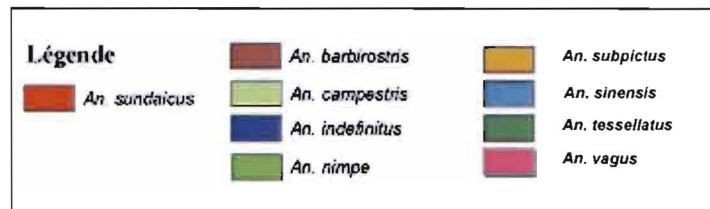
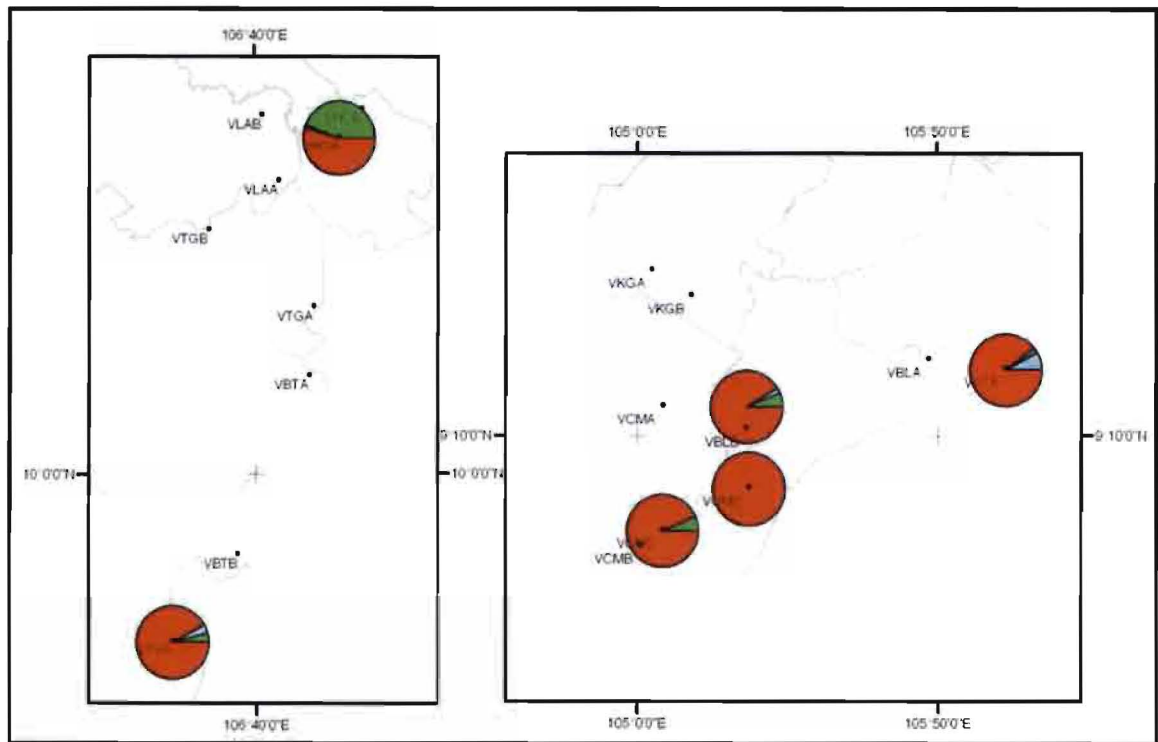


Figure IV-9 (en haut) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur appât humain en octobre/novembre 2003 incluant les densités d'*An. sudaicus*

Figure IV-10 (en bas) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur appât humain en octobre/novembre 2003 n'incluant pas les densités d'*An. sudaicus*

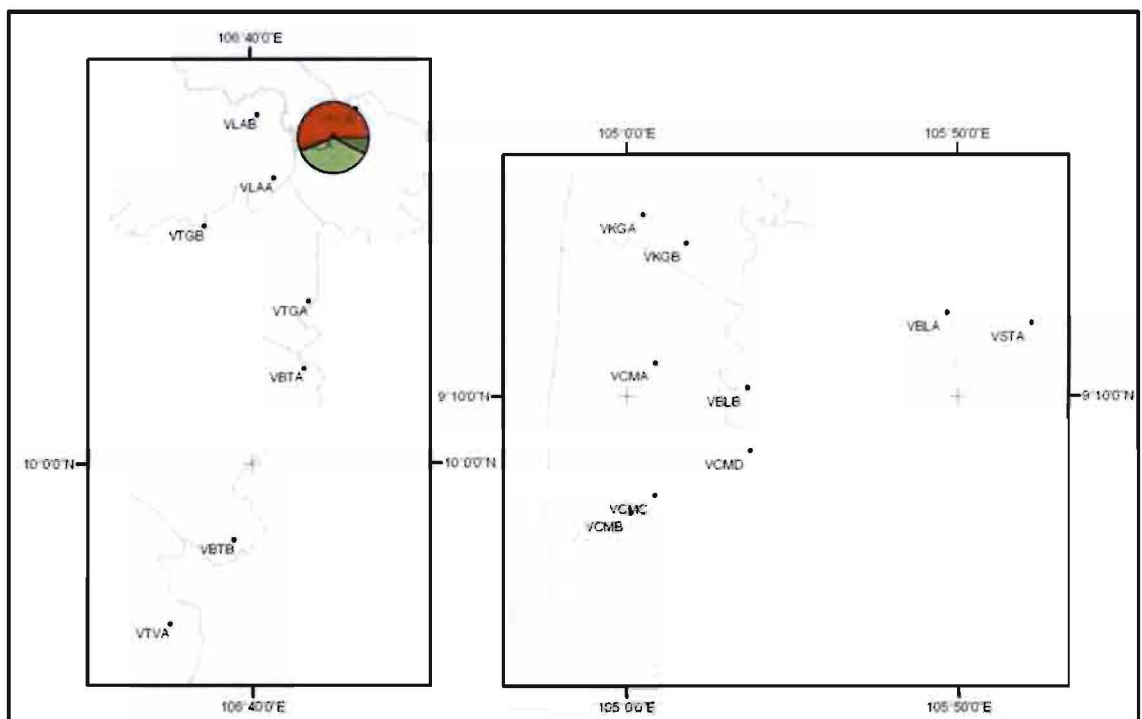
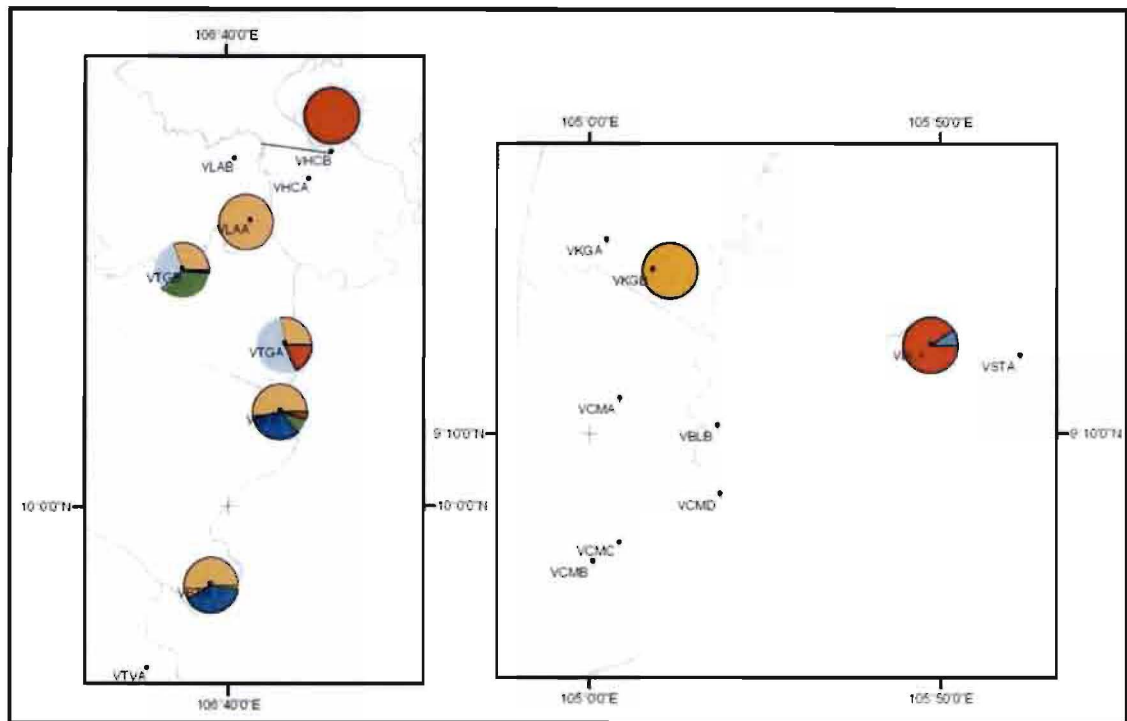


Figure IV-11 : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur bétail en avril/mai 2003 (nombre de moustiques capturés par maison par nuit)

Figure IV-12 : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur bétail en octobre/novembre 2003 (nombre de moustiques capturés par maison par nuit)

## COMPORTEMENT TROPHIQUE D'*AN. SUNDAICUS* AU SUD VIETNAM

*Anopheles sundaicus* est majoritairement anthropophile (Figure IV-14et IV-15). Il est zoophile dans les sites de VBLA, VHCB, VKGB et VTGB en avril 2003 et VHCA en octobre 2003.

*Anopheles sundaicus* est endophage ou exophage sur appât humain selon les sites (Figure IV-13). Il pique à l'intérieur des habitations avec un pourcentage supérieur à 50% dans la province de Ca Mau à l'extrême sud du Vietnam (VCMA, VCMB, VCMC et VCMD) et d'Ho Chi Minh (VHCA). Il pique à l'intérieur entre 30% et 50% dans les provinces de Bac Lieu (VBLA et VBLB), de Ben Tre (VBTA etVBTB), de Ho Chi Minh (VHCA) et de Kien Giang (VKGA).

Enfin, les femelles piquent préférentiellement entre 22h et 23h.

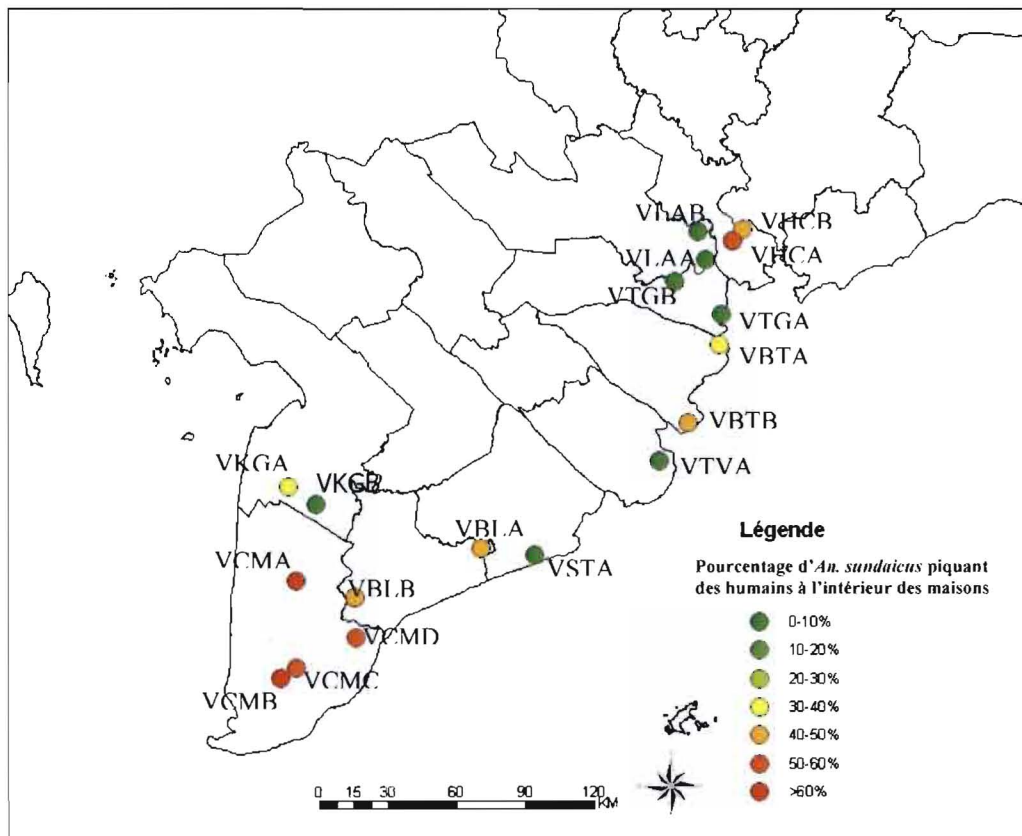
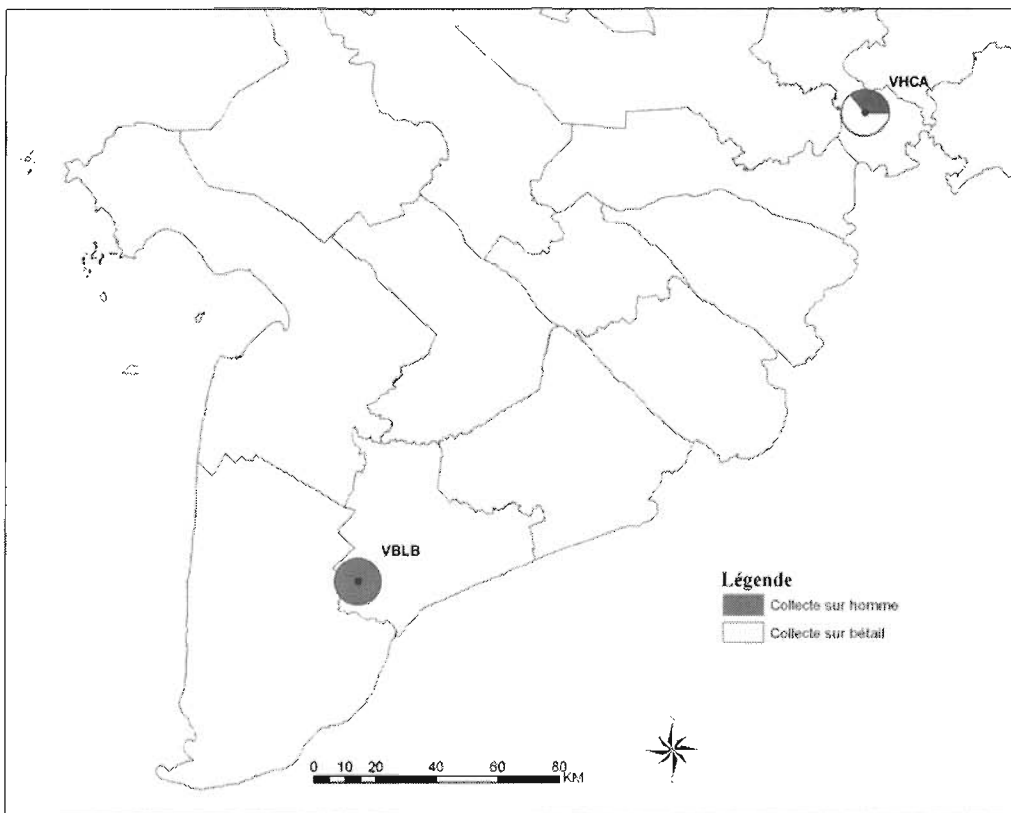
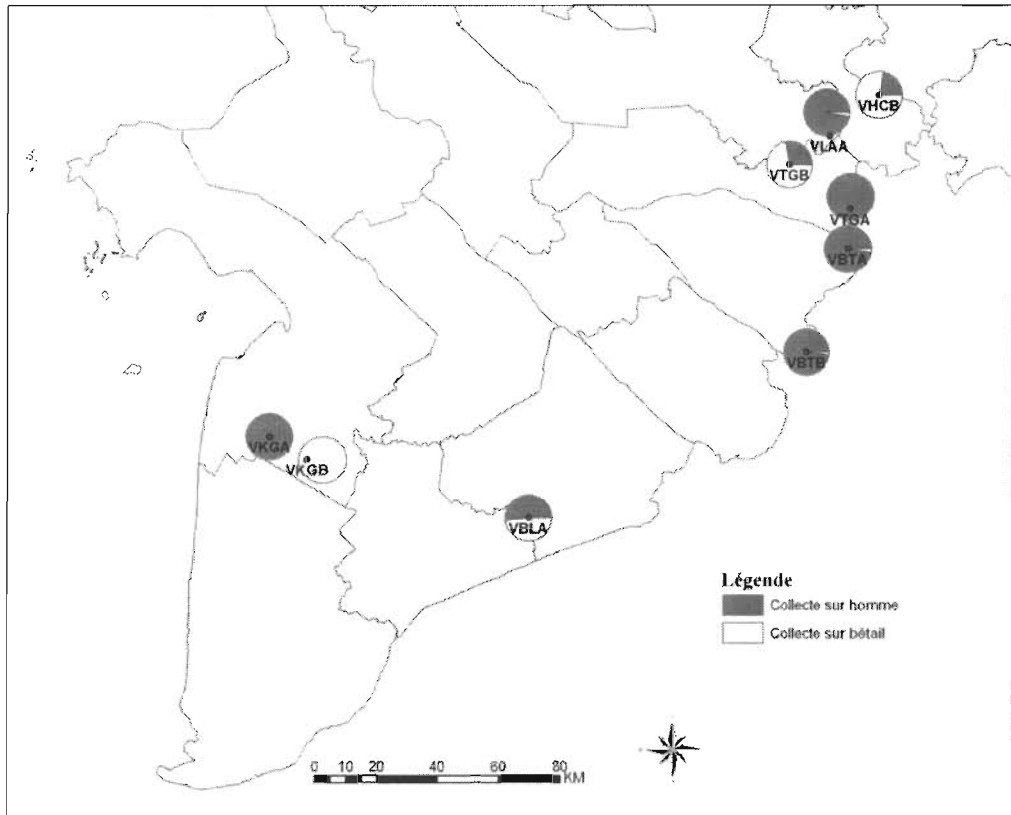


Figure IV-13 : pourcentage d'*An. sundaicus* piquant les hommes à l'intérieur des maisons selon le calcul  $(\text{densité d}'An. sundaicus / \text{homme} / \text{nuit à l'intérieur}) / (\text{densité d}'An. sundaicus / \text{homme} / \text{nuit à l'intérieur} + \text{de densité d}'An. sundaicus / \text{homme} / \text{nuit à l'extérieur})$



**Figure IV-14 (en haut): proportions relatives de la densité d'*An. sudaicus* capturées sur appât humain et de la densité d'*An. sudaicus* capturées sur bétail en avril/mai 2003**  
**Figure IV-15 (en bas) : proportions relatives de la densité d'*An. sudaicus* capturées sur appât humain et de la densité d'*An. sudaicus* capturées sur bétail en octobre/novembre 2003.**

## CARACTERISATION ENVIRONNEMENTALE D'*AN. SUNDAICUS* DANS LE SUD

Les observations et résultats présentés dans ce paragraphe feront l'objet d'une publication : **Dusfour I. et al. Impact of shrimp farm development on *An. sundaicus* density and malaria cases in Southern Vietnam. in preparation.**

Les 18 sites d'étude se situent dans les zones soit à eau saumâtre dominante, soit à eau douce dominante soit des marécages, telles qu'elles ont été décrites dans le niveau 1 du SIG du projet MALVECASIA. La Figure IV-16 représente la position des sites. La zone d'influence de la marée s'étend largement à l'intérieur des terres (30 à 40 km) et touche la plupart des sites. Seuls les sites de VCMA, VLAB, VKGA, VKGB et VTGB sont en limite ou hors de l'influence des marées (Figure IV-15).

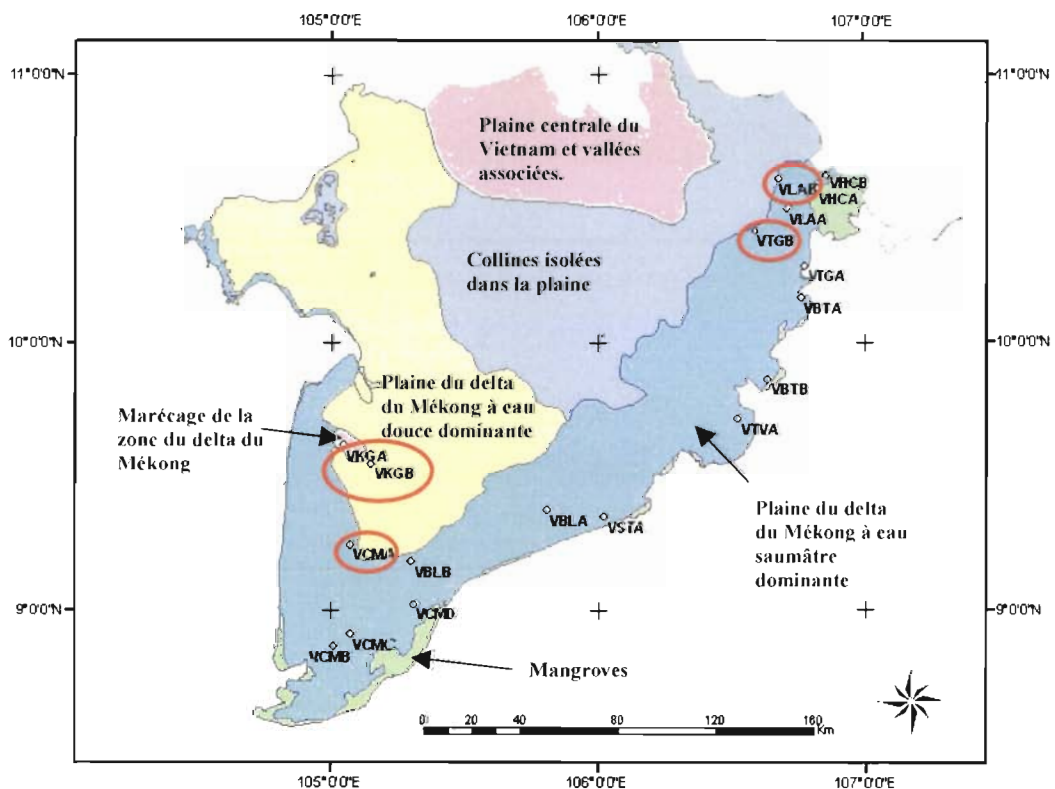


Figure IV-16 : localisation des 18 sites d'étude dans les zones écogéographiques du sud Vietnam. Les sites cerclés d'orange sont en limite ou hors de l'influence des marées.

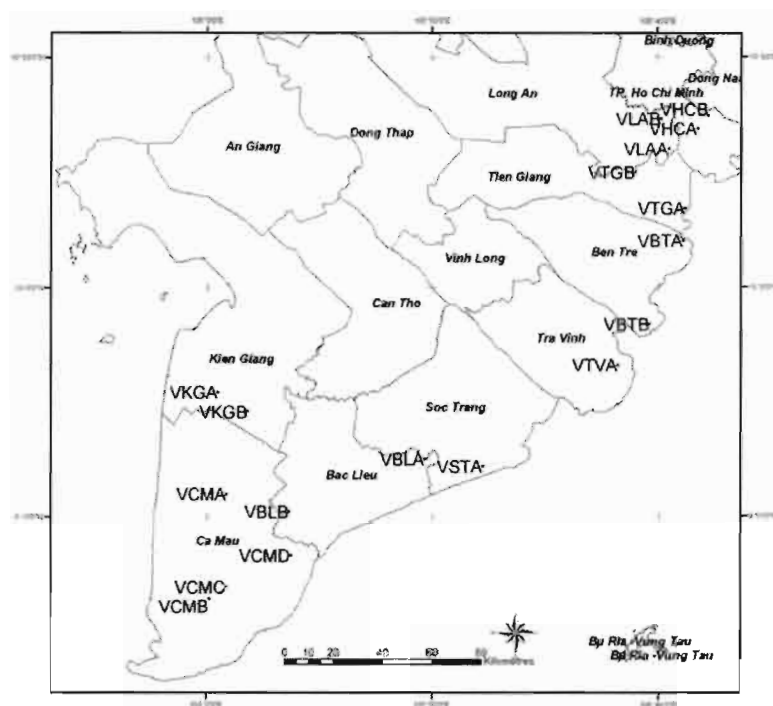


Figure IV-17 : répartition des sites d'étude dans les provinces du sud Vietnam

## OBSERVATIONS DE TERRAIN

Les caractéristiques de chaque site sont décrites dans la Table IV-3.

**Utilisation de sols.** Les sites de la province de Ca Mau (**VCMA**, **VCMB**), et le site **VBLB** dans la province de Bac Lieu sont exclusivement voués à l'élevage des crevettes. Mangroves, cocotiers et bananiers caractérisent la végétation environnante. Dans la province d'Ho Chi Minh, district de Can Gio (**VHCA**, **VHCB**), un processus de déforestation de la mangrove est en cours pour développer l'élevage de crevettes.

Les villages d'étude dans la province de Kien Giang (**VKGA**, **VKGB**) se trouvent dans une zone de culture irriguée du riz et d'arbres fruitiers. Les fermes d'élevage de crevettes ne sont pas directement au contact des sites d'étude. La plus proche ferme d'élevage de crevettes est à 1 km de **VKGA** et de 10 km de **VKGB** ce qui explique la présence d'*An. sudaicus* dans le site **VKGA** où l'eau est douce (Table IV-3).

Dans les autres sites, il y a gestion et séparation de l'eau de mer et de l'eau douce ou bien alternance riz et bassins d'élevage selon la saison de pluie (eau douce) et saison sèche (eau saumâtre). Dans le site **VBLA** de la province de Bac Lieu, les bassins de crevettes et les champs de riz sont voisins. Dans la province de Tien Giang (**VTGA**, **VTGB**), les digues empêchent l'eau de mer d'inonder la culture du riz. Seul un bandeau de côte et d'estuaire reste sous l'influence des marées et permet le développement de l'élevage de crevettes en saison sèche. Dans ces sites, en saison des pluies, les bassins d'élevage de crevettes sont asséchés. En plus du riz et de l'élevage de crevettes, il y a présence de cultures annuelles et pérennes. **VBTA** et **VBTB**, de la province de Ben Tre, ont fortement développé les fermes de crevettes, mais la présence de dunes favorise aussi les cultures

maraîchère et légumière. Enfin, les sites VLAA et VLAB présentent une alternance de riziculture et fermes de crevettes selon les saisons, en plus de la riziculture classique.

	Agriculture/ Aquaculture	Végétation naturelle	Gestion de l'eau	Distance à la mer	Influence de l'eau de mer	Salinité des rizières (g/l)	Salinité des fermes d'élevage de crevettes (g/l)	Salinité des mares (g/l)	Salinité du canal (g/l)
VBLA	R, FC	C, B	OUI	15 km	Saisonnière	1.1	1.9	1.3	1.1
VBLB	FC	C, B	OUI	20 km	Permanente		33	7.3	UN
VBTA	FC, R, AP, F	M, C, B	NON	6 km	Saisonnière		10.5	12.5	30.5
VBTB	FC, R, AP, F	C, B	NON	4 km	Saisonnière	12	11	5	13
VCMA	FC	C, B	NON	30 km	Saisonnière		2.5	2.54	2.2
VCMB	FC	C, B, M	NON	15 km	Permanente		49	12.8	45-47
VHCA	FC	M	OUI	15 km	Saisonnière		18	17	29
VHCB	FC	M	OUI	18 km	Saisonnière			17,5	
VKGA	R, FC, Rt	C, B, E	OUI	25 km	Rare			0.4	1
VKGB	R, F	C, B, E	OUI	36 km	Rare			1	0.5
VLAA	R, FC	B	OUI	13 km	Saisonnière	7	10	2.3	8.8
VLAB	R, FC	B	OUI	24 km	Saisonnière	17			
VTGA	FC, AP	C, E	OUI	0 km	Saisonnière		7-30		3
VTGB	R, FC	C, B, E	OUI	15 km	Saisonnière	0.1	0.2	0.2	

**Table IV-3 : caractéristiques environnementales des sites visités. B=bananier, C=cocotier, E=eucalyptus, F=arbres fruitiers, FC=ferme de crevettes, AP=culture annuelle/pluriannuelle, M=mangrove, R=rizière, Rt=reforestation**

**Salinité et influence de la mer.** La salinité de l'eau a été mesurée en g/l. Une eau dont la salinité est inférieure à 0,5g/l, est douce, alors que celle de l'eau de mer est aux environs de 35g/l. Entre ces deux valeurs, l'eau est considérée comme saumâtre. Les prélèvements ont été effectués en début de saison sèche. On constate que VHCA, VBLB et VCMB ont des salinités proches de celles de l'eau de mer. La salinité dans les sites VKGA, VKGB et VTGB est proche de l'eau douce. La variation de densité d'*An. sondaicus* au cours de l'année est corrélée à la variation de la salinité (Phan 1998). La

proximité des fermes d'élevage de crevettes (1 km) du site VKGA explique la présence d'*An. sundaicus*, en l'absence d'eau saumâtre tout au long de l'année dans ce site (zone écogéographique de marécage). La distance de 10 km entre le site de VKGB et les fermes d'élevage de crevettes ainsi que l'absence d'eau saumâtre tout au long de l'année (zone écogéographique à dominante d'eau douce) peut expliquer l'absence d'*An. sundaicus*. Par ailleurs, les mois de novembre et décembre sont des mois de faible densité d'*An. sundaicus* et de faibles valeurs de salinité alors que le pic de densité de cette espèce est en avril/mai qui est aussi une période de haute salinité. Cette observation explique la présence d'eau douce à VTGB en novembre/décembre et la présence d'*An. sundaicus* en avril (fin de la saison sèche) dans ce site influencé saisonnièrement par les marées. Les autres sites possèdent de l'eau saumâtre. Les sites visités peuvent être classés en fonction de l'influence des marées : permanente, saisonnière ou rare (Table IV-3). Cette influence est corrélée à la distance entre le site et la mer, et en relation avec la gestion de l'eau qui influe sur la facilité de pénétration de l'eau dans les terres.

**Gîtes larvaires.** L'élevage de crevettes est très présent dans les sites où *An. sundaicus* a été collecté. Mais, il est absent dans le site VKGB où *An. sundaicus* est absent. Ce site n'est pas sous influence de la marée. Ces observations vont dans le sens des observations précédentes de fort lien entre les bassins de crevettes et la présence d'*An. sundaicus*. En effet, *An. sundaicus* est connu pour être lié à des bassins ou des mares naturelles contenant de l'eau saumâtre, très ensoleillés avec une végétation immergée et/ou émergente et la présence indispensable d'algues filamenteuses flottantes, ce qui correspond à la description de la majorité des bassins d'élevage de crevettes. La collecte des larves dans les bassins d'élevage de crevettes nous a permis de confirmer, après identification des adultes émergents, que ces bassins sont propices à *An. sundaicus*. Les éléments indispensables à sa présence sont les algues filamenteuses flottantes dans lesquelles les larves se nourrissent et se protègent, et un grand ensoleillement. Les bassins sont de tailles différentes, mais la profondeur est faible variant de 30 cm aux environs de 1 m. La majorité des gîtes larvaires étaient des bassins d'élevage de crevettes. Seule une mare naturelle à Can Gio (province d'Ho Chi Minh) correspondant aux critères cités ci-dessus, hébergeait aussi des larves d'*An. sundaicus*.

**Conclusions.** *Anopheles sundaicus* est associé à différents environnements dans lesquels la présence de bassins d'élevage de crevettes est une constante. L'observation des bassins d'élevage de crevettes et les collectes de stades immatures menées en novembre/décembre, ont permis de confirmer que ces bassins procurent des gîtes propices aux larves d'*An. sundaicus* lorsqu'ils ont des algues filamenteuses flottantes et sont ensoleillés.

## CARACTÉRISATION DES SOLS AUTOUR DES VILLAGES - UTILISATION DE LA TÉLÉDÉTECTION

D'après les observations de l'environnement autour du village et son positionnement sur les images satellites, une extrapolation manuelle de l'utilisation des sols a été faite sur une zone de 10X10 km autour du village. Les bassins d'élevage sont faciles à identifier par observation directe grâce à leur forme caractéristique. L'automatisation de la classification de l'image raster n'a pas été possible par l'utilisation directe d'ARCGIS. La similitude entre une rizière en eau dont la forme est carrée et de couleur bleue et des bassins d'élevage de crevettes également bleus mais rectangulaires n'a pas permis une distinction automatisée fiable.

D'une façon générale, la végétation a une signature spectrale rouge (camaïeu de rouge selon la végétation), les sols nus sont blancs (maisons, terrains non cultivés) et l'eau apparaît bleue. La reconnaissance manuelle a été plus aisée que des traitements automatisés de l'image d'autant que les rizières, par exemple, peuvent apparaître blanches (à sec), bleues (en eau) ou rouges (végétation en croissance) (Annexe 4).

Après création des couches de type vecteur reflétant l'occupation des sols autour de chaque site, les superficies de chacune des classes ont pu être calculées (Annexe 4). Les surfaces agricoles ont été obtenues pour chacun des 18 sites comme décrits dans la Table IV-4.

Code Village	densité d' <i>An. sundanicus</i> collecté sur homme	Fermes de crevettes	Fermes riz et Crevettes	Mangrove déforestée	Mangrove	Riz	Cultures pérennes	Cultures mixtes
VBLA	20,25	23,49	0	0	0	57	0	0
VBLB	49,9	64,86	16,88	0	0	0	0	0
VBTA	75,63	37,301	0	16,7	0	0	0	5,829
VBTB	37,61	54,56	0	2,17	18,01	0	0	15,75
VCMA	40,25	66,165	0	0	0	0	0	58
VCMB	35	72,32	0	0	0	0	0	0
VCMC	156,81	78,18	0	0	0	0	0	0
VCMD	143,98	83,31	0	0	0	0	0	0
VHCA	106,16	42,62	0	41,25	25,47	0	0	0
VHCB	17,94	8,37	0	79,43	2,933	0	14,42	47,66
VKGA	31,25	17,93	0	26,88	0	0	0	54,48
VKGB	0	4,49	0	7,69	0	0	0	5,55
VLAB	39,18	26,51	1,6	0	2,08	31,39	0	0
VLAA	26	0	45,89	0	0	38,47	0	0
VSTA	43,65	42,36	0	0	4,11	26,56	0	0,382
VTGA	11,71	9,66	0	0	4,11	26,56	0	0,382
VTGB	0,16	9,624	5,02	0	0,212	73,2	0	0
VTVA	42,26	32,67	0	0	1,98	0	0	15,2

**Table IV-4 : surfaces agricoles en km<sup>2</sup> des 100 km<sup>2</sup> autour de chaque site et densité collectée sur appât humain en avril-mai et octobre 2003 pour les sites VCMC, VCMD, VSTA et VTVA (nombre de moustiques / homme / nuit).**

### **IMPACT DES FERMES D'ÉLEVAGE DE CREVETTES SUR LA DENSITÉ D'*AN. SUNDAICUS***

A partir des surfaces de chaque classe d'utilisation des sols (Table IV-4) et des densités d'*An. sundaicus* capturés sur homme, nous avons pu confirmer que les densités d'*An. sundaicus* sont corrélées à la surface de bassins d'élevage de crevettes dans une surface de 100 km<sup>2</sup> autour du village où les collectes ont été faites. Le coefficient de corrélation de Spearman entre ces deux variables est de 0,736 et il est hautement significatif ( $p=0,003<0,05$ ), alors qu'il ne l'est pas pour les tests effectués entre la densité et les autres catégories d'utilisation des sols (Table IV-5).

Surface km <sup>2</sup>	Fermes de crevettes	Fermes riz et crevettes	Rizières	Mangroves déforestées	Mangroves	Cultures
Coefficient de Spearman	<b>0,736</b>	-0,006	-0,331	0,122	0,034	-0,068
Significativité (0.05)	<b>0,003</b>	0,985	0,248	0,679	0,908	0,817

**Table IV-5 : résultat du test de corrélation de Spearman entre la densité d'*An. sundaicus* et les surfaces agricoles. La valeur significative est en gras.**

## RESISTANCE

Les résultats des tests de résistance présentés ici ont été faits dans 11 des 18 sites où *An. sudaicus* a été collecté en avril 2003 en nombre suffisant pour effectuer les bioessais. Aucune population d'*An. sudaicus* n'a été reportée résistante pour cette période. Le nombre d'individus résistants au DDT 4% est très faible et localisé dans les provinces de Ben Tre et d'Ho Chi Minh (Figure IV-14a). Les tests de résistance effectués avec les pyréthriinoïdes, montrent que le pourcentage d'individus résistants est plus élevé et réparti dans tous les sites d'étude (Figure IV-14b, c et d). Le pourcentage n'est cependant pas supérieur au seuil critique de 80% qui serait l'indicateur de populations résistantes. La résistance d'*An. sudaicus* dans ces sites doit être surveillée. Ce constat est inquiétant puisque les pyréthriinoïdes sont les insecticides les plus utilisés en santé publique et que les populations résistantes semblent être en cours d'expansion.

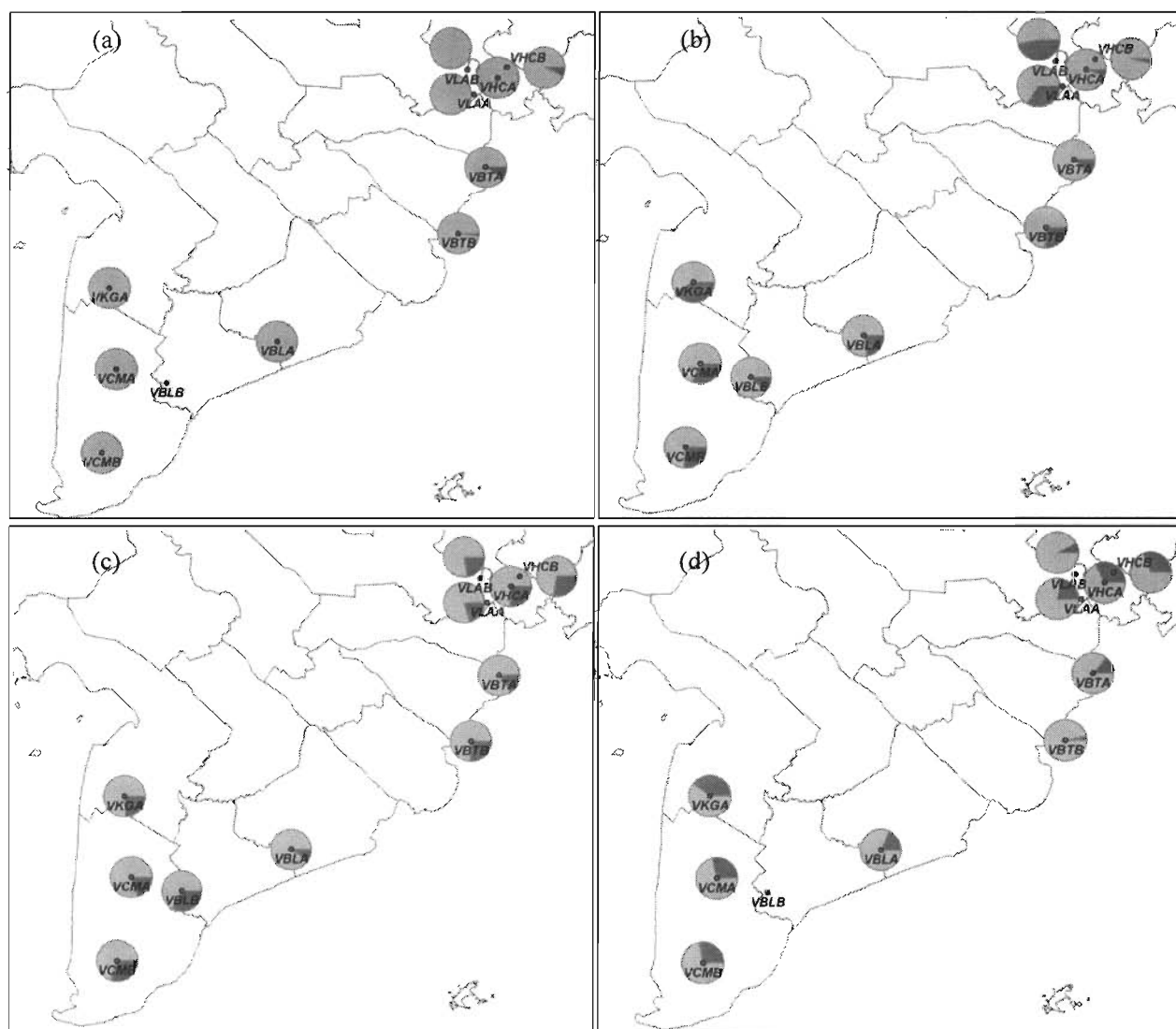


Figure IV-18: proportions relatives d'*An. sudaicus* sensibles (gris clair) et résistants (gris foncé) au DDT 4% (a), à la perméthrine 0,75% (b), à la lambda-cyhalothrine 0,05% (c) et à l'alpha-cyperméthrine 30 mg/ml (d).

---

**CARACTERISTIQUES ENVIRONNEMENTALES ET PRESENCE D'AN. SUNDAICUS**

*Anopheles sundaicus* a été collecté en fortes densités lors de notre étude en avril et octobre 2003, même hors des périodes connues de pic de densité (avril-mai). Comme nous l'avons montré, cette espèce est fortement liée aux bassins d'élevage de crevettes. Les caractéristiques générales et constantes des gîtes larvaires sont des étendues d'eau stagnante, avec une fourchette de salinité allant de l'eau saumâtre à des concentrations plus élevées que l'eau de mer, contenant des algues filamenteuses flottantes, et exposé à un fort ensoleillement. Déterminer la présence d'*An. sundaicus* passe par le recoupement des caractéristiques générales des sites prospectées au sud Vietnam avec l'aire d'influence de la mer et les zones de rétention d'eau saumâtre. La création des gîtes larvaires est favorisée par des zones où le drainage et le lessivage ne sont pas trop importants afin de retenir l'eau. Le développement d'un SIG mené par le Malaria Research Center (Srivastava and Nagpal 2004) en Inde, à partir des données récoltées sur les îles Andaman et Nicobar, a d'ailleurs relevé qu'une pluviométrie supérieure à 1 600 mm n'était pas favorable à *An. sundaicus*. Dans notre cas, un premier test a été effectué à l'échelle du Vietnam où la distribution d'*An. sundaicus* est relativement bien décrite. Deux types critères ont été pris en compte, climatiques et de zones sous influence des marées. Le recoupement de la zone climatique où la température moyenne annuelle est supérieure à 25°C, la saison des pluies dure 6 à 7 mois, la différence de température journalière est entre 5° et 7°C et la saison sèche est supérieure à 3 mois, avec la région de la plaine sous influence d'eau saumâtre ou mangrove (déforestée ou non), correspond à la distribution des zones inondées du sud Vietnam (analyse des images satellites) et à la zone de distribution. Ce recoupement exclut certaines régions comme le delta du Fleuve Rouge, au nord du Vietnam, où *An. sundaicus* est absent. La zone résultante de ce recoupement se situe sur la côte de la province de Vung Tau jusqu'à la province de Kien Giang (Figure IV-18). Cependant, elle ne correspond pas tout à fait à celle décrite par Phan (1998) qui s'étend en-dessous du 11<sup>ème</sup> parallèle (au sud de Phan Thiet). La zone entre Vung Tau et Phan Thiet ne comporte pas de zone d'eau saumâtre comme plus au sud, mais plutôt des dunes (résultat SIG Niveau 1) et aucune zone inondée n'a été observée sur les images satellites. La confirmation sur le terrain de tels critères pour prédire la présence du vecteur est nécessaire. De plus, la distribution obtenue a été basée sur des paramètres décrit à une échelle 1/500 000 sur l'ensemble du Vietnam, une première précision d'ordre écologique à une échelle plus fine, le long de la côte, est une étape obligatoire pour améliorer cette méthode de prédiction. Ensuite, l'inclusion de sites pour lesquels *An. sundaicus* est présent, mais l'aquaculture absente, sera indispensable afin de déterminer les caractéristiques de gîtes larvaires naturels et leur possible visualisation par télédétection.

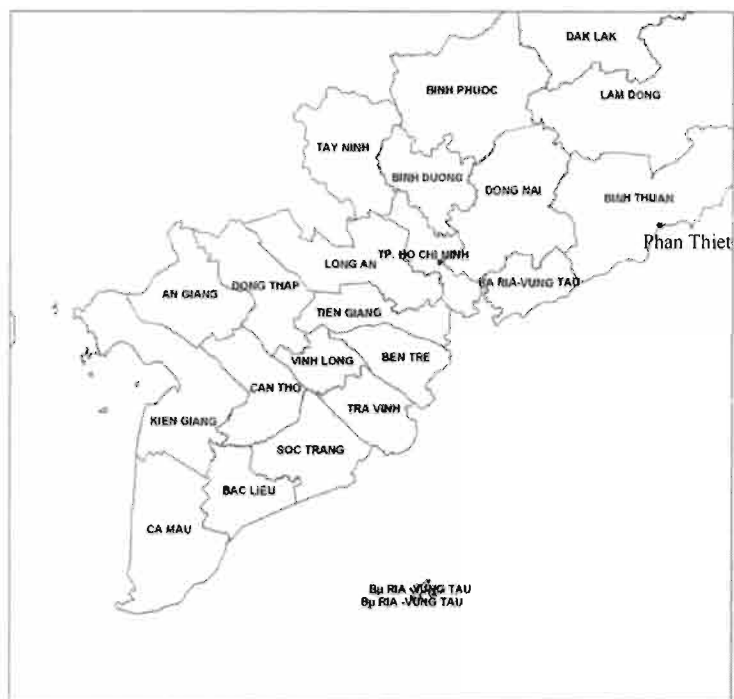


Figure IV-19 : carte des provinces du sud du Vietnam

Par ailleurs, la culture de crevettes est une activité économique lucrative et donc en expansion dans la plupart des autres pays d'Asie du sud-est (Shang et al. 1998). La superficie des élevages en eau saumâtre est un bon indicateur de la densité d'*An. sundaicus* et de la menace dans des zones où le contrôle du paludisme n'est pas aussi rigoureux qu'au Vietnam. L'identification facile des bassins d'élevage grâce à la télédétection permettra d'avoir un suivi dans le temps de l'impact de ces élevages. En effet, une recrudescence d'*An. sundaicus* dans le sud Vietnam et notamment dans le site VBLB de Bac Lieu, a été observée entre 1997 et 1999 (Trung et al. 2004). Des collectes entomologiques tous les quatre mois ont eu lieu entre 1997 et 2001 dans ce site, accompagnées d'un suivi des cas de paludisme. La télédétection nous permettra de calculer à différentes dates sur les dix dernières années, la superficie des bassins, afin d'évaluer la corrélation entre l'essor des fermes de crevettes et l'augmentation des densités d'*An. sundaicus* et aussi, de voir quel a été l'impact sur la transmission du paludisme au sud Vietnam. L'augmentation des fermes d'élevage a entraîné la déforestation massive des mangroves et la diminution des surfaces rizicoles. La conséquence en a été un changement de la faune des moustiques, mais aussi de la biodiversité liée à l'écosystème particulier des mangroves (Kathiresan and Bingham 2001). Les agriculteurs commencent aussi à se poser la question de l'impact de cette déforestation des mangroves. En effet, dans la plaine du Mékong le drainage et le lessivage consécutifs à l'absence de végétation, a eu pour conséquence l'acidification des sols de la plaine alluvionnaire. Face à ce changement important menaçant l'agriculture, les riziculteurs ont notamment développé des méthodes de rétention d'eau douce (Husson et al. 2000). De même, dans la province de Kien Giang très touchée par ce phénomène d'acidification des sols, un programme de reforestation est en cours (obs. pers.).

---

## COMPORTEMENT ET STATUT DE RESISTANCE

Le nombre de cas de paludisme dans le sud Vietnam a régulièrement diminué depuis les années 90s (Phan 1998, Erhart et al. 2004) signe que la maladie est actuellement sous contrôle dans cette région. Cependant, *An. sundaicus*, de par ses densités, reste une nuisance domestique et une menace car impliqué dans des épidémies (Sen 1938, Phan 1977, Nagpal and Kalra 1997). La connaissance précise et le contrôle de ce vecteur permettra de prévenir toute résurgence du paludisme. Les collectes effectuées dans le cadre du présent projet ont montré qu'*An. sundaicus* est majoritairement anthropophile bien qu'opportuniste (il peut piquer le bétail), et pique essentiellement en milieu de nuit (22h-23h). De plus, *An. sundaicus* peut être autant exophage qu'endophage. L'hétérogénéité de comportement observée dans le sud du Vietnam est caractéristique d'*An. sundaicus* sur toute sa distribution (voir Article 1). Lorsqu'il est endophage, la stratégie de prévention est essentiellement basée sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées. Le cas d'exophagie pose d'autres problèmes si les personnes dorment dehors. En effet, les protections sont plus difficiles à appliquer. Par ailleurs, étant donné qu'*An. sundaicus* est aussi collecté dans la faune résiduelle matinale, à l'intérieur des maisons (Annexe 5), les pulvérisations intradomiciliaires sont indispensables car efficaces. La couverture insecticide en terme de santé publique à une échelle locale n'est pas encore précisément connue. Elle permettra, lors de l'obtention de l'information par le projet, de mettre à jour les relations de causes à effets possibles entre les pulvérisations ou l'utilisation des moustiquaires imprégnées et les comportements trophiques. Les résultats des tests d'exposition aux insecticides ont montré qu'aucune population n'était résistante au DDT (4%), mais qu'elles étaient à surveiller en terme de résistance aux pyréthrinoïdes. Elles doivent être prospectées régulièrement pour évaluer l'évolution des proportions d'individus résistants.

Une étude plus poussée de ces populations en terme d'utilisation d'insecticide en santé publique et en agriculture, mais aussi de dynamique des populations pourrait aider à mieux comprendre le développement et la dispersion de la résistance. Depuis les premières observations en 1954 (Crandell 1954), la résistance d'*An. sundaicus* au DDT s'est largement répandue sur toute la distribution (voir Article 1). Le faible nombre de populations aujourd'hui résistantes dans le sud Vietnam, peut être expliqué par le changement de pression sélective due à l'utilisation de pyréthrinoïdes en agriculture et à l'arrêt des pulvérisations de DDT il y a une vingtaine d'années au Vietnam. En effet, au sein de la population il existe, en général, des individus résistants et sensibles à des fréquences aléatoires (Richter 1992). Lorsqu'une pression de sélection telle que celle produite par le DDT (4%) est appliquée, ce sont les individus avec la meilleure valeur adaptative (ici les résistants) qui se reproduisent et dont le nombre augmente. Par contre, lorsque cette pression cesse, les sensibles ont, en général, une meilleure capacité d'adaptation, et sont donc favorisés: la population redevient peu à peu sensible (Rosenheim and Tabashnik 1990).

---

## OUTIL D'AIDE A LA DECISION DANS LE DEVELOPPEMENT DE STRATEGIES DE LUTTE

Le but du SIG est de développer un outil de prédiction et de surveillance, mais aussi d'aide à la décision pour cibler les vecteurs et adapter la lutte antivectorielle à la zone concernée. De telles mesures permettront de limiter les coûts et le développement de la résistance et d'augmenter l'efficacité des programmes de lutte. Les premières données intégrées dans la base permettent de tirer des conclusions préliminaires en terme d'orientation stratégique. En effet, la synthèse des comportements trophiques et de résistances met déjà en évidence certains sites où les stratégies pourraient être améliorées (Table IV-6). Par exemple, dans le cas où *An. sundaicus* est **endophage**, les données du pourcentage d'individus résistants aideront à prendre des décisions en terme d'insecticides utilisés. La Table IV-6 synthétise les résultats et met en évidence les sites où plus de 10% de la population est résistante et où *An. sundaicus* est endophage.

Sites où la collecte de faune résiduelle matinale a été positive	DDT % survie>10	Permethrine % survie>10	Alpha-Cypermethrine % survie>10	Lambda-cyhalothrine % survie>10
VBLA		X	x	
VCMA		X	X	X
VCMB		X	X	X
VHCA			X	X

**Table IV-6 : identification des sites où *An. sundaicus* est endophile et où le statut de résistance est à surveiller. Les deux sites où *An. sundaicus* présente un pourcentage de résistants supérieur à 10 pour les trois pyréthrinoïdes, sont représentés en gras.**

La synthèse de résultats présentée ici permet de faire une sélection des sites à traiter et de définir l'insecticide efficace à utiliser contre *An. sundaicus*. Un effort particulier doit être porté sur la stratégie de lutte à appliquer et l'insecticide à utiliser dans les sites VCMA et VCMB où les populations d'*An. sundaicus* présente un niveau de résistance aux 3 pyréthrinoïdes potentiellement en cours d'expansion.

---

## PERSPECTIVES

L'étude menée en interaction avec les partenaires vietnamiens a permis d'avoir une vision d'ensemble, dans le sud du Vietnam, de la biologie, du comportement, de l'écologie et de la résistance d'*An. sundaicus*. L'analyse des collectes entomologiques, environnementales et du climat, a permis de développer une première ébauche de méthode de prédiction de la présence d'*An. sundaicus*. L'intégration dans un SIG de données provenant de pays ayant une distribution hétérogène de ce vecteur sera nécessaire pour fiabiliser cette méthode et pour affiner des facteurs impliqués dans la présence d'*An. sundaicus*. L'intégration des insecticides utilisés en agriculture et en santé publique et de leur concentration permettra de mieux comprendre les effets des insecticides sur le changement de comportements des anophèles et sur le développement de la résistance. Les comportements humains, notamment les mouvements de populations, aideront aussi à mieux cibler la lutte et à mieux comprendre l'origine des épidémies palustres.

**PARTIE V • CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES  
DE L'ETUDE DU COMPLEXE SUNDAICUS**

Ce travail de thèse rassemble les connaissances les plus exhaustives possibles grâce à une bibliographie qui se veut la plus complète sur *An. sundaicus* s.l. Les résultats publiés par Sukowati et al. en 1996 et 1999 ont été les premières études de génétiques faites sur *An. sundaicus* s.l. Auparavant, les études sur cette espèce ne portaient que sur des observations de terrain : comportement, écologie et capacité vectorielle. Les avancées en génétique, puis en biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence la structuration génétique de ce vecteur. *Anopheles sundaicus* s.l. peut donc être décrit aujourd'hui comme un complexe d'au moins trois espèces allopatriques réparties sur le continent (*An. epiroticus*), dans le nord de Bornéo (*An. sundaicus* s.s.) et sur les îles de Java et Sumatra, Indonésie (*An. sundaicus* espèce E). Ces espèces ont été mises à jour par l'analyse de marqueurs moléculaires de l'ADN mitochondrial (COI et Cyt-b) et de l'ADN ribosomal (ITS2). Cependant, ces résultats ne sont pas en congruence totale avec ceux de cytogénétique et d'étude isoenzymatique (Sukowati et al. 1996, 1999), ni avec les hypothèses échafaudées sur des différences écologiques, eau saumâtre et eau douce (Chang Moh Seng et al. 2001). Une telle incongruence s'explique par une différence d'évolution entre les marqueurs (voir Discussion Partie I). De plus, *An. epiroticus* et *An. sundaicus* espèce E ont un statut que nous avons qualifié d'incipient. En effet, les marqueurs mitochondriaux ont révélé une différenciation complète en deux clades alors que le marqueur ribosomal révèle un contact plus récent entre ces deux lignées. Ces deux espèces demandent à être étudiées plus finement. L'absence de différence morphologique permet de qualifier les trois espèces du Complexe Sundaicus d'espèces cryptiques, indistinguables morphologiquement. Le développement d'une méthode d'identification par PCR basée sur les marqueurs mitochondriaux (Cyt-b et COI), a donc été indispensable. Elle permettra de déterminer le statut des espèces sur toute la distribution du complexe. L'ajout d'amorces supplémentaires dans la réaction de PCR multiplexe, pourra être fait dans le cas où de nouvelles espèces seraient découvertes. Le développement d'une méthode d'identification rapide est d'autant plus important que le statut moléculaire de la forme cytogénétique D, collectée dans les îles Nicobar en Inde, ainsi que d'*An. sundaicus* s.l. dans d'autres zones de sa distribution (les autres îles de l'archipel indonésien et l'Inde continentale), n'est pas encore établi (Nanda et al. 2004). De plus, une telle méthode est la base des investigations futures en terme de biologie, de comportement, de capacité vectorielle et d'environnement au sein du complexe car, actuellement, très peu de données sont disponibles sur chacune des espèces. Pour le moment, définir les caractéristiques des trois espèces, revient à recouper les données comportementales, environnementales et de capacité vectorielle collectées dans les publications et lors de notre étude menée dans le sud Vietnam, avec la distribution de chacune des trois espèces. Il en ressort que les caractéristiques des gîtes larvaires d'*An. sundaicus* sont assez homogènes. L'eau est généralement saumâtre, mais quelques sites d'eau douce ont été recensés en Indonésie, Malaisie et sur les îles Car Nicobar (Senior-White and Adhikari 1939, Reid 1966, Sukowati et al. 1996, Nagpal and Kalra 1997, Das et al. 1998). Ces gîtes ne sont pas des lieux préférentiels pour les larves d'*An. sundaicus* s.l. car, d'une part, ils sont rarement mentionnés dans la littérature et, d'autre part, cette espèce est peu collectée à l'intérieur des terres où

le nombre de gîtes d'eau douce est plus important. Comme Nguyen Tang Am en 1993, nous avons souligné dans l'Article 1 qu'*An. sundaicus* dispose certainement d'une grande adaptabilité aux variations de salinité. Enfin, l'eau des bassins est stagnante et l'exposition ensoleillée. Les algues filamenteuses flottantes sont indispensables et des plantes émergentes sont souvent présentes. Quelques gîtes inhabituels peuvent également recueillir des larves d'*An. sundaicus*, tels que des trous d'eau dans les rochers en bord de mer et sans végétation en Malaisie (Bornéo, site de Lundu) (Chang Moh Seng et al. 2001). L'observation de l'environnement dans le sud Vietnam confirme ces caractéristiques générales. Aucun gîte d'eau douce ou de trou de rocher n'y a été observé lors des missions sur le terrain ou dans la littérature sur le Vietnam. Les particularités de gîtes larvaires, d'eau douce ou de rocher en bord de mer semblent propres à *An. sundaicus* s.s. et à *An. sundaicus* E pour les gîtes d'eau douce, car aucune donnée n'a été publiée sur de tels environnements sur le continent. D'une façon générale, l'étroite relation entre le complexe et les bassins d'élevage en eau saumâtre a, depuis longtemps, été observée pour l'ensemble des trois espèces (Christophers 1933, Soeparmo and Lair 1954, Soerono et al. 1965, Collins et al. 1979, Nguyen Tang Am et al. 1993, Van der Brug 1997, Phan 1998). Connaître l'environnement permet donc d'établir des paramètres de présence ou d'absence pour prévenir et contrôler les zones à risque. L'analyse environnementale mise œuvre dans le sud du Vietnam (Partie IV) doit être confirmée à une échelle plus vaste, notamment dans des régions où il n'y a pas d'élevage de crevettes, et améliorée afin de déterminer les facteurs causant l'hétérogénéité de la distribution dans certains pays comme le Cambodge (Mouchet J., comm. pers.) et en Indonésie (Bangs M.J., comm. pers.). En plus, de sa distribution caractérisée de « patchy », *An. sundaicus* s.l. a une présence variable en fonction de la saison ou même d'une année sur l'autre (Reid 1968, Scanlon et al. 1968, Ikemoto et al. 1986, Phan 1998). Ce phénomène n'a pas été observé au sud Vietnam à cause de la présence continue des gîtes larvaires que sont les bassins d'élevage de crevettes. Les deux cas de figure, en foyer ou continu, posent problème dans le contrôle du paludisme. En effet, une distribution hétérogène et changeante limite une action efficace et ciblée des programmes de lutte antivectorielle. D'autre part, l'augmentation des surfaces de bassins d'eau saumâtre, contribue au maintien d'une densité considérable de vecteur potentiel. Sur le continent, plus particulièrement au Vietnam et en Thaïlande, les taux sporozoïtiques relevés chez *An. sundaicus* s.l. sont très bas si bien qu'il est désormais considéré comme un vecteur secondaire. Les taux les plus récents sont de 0 à Van Duc A, province de Bac Lieu, Vietnam en 1998 (Trung et al. 2004) et dans la province de Koh Kong, Cambodge (Sochanta T., comm. Pers.). Sur Sumatra, en Indonésie, le taux sporozoïtique en 2002 est plus élevé et se situe à 1,2% (Fryauff et al. 2002). Cette différence pourrait être considérée comme spécifique à deux espèces cryptiques. Cependant, la transmission sur le continent a essentiellement diminué depuis le début des programmes de lutte, en 1991 pour le Vietnam (Phan 1998, Erhart et al. 2004, Trung et al. 2004). A l'évidence, l'absence de transmission d'agents du paludisme par *An. sundaicus* serait due à une interruption du cycle sporogonique grâce à un programme de lutte efficace par diminution de la longévité du moustique ou par élimination du parasite du cycle de transmission. Une hypothèse

alternative proposée pour le sud Vietnam suppose que la trop forte densité d'*An. sundaicus* due à l'augmentation des étendues d'eau saumâtre provoquerait une compétition entre individus qui diminuerait la longévité du moustique et empêcherait ainsi le cycle sporogonique de se faire complètement (Trung et al. 2004). Cette hypothèse reste à vérifier. La menace réelle de l'expansion des fermes d'élevage de crevettes se situe donc dans des régions où *An. sundaicus* s.l. est présent, mais où les programmes de contrôle du paludisme ne sont pas aussi efficaces qu'en Thaïlande et au Vietnam, en attendant que l'enrichissement de ces régions permettent un programme de lutte efficace.

Les premières stratégies de lutte antivectorielle dirigées contre *An. sundaicus* ont commencé dans les années 50s par pulvérisations intra-domiciliaires de DDT. Des stratégies de lutte biologique ont aussi été tentées dès les années 50s (Soeparmo and Lair 1954) face au développement de la résistance aux insecticides (Crandell 1954) et après observation de la biologie de ce moustique. La couverture des bassins d'élevage en eau saumâtre ou encore la limitation de l'entrée de la mer à l'intérieur des terres a été utilisée (Iyenger 1945, Soeparmo and Lair 1954, Sandosham and Thomas 1983, Kirnowardoyo 1988, Takagi et al. 1995). Cependant, la mise en place de telles pratiques est fastidieuse et onéreuse, face à l'essor de l'élevage de crevettes, elles ne sont pas applicables. Le contrôle passe donc aujourd'hui par l'utilisation d'insecticide en pulvérisations intradomiciliaires et par moustiquaires imprégnées d'insecticide. La surveillance du développement de la résistance est donc essentielle. Depuis le début du dépistage de la résistance aux insecticides chez *An. sundaicus* s.l. (Crandell 1954), celle au DDT a été largement observée. Lors de notre projet dans le sud Vietnam, aucune population n'a été observée comme résistante. L'utilisation des pyréthri-noïdes au lieu du DDT peut être la cause de cette « perte de résistance » (voir Partie IV Applications et Discussion). Aucune résistance aux pyréthri-noïdes n'a été décelée dans nos populations du sud Vietnam, mais certaines populations restent à surveiller en terme de développement de la résistance. Dans le cadre de notre étude, l'absence de données précises sur l'utilisation locale des insecticides en agriculture et en santé publique ne permet pas de connaître leur réel impact sur le comportement et l'extension potentielle de la résistance chez *An. sundaicus* s.l. dans le sud Vietnam. Les comportements des membres du Complexe Sundaicus sont hétérogènes quelle que soit l'espèce (anthropophile/zoophile ; endophage/exophage ; endophile/exophile) bien que la dominance à l'anthropophilie, à l'endophagie et à l'endophilie soit reconnue (Article 1 et Partie IV). On peut cependant supposer, comme cela a été observé en Inde (Kalra 1978) et précédemment au Vietnam (Phan 1998), que les pulvérisations intradomiciliaires ont favorisé, dans certaines populations, les populations d'anophèles qui ont un comportement exophile, exophage et zoophage.

Aucune différence diagnostique en terme de comportement ou d'écologie n'a été identifiée entre les trois espèces, ce qui confirme que le caractère opportuniste et adaptatif du complexe va au-delà de la simple adaptation des larves à la salinité (Article 1). Ces variations ne sont donc pas des indicateurs de spéciation comme dans le cas du Complexe Minimus (Van Bortel 2002) ou même le mécanisme à l'origine de la divergence. En effet, comme nous l'avons montré (Partie II) celle-ci est due à des

mécanismes allopatriques de spéciation produit par les variations anciennes (Pleistocène) du niveau de la mer. L'isolement géographique n'a pas pour l'instant induit une divergence d'ordre comportemental ou d'adaptations écologiques particulières entre les espèces. Seule la structuration génétique révélée par l'analyse de cytogénétique et isoenzymatique suggérerait le début d'une adaptation écologique au sein des espèces (voir discussion Partie II).

Les trois espèces du complexe sont ubiquistes et peuvent donc s'adapter en fonction de leur environnement. Le développement de méthodes de lutte antivectorielle ciblées devrait donc être raisonné à un niveau local. Cependant, le but des ministères de la santé est d'avoir un programme à l'échelle nationale. C'est pourquoi, la synthèse d'un grand nombre de données dans des systèmes d'information géographiques permettra de définir les grandes lignes de la dynamique de ces espèces, notamment après l'utilisation d'insecticides, favorisant ainsi la prédiction et la prise de décision à un niveau national pour une application locale et ciblée.

A l'heure actuelle, les études en Asie du sud-est se focalisent sur des vecteurs comme les Complexes Minimus et Dirus qui sont très importants dans la transmission du paludisme et dont la distribution est plus étendue que celle du Complexe Sundaicus. Cependant, garder sous contrôle *An. sundaicus* s.l. est essentiel pour maîtriser le paludisme dans les zones économiques côtières en expansion. Le travail présenté dans ce manuscrit est une étude transversale sur *An. sundaicus* s.l. Il pose la première base d'études plus approfondies sur ses espèces cryptiques dans un but de mieux comprendre ce complexe et de le contrôler efficacement. Les trois axes de recherche abordés au cours de ma thèse, taxonomie et phylogéographie, développement d'une méthode d'identification, et caractérisation biologique et environnementale des espèces, ouvrent aujourd'hui de nombreuses perspectives. Premièrement, en phylogénie, la confirmation des relations entre espèces doit être faite. Deuxièmement, en taxonomie, les marqueurs moléculaires discriminants utilisés dans notre étude permettront d'identifier, probablement, de nouvelles espèces. Troisièmement, la méthode d'identification moléculaire aidera à préciser la distribution des membres du Complexe Sundaicus. Quatrièmement, la caractérisation de l'environnement des espèces du complexe doit être affinée afin d'élaborer un modèle de prédiction le plus fiable possible. Enfin, étendre la caractérisation de la biologie et la connaissance des capacités vectorielles est essentielle pour mener à bien une surveillance et un contrôle efficace contre ce vecteur.

#### **Perspectives**

- Etude plus précise des espèces *An. epiroticus* et *An. sundaicus* E et du complexe, en général, dans des zones où la sympatrie serait possible (Déroit de Malacca par exemple)
- Elargissement de l'étude par l'ajout des populations d'Inde (notamment de la forme cytogénétique D) ou d'autres îles de l'Indonésie, ainsi que du Pakistan
- Validation plus étendue de la PCR d'identification et adaptation si d'autres espèces sont décrites
- Améliorer la méthode de prédiction de présence d'*An. sundaicus* s.l.
- Voir quel est l'impact des fermes de crevettes sur la densité d'*An. sundaicus* et la transmission du paludisme dans le sud Vietnam
- Etude espèce par espèce de la biologie et de la capacité vectorielle

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abu Hassan, A., Rahman, W. A., Che Salmah, M. R., Rashid, M. Z. A., Jaal, Z., Adanan, C. R., and Shahrem, M. R. 1997. The distribution of common *Anopheles* mosquitoes in northwestern Peninsular Malaysia. *J Vect Ecol* 22: 109-114.
- Akiyama, J. 1984. Assignment report (Jan 1980-Dec 1983). Malaria Control Program in Indonesia, Jakarta.
- Anthony, T. G., Harbach, R. E., and Kitching, I. J. 1999. Phylogeny of the Pyretophorus Series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol* 24: 193-205.
- Antonio-Nkondjio, C., Simard, F., Cohuet, A., and Fontenille, D. 2002. Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles moucheti*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric south Cameroon populations. *Infect Genet Evol* 2: 69-72.
- Arrivillaga, J. C., and Feliciangeli, M. D. 2001. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *J Med Entomol* 38: 783-90.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bang, Y. H. 1985. Implication in the Control of malaria vectors with insecticides in tropical countries of South-East Asia Region. Part II - Consequences of insecticide use. *J Commun Dis* 17: 300-310.
- Barcus, M. J., Laihah, F., Sururi, M., Sismadi, P., Marwoto, H., Bangs, M. J., and Baird, J. K. 2002. Epidemic malaria in the Menoreh Hills of Central Java. *Am J Trop Med Hyg* 66: 287-292.
- Barton, N. H. 1979. Gene flow past a cline, pp. 333-339, *Heredity*.
- Beard, C. B., Hamm, D. M., and Collins, F. H. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol Biol* 2: 103-124.
- Beckenbach, A. T., Wei, Y. W., and Liu, H. 1993. Relationships in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. *Mol Biol Evol* 10: 619-34.
- Beebe, N. W., and Saul, A. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 53: 478-481.
- Beebe, N. W., and Cooper, R. D. 2000. Systematics of malaria vectors with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group. *Int J Parasitol* 30: 1-17.
- Beebe, N. W., Cooper, R. D., Morrison, D. A., and Ellis, J. T. 2000. A phylogenetic study of the *Anopheles punctulatus* group of malaria vectors comparing rDNA sequence alignments derived from the mitochondrial and nuclear small ribosomal subunits. *Mol Phylogenet Evol* 17: 430-6.
- Beebe, N. W., Maung, J., Van der Hurk, A. F., Ellis, J. T., and Cooper, R. D. 2001. Ribosomal DNA spacer genotypes of *Anopheles bancroftii* group (Diptera : Culicidae) from Australia and Papua New Guinea. *Insect Mol Biol* 10: 407-413.
- Besansky, N. J., Lehmann, T., Fahey, G. T., Fontenille, D., Braack, L. E., Hawley, W. A., and Collins, F. H. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. *Genetics* 147: 1817-28.
- Besansky, N. J. 1999. Complexities in the analysis of cryptic taxa within the genus *Anopheles*. *Parassitologia* 41: 97-100.
- Blondel, J. 1995. Biogéographie: approche écologique et évolutive. Masson, Paris.
- Bloomer, P., and Crowe, T. M. 1998. Francolin phylogenetics: molecular, morphobehavioral, and combined evidence. *Mol Phylogenet Evol* 9: 236-54.
- Bonne-Webster, J., and Swellengrebel, N. H. 1953. The Anopheline Mosquitoes of the Indo-Australasian Region. De Bussy, Amsterdam.
- Brandling-Bennett, A. D., Doberstyn, E. B., and Pinichpongse, S. 1981. Current epidemiology of malaria in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 12: 289-297.
- Brandon-Jones, D. 1996. The Asian Colobinae (Mammalia: Cercopithecoidea) as indicators of quaternary climatic change. *Biol J Linn Soc* 59: 327-350.
- Brooker, S., Singhasivanon, P., Waikagul, J., Supavej, S., Kojima, S., Takeuchi, T., Luong, T. V., and Looareesuwan, S. 2003. Mapping soil-transmitted helminths in Southeast Asia and implications for parasite control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34: 24-36.
- Brower, A. V. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6491-5.
- Buckler, E. S. t., Ippolito, A., and Holtsford, T. P. 1997. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145: 821-32.
- Caterino, M. S., and Sperling, F. A. 1999. Papilio phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Mol Phylogenet Evol* 11: 122-37.
- Cattand, P., Jannin, J., and Lucas, P. 2001. Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Trop Med Int Health* 6: 348-61.
- Chang Moh Seng, Linton, Y. M., and Harbach, R. E. 2001. The *Anopheles sundaicus* species complex - a preliminary study study of larval ecology from two sites in Sarawak, Malaysia. *Mekong malaria forum* 8: 91-95.

- Chooi, C. K. 1985.** Status of malaria vectors in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 16: 133-138.
- Chow, C. Y. 1970.** Bionomics of malaria vectors in the western pacific region. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1: 40-57.
- Chowanadisai, L., Krairiksh, S., and Thanasripudikul, S. 1989.** Microbial control of *Anopheles sundaicus*, a malaria vector in Thailand, by *Bacillus sphaericus* 2362. *Mosq Borne Dis Bull* 6: 39-44.
- Christophers, S. R. 1933.** Fauna of British India, including Ceylon and Burma. Vol. IV : Diptera. Family Culicidae. Tribe Anophelini. Taylor & Francis London.
- Clark, T. L., Meinke, L. J., and Foster, J. E. 2001.** Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Mol Biol* 10: 303-14.
- Cohuet, A. 2003.** Biologie et génétique d'*Anopheles funestus*, Parasitologie. Thèse de l'Université des Sciences et Technique du Languedoc, Montpellier.
- Collins, F. H., and Paskewitz, S. M. 1996.** A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 5: 1-9.
- Collins, R. T., Jung, R. K., Anoez, H., Sutrisno, R. H., and Putut, D. 1979.** A study of the coastal malaria vectors, *Anopheles sundaicus* (Rodenwaldt) and *Anopheles subpictus* Grassi, in South Sulawesi, Sulawesi, Indonesia. WHO/Mal 79.
- Collins, W. E., and Contacos, P. G. 1980.** Infection and transmission studies with *Plasmodium gonderi* in the *Macaca mulatta* monkey. *J Parasitol* 66: 998-1002.
- Coluzzi, M. 1964.** Morphological Divergences in the *Anopheles gambiae* Complex. *Riv Malariol* 43: 197-232.
- Coluzzi, M. 1982.** Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes, pp. 143-153, *Progress in Clinical and Biological Research*.
- Cooper, R. D., Waterson, D. G., Frances, S. P., Beebe, N. W., and Sweeney, A. W. 2002.** Speciation and distribution of the members of the *Anopheles punctulatus* (Diptera: Culicidae) group in Papua New Guinea. *J Med Entomol* 39: 16-27.
- Coosemans, M., Wery, M., Mouchet, J., and Carnevale, P. 1992.** Transmission factors in malaria epidemiology and control in Africa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87(Suppl 3): 385-91.
- Coosemans, M., Cong, D., Socheat, D., Inthakone, S., Baimai, V., Manguin, S., and Harbach, R. E. 1998.** Identification and characterization of malaria vectors in Southeast Asia : a prerequisite for appropriate vector control. INCO-DEC report, ERBIC18.CT.970211.
- Cornel, A. J., Porter, C. H., and Collins, F. H. 1996.** Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol* 33: 109-16.
- Covell, G. 1927.** Report on an Inquiry into malarial conditions in the Andamans. Government of India Press, Delhi.
- Covell, G., and Singh, P. 1942.** Malaria in the coastal belt of Orissa. *J Malaria Inst India* 4: 457-488.
- Coyne, J. A. 1933.** The fertility effects of pericentric inversions in *Drosophila melanogaster*, 134: 487-496, *Genetics*.
- Coyne, J. A., and Orr, H. A. 1998.** The evolutionnary genetic of speciation, 353: 287-305, *Philos Trans R Soc London Ser B*.
- Cracraft, J. 1983.** Species concepts and Speciation analysis, 1.: 159-187, *Current Ornithology*.
- Crandell, H. A. 1954.** Resistance of *An. sundaicus* to DDT. a preliminary report. *Mosq News* 14: 194-195.
- Crozier, R. H., Dobric, N., Imai, H. T., Graur, D., Cornuet, J. M., and Taylor, R. W. 1995.** Mitochondrial-DNA sequence evidence on the phylogeny of Australian jack-jumper ants of the *Myrmecia pilosula* complex. *Mol Phylogenet Evol* 4: 20-30.
- Cryan, J. R., Liebherr, J. K., Fetzner, J. W., Jr., and Whiting, M. F. 2001.** Evaluation of relationships within the endemic Hawaiian Platynini (Coleoptera: Carabidae) based on molecular and morphological evidence. *Mol Phylogenet Evol* 21: 72-85.
- Darlu, P., and Lecointre, G. 2002.** When does the incongruence length difference test fail? *Mol Biol Evol* 19: 432-7.
- Das, M. K., Adak, T., and Sharma, V. P. 1997.** Genetic analysis of a larval color mutant, yellow larva, in *Anopheles sundaicus*. *J Am Mosq Control Assoc* 13: 203-4.
- Das, M. K., Nagpal, B. N., and Sharma, V. P. 1998.** Mosquito fauna and breeding habitats of anophelines in Car Nicobar Island, India. *Indian J Malariol* 35: 197-205.
- Das, S. C., Nath, D. R., Bhuyan, M., Das, N. G., Baruah, I., and Talukdar, P. K. 1989.** Studies on malaria and filariasis vectors in Kamorta and Great Nicobar Islands. *Indian J Malariol* 26: 153-157.
- Dash, A. P., Behura, B. K., and Roy, J. R. 1984.** On the distribution of anopheline mosquitoes in Orissa, India. *J Zool Soc India* 36: 1-14.
- Dash, A. P., Hazra, R. K., Mahapatra, N., and Tripathy, H. K. 2000.** Disappearance of malaria vector *Anopheles sundaicus* from Chilika Lake area of Orissa State in India. *Med Vet Entomol* 14: 445-9.
- de Brito, R. A., Manfrin, M. H., and Sene, F. M. 2002.** Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. *Mol Phylogenet Evol* 22: 131-43.

- De Salle, R., Friedman, T., Prager, E. M., and Wilson, A. C. 1987. Tempo and Mode of Sequence Evolution in Mitochondrial of Hawaiian *Drosophila*. *J Med Entomol* 26: 157-164.
- Declan, B. 1997. Time to put malaria on the global agenda. *Nature* 386: 535-541.
- Della Torre, A., Merzagora, L., Powell, J. R., and Coluzzi, M. 1997. Selective introgression of paracentric inversions between two sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Genetics* 146: 239-44.
- Della Torre, A., Costantini, C., Besansky, N. J., Caccone, A., Petrarca, V., Powell, J. R., and Coluzzi, M. 2002. Speciation within *Anopheles gambiae* - the glass is half full. *Science* 298: 115-7.
- Dobzhansky, T. 1933. On the sterility of interracial hybrids in *Drosophila pseudoobscura*, 397-403, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Dolphin, K., Belshaw, R., Orme, C. D., and Quicke, D. L. 2000. Noise and incongruence: interpreting results of the incongruence length difference test. *Mol Phylogenet Evol* 17: 401-6.
- Douady, C. J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W. F., and Douzery, E. J. 2003. Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Mol Biol Evol* 20: 248-54.
- Dover, G. A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117.
- Dusfour, I., Harbach, R. E., and Manguin, S. 2004a. Bionomics and systematics of the oriental *Anopheles sundaicus* complex in relation to malaria and vector control. *Am J Trop Med Hyg* 71: 518-524.
- Dusfour, I., Linton, Y. M., Cohuet, A., Harbach, R. E., Baimai, V., Trung, H. D., Chang, M. S., Matusop, A., and Manguin, S. 2004b. Molecular evidence of speciation between island and continental populations of *Anopheles (Cellia) sundaicus* Rodenwaldt (Diptera : Culicidae), a principal malaria vector in Southeast Asia. *J Med Entomol* 41: 287-295.
- Dusfour, I., Harbach, R. E., Michaux, J. R., and Manguin, S. 2005. Speciation and Phylogeography of the Southeast Asian *Anopheles sundaicus* complex. Submitted in *Mol Ecol*.
- Elnaiem, D. E., Schorscher, J., Bendall, A., Obsomer, V., Osman, M. E., Mekkawi, A. M., Connor, S. J., Ashford, R. W., and Thomson, M. C. 2003. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 68: 10-7.
- Erhart, A., Thang, N. D., Bien, T. H., Tung, N. M., Hung, N. Q., Hung, L. X., Tuy, T. Q., Speybroeck, N., Cong, L. D., Coosemans, M., and D'Alessandro, U. 2004. Malaria epidemiology in a rural area of the Mekong Delta: a prospective community-based study. *Trop Med Int Health* 9: 1081-1090.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G., and Bult, C. 1994. Testing significance of congruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Favia, G., della Torre, A., Bagayoko, M., Lanfrancotti, A., Sagnon, N., Toure, Y. T., and Coluzzi, M. 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 6: 377-83.
- Favia, G., and Louis, C. 1999. Molecular identification of chromosomal forms of *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Parassitologia* 41: 115-8.
- Felsenstein, J. 1994. PHYLIP computer program, version By Felsenstein, J., Seattle, Washington.
- Ferguson, J. W. H. 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biol J Linn Soc* 75: 509-516.
- Fettene, M., Koekemoer, L. L., Hunt, R. H., and Coetzee, M. 2002. PCR assay for identification of *Anopheles quadriannulatus* species B from Ethiopia and other sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Med Vet Entomol* 16: 214-7.
- Foley, D. H., Beebe, N., Torres, E., and Saul, A. 1996. Misidentification of a Philippine malaria vector revealed by allozyme and ribosomal DNA markers. *Am J Trop Med Hyg* 54: 46-8.
- Foley, D. H., Bryan, J. H., Yeates, D., and Saul, A. 1998. Evolution and systematics of *Anopheles*: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol Phylogenet Evol* 9: 262-75.
- Freitas-Sibajev, M. G. R., Conn, J., Mitchell, S. E., Cockburn, A. F., Seawright, J. A., and Momen, H. 1995. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 27: 78-99.
- Fritz, G. N., Conn, J., Cockburn, A., and Seawright, J. 1994. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol* 11: 406-16.
- Fryauff, D. J., Leksana, B., Masbar, S., Wiaby, I., Sismadi, P., Susanti, A. I., Nagesha, H. S., Syafruddin, Atmosoedjono, S., Bangs, M. J., and JK, B. 2002. The drug sensitivity and transmission of human malaria on Nias Island, North Sumatra, Indonesia. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 447-462.
- Futuyama, D. J., and Mayer, G. C. 1980. Non-allopatric speciation in animals, 254-271, *Syst Zool*.
- Gandolfi, A., Bonilauri, P., Rossi, V., and Menossi, P. 2001. Intraindividual and intraspecific variability of ITS1 sequences in the ancient asexual *Darwinula stevensoni* (Crustacea: Ostracoda), *Heredity* 87: 449-455.
- Garcia-Paris, M., Alcobendas, M., Buckley, D., and Wake, D. B. 2003. Dispersal of viviparity across contact zones in Iberian populations of fire salamanders (*Salamandra*) inferred from discordance of genetic and morphological traits, 57: 129-43, *Evolution*.

- Garros, C., Harbach, R. E., and Manguin, S. 2004a.** Systematics and biogeographical implications of the phylogenetics relationship between members of the *Funestus* and *Minimus* Groups of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* In Press.
- Garros, C., Koekemoer, L. L., Coetzee, M., Coosemans, M., and Manguin, S. 2004b.** A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. *Am J Trop Med Hyg* 70: 583-90.
- Garros, C., Koekemoer, L. L., Kamau, L., Awolola, T. S., Van Bortel, W., Coetzee, M., Coosemans, M., and Manguin, S. 2004c.** Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. *Am J Trop Med Hyg* 70: 260-5.
- Gathorne-Hardy, F. J., Syaokani, R. G., Davies, R. G., Eggleton, P., and Jones, D. T. 2002.** Quaternary refugia in south-east Asia: using termites (Isoptera) as indicators. *Biol J Linn Soc* 75: 453-466.
- Gentile, G., Della Torre, A., Maegga, B., Powell, J. R., and Caccone, A. 2002.** Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the problem of taxonomic status. *Genetics* 161: 1561-78.
- Giang, N. L., Hoa, P. T., Dan, B. V., and Thang, T. T. 1980.** Quelques particularités du paludisme au pilote ayant *An. sundaicus* et les mesures appliquées. ATRS, IMPE (1975-79), pp. 59-65. Vol. edited by National Institute of Malariology, Parasitology and Entomology (NIMPE), Hanoi.
- Gornostaeva, R. M., Vu Tkhin, V., Nguen Van, C., Nguen Tkhyong, K., Nguen Tuan, R., and Nguen Tho, V. 1994.** Sensitivity of malarial mosquitoes to insecticides in Vietnam. *Med Parazitol Parazit Bolezni*: 34-41.
- Gorog, A. J., Sinaga, M. H., and Engstrom, M. D. 2004.** Vicariance or Dispersal? Historical biogeography of three Sunda shelf murine rodents (*Maxomys surifer*, *Leopoldamys sabanus* and *Maxomys whitheadi*). *Biol J Linn Soc* 91: 91-109.
- Gould, D. J., Scanlon, J. E., Major, M. S. C., and Ward, R. A. 1966.** *Anopheles* vectors of malaria in Southeast Asia, pp. 361-373. Army Science Conference Proceedings.
- Green, C. A., Gass, R. F., Munstermann, L. E., and Baimai, V. 1990.** Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. *Med Vet Entomol* 4: 25-34.
- Green, C. A., Rattanarithikul, R., and Charoensub, A. 1992.** Population genetic confirmation of species status of the malaria vectors *Anopheles willmori* and *An. pseudowillmori* in Thailand and chromosome phylogeny of the Maculatus group of mosquitoes. *Med Vet Entomol* 6: 335-41.
- Griffiths, C. S. 1997.** Correlation of functional domains and rates of nucleotide substitution in cytochrome b. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 352-65.
- Guindon, S., and Gascuel, O. 2003.** A Simple, Fast and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Hackett, B. J., Gimnig, J., Guelbeogo, W., Costantini, C., Koekemoer, L. L., Coetzee, M., Collins, F. H., and Besansky, N. J. 2000.** Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol* 9: 369-74.
- Hackett, S. J. 1996.** Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Mol Phylogenet Evol* 5: 368-82.
- Hair, J. D. 1973.** Day-time indoor resting anophelines of the delta region of Vietnam. *Mosq News* 33: 195-198.
- Hall, T. A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids symp. ser.* 41: 95-98.
- Harbach, R. E. 1994.** Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull Entomol Res* 84: 331-342.
- Harbach, R. E., and Kitching, I. J. 1998.** Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Syst Entomol* 23: 327-370.
- Harbach, R. E. 2004.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* 94 (17) 537-553.
- Harinasuta, C., Guptavanij, P., and Vasuvat, C. 1974.** Studies on the medical ecological epidemiology in mangrove areas in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 5: 105-127.
- Harris, D. J., and Crandall, K. A. 2000.** Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Mol Biol Evol* 17: 284-91.
- Hassan, A. N., Dister, S., and Beck, L. 1998.** Spatial analysis of lymphatic filariasis distribution in the Nile Delta in relation to some environmental variables using geographic information system technology. *J Egypt Soc Parasitol* 28: 119-31.
- Hay, S. I., Randolph, S. E., and Rogers, D. J. 2000.** Remote Sensing and Geographical Information Systems in Epidemiology. *In Advances in Parasitology*, Vol. 47. edited by Academic Press, San Diego.
- Heaney, L. R. 1986.** Biogeography of mammals in SE Asia: estimates of rates of colonization, extinction and speciation. *Biol J Linn Soc* 28: 127-165.

- Hendry, A. P., Vamosi, S. M., Latham, J. S., Heilbuth, J. C., and Day, T. 2000. Questioning species reality, 1: 67-76, Conservation genetics.
- Hien, N. T. 1968. The genus *Anopheles* in the Republic of Vietnam.
- Holder, M., and Lewis, P. O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. *Nat Genet* 4: 275-284.
- Huehne, W. H. 1971. Experience with an insecticide-drug combination and observations on suppressive chloroquine-pyrimethamine treatment. *Am J Trop Med Hyg* 74: 110-6.
- Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian Inference of Phylogenetic Trees. *Bioinf Appl Note* 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., and Bollback, J. P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-4.
- Husson, O., Hanhart, K., Phung, M. T., and Bouma, J. 2000. Water management for rice cultivation on acid sulphate soils in the Plain of Reeds, Vietnam. *Agricultural Water Management* 46: 91-109.
- Hwang, U. W., and Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasitol* 37: 215-28.
- Ikemoto, T. 1982. Studies on the bionomics of *An. sundaicus* (Rodenwaldt, 1925), the principal malaria vector in a coastal area of the North Sumatra, Indonesia. *Teikyo Med J* 5: 1-15.
- Ikemoto, T., Sumitro, Panjaitan, W., and Shibuya, T. 1986. Laboratory and small-scale field tests of larvicides and larvivorous fishes against *Anopheles sundaicus* larvae at Perupuk Village, North Sumatra, Indonesia. *Jpn J Sanit Zool* 37: 105-112.
- Ikemoto, T. 1996. Ecological diversities of *Anopheles sundaicus* as a vector mosquito of malaria. *Med Entomol Zool* 47: 1-13.
- Imai, C., Yamugi, H., and Panjaitan, W. 1987. Efficacy of several larvicides in laboratory and field tests against *Anopheles sundaicus* in a village, North Sumatra, Indonesia. *Jpn J Sanit Zool* 38: 93-102.
- Imai, C., Ikemoto, T., Takagi, M., Yamugi, H., Pohan, W., Hasibuan, H., Sirait, H., and Panjaitan, W. 1988. Ecological study of *Anopheles sundaicus* larvae in a coastal village of North Sumatra, Indonesia. I. Topography, land use, and larval breeding. *Jpn J Sanit Zool* 39: 293-300.
- IMPE. 1987. Keys to *Anopheles* in Vietnam (Adults-Pupae-Larvae). Hanoi, Vietnam : Department of Entomology, Institute of Malariology, Parasitology and Entomology.
- Indaratna, K., Hutubessy, R., Chupraphawan, S., Sukapurana, C., Tao, J., Chunsutthiwat, S., Thimasarn, K., and Crissman, L. 1998. Application of geographical information systems to co-analysis of disease and economic resources: dengue and malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29: 669-84.
- Inger, R. F., and Voris, H. K. 2001. The biogeographical relations of the frogs and snakes of Sundaland. *J Biogeog* 28: 863-891.
- Iyenger, M. O. T. 1945. Naturalistic methods of control of breeding of *Anopheles sundaicus* by means *Eichhornia*. *J Mal Inst* 6.
- Jarzewowski, E. 1995. Early cretaceous insect faunas and paleoenvironment. *Cretaceous Res.* 16: 681-693.
- Kalra, N. L. 1978. National Malaria Eradication Programme, India - its problems, management and research needs. *J Commun Dis* 10: 1-20.
- Kalra, N. L. 1980. Emergence of malaria zoonosis of simian origin as natural phenomenon in Greater Nicobars, Andaman and Nicobar Islands - a preliminary note. *J Commun Dis* 12: 49-54.
- Karns, D. R., O'Bannon, A., Voris, H. K., and Weigt, L. A. 2000. Biogeographical implications of mitochondrial DNA variation in the Bockadam Snake (*Cerberus rynchops*, Serpentes: Homalopsinae) in Southeast Asia. *J Biogeog* 27: 391-402.
- Kathiresan, K., and Bingham, B. L. 2001. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems *Advances in Marine Biology*, pp. 81-251. Vol. edited by Academic Press.
- Kengne, P., Trung, H. D., Baimai, V., Coosemans, M., and Manguin, S. 2001. A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. *Insect Mol Biol* 10: 427-35.
- Kengne, P., Awono-Ambene, H. P., Antonio-Nkondjio, C., and Fontenille, D. 2003. [Development of a PCR (polymerase chain reaction) specific for complex *Anopheles nili* (Theobald) 1904 species in Cameroon]. *Bull Soc Pathol Exot* 96: 165-7.
- Kikuchi, T., Takagi, M., Tokuhisa, E., Suzuki, T., Panjaitan, W., and Yasuno, M. 1997. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as an indicator to show the absence of *Anopheles sundaicus* larvae. *Med Entomol Zool* 48: 11-18.
- King, W. V. 1932. The Philippine *Anopheles* of the Rossi-Ludlowi Group. *The Philippine Journal of Science* 47: 305-346.
- Kirnowardoya, S., and Yoga, G. P. 1987. Entomological investigations of an outbreak of malaria in Chilacap on south coast of central Java, Indonesia during 1985. *J Commun Dis* 19: 121-127.
- Kirnowardoyo, S. 1985. Status of *Anopheles* malaria vectors in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 16: 129-132.

- Kirnowardoyo, S. 1988.** *Anopheles* malaria vector and control measures applied in Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 19: 713-716.
- Kitron, U., Pener, H., Costin, C., Orshan, L., Greenberg, Z., and Shalom, U. 1994.** Geographic information system in malaria surveillance: mosquito breeding and imported cases in Israel, 1992. Am J Trop Med Hyg 50: 550-6.
- Klein, J. M. 1977.** The mosquito fauna of Cambodia. 1. Anophelinae (Diptera, Culicidae). Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol 15: 107-122.
- Koekemoer, L. L., Kamau, L., Hunt, R. H., and Coetzee, M. 2002.** A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. Am J Trop Med Hyg 66: 804-11.
- Krzywinski, J., Wilkerson, R. C., and Besansky, N. J. 2001.** Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. Mol Phylogenet Evol 18: 479-487.
- Krzywinski, J., and Besansky, N. J. 2003.** Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. Annu Rev Entomol 48: 111-39.
- Kumar, A., and Rai, K. S. 1990.** Chromosomal localization and copy number of 18S + 28S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). Hereditas 113: 277-89.
- Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. B., and Masatoshi, N. 2001.** MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 2.1.
- Kumari, R., Joshi, H., Giri, A., and Sharma, V. P. 1993.** Feeding preferences of *Anopheles sundaicus* in Car Nicobar Island. Indian J Malariol 30: 201-206.
- Kumari, R., and Sharma, V. P. 1994.** Resting and biting habits of *Anopheles sundaicus* in Car Nicobar Island. Indian J Malariol 31: 103-114.
- Lachaise, D., Harry, M., Solignac, M., Lemeunier, F., Benassi, V., and Cariou, M. L. 2000.** Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from Sao Tome. Proc R Soc Lond, B Biol Sci 267: 1487-1495.
- Lande, R. 1985.** THE fixation of chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and colonization, 54: 323-332, Heredity.
- Leo, N. P., and Barker, S. C. 2002.** Intragenomic variation in ITS2 rDNA in the louse of humans, *Pediculus humanus*: ITS2 is not a suitable marker for population studies in the species. Insect Mol Biol 11: 651-657.
- Lin, C. P., and Wood, T. K. 2002.** Molecular phylogeny of the North American *Enchenopa binotata* (Homoptera: Membracidae) Species Complex. Systematics 95: 162-171.
- Linnaeus. 1758.** Systema Naturae.
- Linton, Y. M., Harbach, R. E., Chang, M. S., Anthony, T. G., and Matusop, A. 2001a.** Morphological and molecular identity of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. Syst Entomol 26: 357-366.
- Linton, Y. M., Samanidou-Voyadjoglou, A., Smith, L., and Harbach, R. E. 2001b.** New occurrence records for *Anopheles maculipennis* and *Anopheles messae* in the northern Greece based on DNA sequence data. Eur Mosq Bull 11.
- Linton, Y. M., Mordue, A. J., Cruickshank, R. H., Meiswinkel, R., Mellor, P. S., and Dallas, J. F. 2002a.** Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. Med. Vet. Entomol. 16: 139-146.
- Linton, Y. M., Smith, L., and Harbach, R. E. 2002b.** Molecular confirmation of sympatric populations of *Anopheles messae* and *Anopheles atroparvus* overwintering in Kent, southeast England. Eur Mosq Bull 13.
- Linton, Y. M., Smith, L., Koliopoulos, G., Samanidou-Voyadjoglou, A., Zounos, A. K., and Harbach, R. E. 2003.** Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) maculipennis* Meigen, type species of the genus and nominotypical member of the Maculipennis Complex. Syst. Entomol. 28: 39-55.
- Linton, Y. M., Dufour, I., Howard, T. M., N.D., M., Bangs, M. J., and Harbach, R. E. Accepted.** *Anopheles (Cellia) epiroticus*, a new malaria vector species in the Southeast Asian Sundaicus Complex. Bull. Entomo. Res.
- Lopez, P., Casanr, D., and Philippe, H. 2002.** Phylogenie et évolution moléculaire. Médecine/Sciences 18: 1146-1154.
- Lyman, D. F., Monteiro, F. A., Escalante, A. A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D. M., Dujardin, J. P., and Beard, C. B. 1999.** Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 60: 377-86.
- Manguin, S., Roberts, D. R., Peyton, E. L., Rejmankova, E., and Pecor, J. 1996.** Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* larval habitats. J Am Mosq Control Assoc 12: 619-26.
- Manguin, S., Kengne, P., Sonnier, L., Harbach, R. E., Baimai, V., Trung, H. D., and Coosemans, M. 2002.** SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. Med. Vet. Entomol. 16: 46-54.

- Martin, A. P., and Bermingham, E. 1998.** Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome b gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9: 192-203.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Berge, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N., and Pauron, D. 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 7: 179-84.
- Marwoto, H. A., and Arbani, P. R. 1991.** Forest malaria in Indonesia. Forest malaria in Southeast Asia: Proceedings of an informal consultative meeting WHO/MRC.
- Mayden, R. L. 2002.** On biological species, species concepts and individuation in the natural world. *Fish and Fisheries* 3: 171-196.
- Mayr, E. 1963.** Animal species and evolution. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Meek, S. R. 1995.** Vector control in some countries of Southeast Asia: comparing the vectors and the strategies. *Ann Trop Med Parasitol* 89: 135-147.
- Meijard, E. 2003.** Mammals of south-east Asian island and their Late Pleistocene environments. *J Biogeo.*
- Missiroli, A., Hackett, L. W., and Martini, E. 1933.** Le razze di *Anopheles maculipennis* e la loro importanza nella distribuzione della malaria in alcune regioni d'Europa. *Riv Malariol* 12: 1-56.
- Mitchell, S. E., Cockburn, A. F., and Seawright, J. A. 1993.** The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and gene organization. *Genome* 36: 1058-73.
- Miyagi, I., Toma, T., Mogi, M., Martono, Yotopranoto, S., Arifin, Z., and Dachlan, Y. 1994.** Mosquitoes species (Diptera : Culicidae) from Lombok Island, Indonesia. *Mosq Syst* 26: 19-24.
- Moorhouse, D. E., and Wharton, R. H. 1965.** Studies on Malayan vectors of malaria ; methods of trapping and observations on biting cycles. *J Med Entomol* 1: 359-370.
- Morrison, D. A. 1996.** Phylogenetics Tree-Building, 26.: 589-417, *International Journal for Parasitology.*
- Morrow, J., Scott, L., Congdon, B., Yeates, D., Frommer, M., and Sved, J. 2000.** Close genetic similarity between two sympatric species of tephritid fruit fly reproductively isolated by mating time. *Evolution* 54: 899-910.
- Mouchet, J., Manguin, S., Sircoulon, J., Laventure, S., Faye, O., Onapa, A. W., Carnevale, P., Julvez, J., and Fontenille, D. 1998.** Evolution of malaria in Africa for the past 40 years: impact of climatic and human factors. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 121-30.
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D., and Sircoulon, J. 2004.** Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey, Eurotext, Paris.
- Muir, G., Fleming, C. C., and Schlotterer, C. 2001.** Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Mol Biol Evol* 18: 112-9.
- Mukabayire, O., Boccolini, D., Lochouarn, L., Fontenille, D., and Besansky, N. J. 1999.** Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol. Ecol.* 8: 289-97.
- Mukabayire, O., Caridi, J., Wang, X., Toure, Y. T., Coluzzi, M., and Besansky, N. J. 2001.** Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single-copy loci. *Insect Mol Biol* 10: 33-46.
- Nagpal, B. N., and Sharma, V. P. 1983.** Variations in ornamentation of palpi of *Anopheles sundaicus* Rodenwaldt (1925) collected from Andaman Islands, India. *Indian J Malariol* 20: 85-87.
- Nagpal, B. N., and Kalra, N. L. 1997.** Malaria vectors of India. *J Parasitic Dis* 21: 105-112.
- Nanda, N., Das, M. K., Wattal, S., Adak, T., and Subbarao, S. K. 2004.** Cytogenetic characterization of *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) population from Car Nicobar Island, India. *Ann Entomol Soc Am* 97: 171-176.
- Nandi, J., Kaul, S. M., Sharma, S. N., and Shiv, L. 2000.** Anthropophily of anophelines in duars of West Bengal and other regions of India. *J Commun Dis* 32: 95-99.
- Nasiruddin, M. 1952.** A note on the natural infectivity of mosquitoes in East Pakistan. *Pakistan J Health* 2: 113-115.
- Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J., and Boursot, P. 1998.** Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80 : 742-52.
- Nguyen Tang Am, Le Quy, R., Vu Thi, H., and Nguyen Bieh, L. 1993.** Entomo-epidemiological studies of malaria in the coastal zone of Ho Chi Minh City, 1990-1992. *Santé* 3: 464-473.
- Ong Keng Ho, Chew Lai Ming, and Lok, C. L. 1981.** Current insecticidal susceptibility status of mosquitoes in Singapore. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 12: 222-227.
- Oo, T. T., Storch, V., and Becker, N. 2004.** Review of the anopheline mosquitoes of Myanmar. *J Vector Ecol* 29: 21-40.
- Petrarca, V., Nugud, A. D., Ahmed, M. A., Haridi, A. M., Di Deco, M. A., and Coluzzi, M. 2000.** Cytogenetics of the *Anopheles gambiae* complex in Sudan, with special reference to *An. arabiensis*: relationships with East and West African populations. *Med Vet Entomol* 14: 149-64.
- Peyton, E. L. 1989.** A new classification for the Leucosphyrus group of *Anopheles* (*Cellia*). *Mosq Syst* 21: 197-205.

- Phan, V. T. 1977. The anti-malarial campaign and the eradication of malaria in the Socialist Republic of Vietnam. *Santé Publique*, Bucarest 20: 147-156.
- Phan, V. T. 1998. *Epidémiologie du paludisme et lutte antipaludique au Vietnam*. Edition médicales Vietnam, Hanoi.
- Phillips, R. S. 2001. Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev* 14: 208-26.
- Poolsuwan, S. 1995. Malaria in prehistoric Southeastern Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 26: 3-22.
- Porter, C. H., and Collins, F. H. 1996. Phylogeny of nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Mol Phylogenet Evol* 6: 178-88.
- Posada, D., and Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Puri, I. M. 1936. The distribution of anopheline mosquitoes in India : Additional records, 1931-1935. *Rec Malaria Surv India* 2: 1-44.
- Puri, I. M. 1948. The distribution of anopheline mosquitoes in India, Pakistan, Ceylon and Burma: Part V : additional records, 1936-1947. *Indian J Malariol* 6: 177-211.
- Rahman, W. A., Che'Rus, A., and Ahmad, A. H. 1997. Malaria and *Anopheles* mosquitos in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28: 599-605.
- Rajogopal, R. 1976. Studies on persistent transmission of malaria in Burnihat, Meghalaya. *J Commun Dis* 8: 235-245.
- Rakotomanana, F., Jeanne, I., Duchemin, J. B., Pietra, V., Raharimalala, L., Tombo, M. L., and Arie, F. 2001. [Geographic approach in malaria control in the central highlands of Madagascar]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 67: 27-30.
- Rannala, B., and Yang, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J Mol Ecol* 43: 304-311.
- Rao, T. R. 1984. *The Anophelines of India*, Delhi.
- Reid, J. A. 1966. A note on *Anopheles subpictus* Grassi and *A. indefinitus* Ludlow (Diptera : Culicidae). *J Med Entomol* 3: 327-331.
- Reid, J. A. 1968. Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo. Government of Malaysia, Kuala Lumpur.
- Reinert, J. F., Kaiser, P. E., and Seawright, J. A. 1997. Analysis of the *Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus* complex of sibling species (Diptera: Culicidae) using morphological, cytological, molecular, genetic, biochemical, and ecological techniques in an integrated approach. *J Am Mosq Control Assoc* 13 Suppl: 1-102.
- Richter, P. 1992. Possible Genetic Start Points and end points of Insecticide Resistance Evolution, pp. 355-363. *In Insecticides: Mechanism of Action and Resistance*. Vol. edited by B. Weber. Intercept, Andover.
- Rieseberg, L. H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol* 16: 351-358.
- Rinaldi, L., Cascone, C., Sibilio, G., Musella, V., Taddei, R., and Cringoli, G. 2004. [Geographical Information Systems and remote sensing technologies in parasitological epidemiology]. *Parassitologia* 46: 71-4.
- Rizzoli, A., Rosa, R., Mantelli, B., Pecchioli, E., Hauffe, H., Tagliapietra, V., Beninati, T., Neteler, M., and Genchi, C. 2004. [*Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs]. *Parassitologia* 46: 119-22.
- Rogers, A. R., and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.
- Rogers, D. J., and Williams, B. G. 1993. Monitoring trypanosomiasis in space and time. *Parasitology* 106 Suppl: S77-92.
- Rosenheim, J., and Tabashnik, B. E. 1990. Evolution of pesticide resistance: interactions between generation time and genetic, ecological, and operational factors. *J Econ Entomol* 83: 1184-93.
- Rozas, J., Sanchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X., and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Ruedi, M. 1996. Phylogenetic evolution and biogeography of Southeast Asian shrews (genus *Crocidura*: Soricidae). *Biol J Linn Soc* 58: 107-219.
- Ruedi, M., and Fumagalli, L. 1996. Genetic structure of *Gymnures* (genus: *Hylomys*; Erinaceidae) on continental islands of Southeast Asia: historical effects of fragmentation. *J Zool Syst Evol res* 34: 153-162.
- Sabesan, S., Palaniyandi, M., Das, P. K., and Michael, E. 2000. Mapping of lymphatic filariasis in India. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 591-606.
- Sallum, M. A., Bergo, E. S., Flores, D. C., and Forattini, O. P. 2002. Systematic studies on *Anopheles galvaoi* Causey, Deane & Deane from the subgenus *Nyssorhynchus* blanchard (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1177-89.
- Salomone, N., Emerson, B. C., Hewitt, G. M., and Bernini, F. 2002. Phylogenetic relationships among the Canary Island Steganacaridae (Acari, Oribatida) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Mol Ecol* 11: 79-89.

- Sandosham, A. A., and Thomas, V. 1983. *Malariaology: with special reference to Malaya*. Singapore University Press, Singapore.
- Scanlon, J. E., Reid, J. A., and Cheong, W. H. 1968. Ecology of *Anopheles* vectors of malaria in the oriental region. *Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol* VI: 237-246.
- Schaefer, C. H., and Kirnowardoyo, S. 1983. An operational evaluation of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against *Anopheles sundaicus* in West Java, Indonesia. *Mosq News* 43: 325-328.
- Schechter, M. S., Green, N., and La Forge, F. B. 1949. Constituents of Pyrethrum Flowers. XXIII. Cinerolone and the Synthesis of Related Cyclopentenolones. *J Am Chem Soc* 71: 3165-3173.
- Schemske, D. W. 2000. Understanding the origin of species, 54: 1069-1073, *Evolution*.
- Schmitt, L. H., Kitchener, D. J., and How, R. A. 1995. A genetic perspective of mammalian variation and evolution in the Indonesian archipelago: biogeographic correlates in the fruit bat genus *Cynopterus*. *Evolution* 49.
- Schneider, S., Roessli, D., and Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN ver 2.000 A software for population genetics data analysis. URL://anthro.unige.ch/arlequin.
- Schulter, D. 1998. Ecological causes of speciation, pp. 114-129. *In* S. H. Bröcher [ed.], *Endless forms*. Oxford University Press, Oxford.
- Scott, J. A., Brogdon, W. G., and Collins, F. H. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 520-9.
- Sedaghat, M. M., Linton, Y. M., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., and Harbach, R. E. 2003. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species. *Bull Entomol Res* 93: 527-35.
- Sen, P. 1938. *Anopheles sundaicus* (Ludlowi) and malaria in Calcutta. *J Mal Inst of India* 1: 83-107.
- Senior-White, R., and Adhikari, A. K. 1939. On malaria transmission around the Chilika lake. *J Mal Inst of India* 2: 395-423.
- Shang, Y. C., Leung, P., and Ling, B.-H. 1998. Comparative economics of shrimp farming in Asia. *Aquaculture* 164: 183-200.
- Sharpe, R. G., Hims, M. M., Harbach, R. E., and Butlin, R. K. 1999. PCR-based methods for identification of species of the *Anopheles minimus* group: allele-specific amplification and single-strand conformation polymorphism. *Med Vet Entomol* 13: 265-73.
- Sharpe, R. G., Harbach, R. E., and Butlin, R. K. 2000. Molecular variation and phylogeny of members of the *Minimus* group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol* 25: 263-272.
- Shimodaira, H., and Hasegawa, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* 16: 1114-1116.
- Sierra, D. M., Velez, I. D., and Linton, Y. M. 2004. Malaria vector *anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* comprises one genetic species in colombia based on homogeneity of nuclear ITS2 rDNA. *J Med Entomol* 41: 302-7.
- Simmons, R. B., and Weller, S. J. 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Mol Phylogenet Evol* 20: 196-210.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., and Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 651-701.
- Singh, N., Nagpal, B. N., and Sharma, V. P. 1985. Mosquitoes of Kutch, Gujarat. *Indian J Malariol* 22: 17-20.
- Sites, J. W., and Moritz, C. 1987. Chromosomal evolution and speciation revisited, pp. 153-174, *Syst Zool*.
- Sites, J. W., and Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: a Reconnaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol Evol* 18: 462-470.
- Sithiprasasna, R., Linthicum, K. J., Liu, G. J., Jones, J. W., and Singhasivanon, P. 2003. Use of GIS-based spatial modeling approach to characterize the spatial patterns of malaria mosquito vector breeding habitats in northwestern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34: 517-28.
- Slatkin, M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res.* 58: 167-75.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-62.
- Soeparmo, H. T., and Lair, R. L. 1954. *Anopheles sundaicus* and its control by DDT residual house spraying in Indonesia. *Malaria conference for the western pacific and south east Asia regions*. WHO/Mal/118.
- Soerono, M., Davidson, G., and Muir, D. A. 1965. The Development and trend of insecticide-resistance in *Anopheles aconitus* Dönitz and *Anopheles sundaicus* Rodenwalt. *Bull WHO* 32: 161-168.
- Spicer, G. S. 1995. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *J Mol Evol* 41: 749-759.
- Spirito, F. 2000. The role of chromosomal rearrangements in speciation, pp. 320-329. *In* S. H. Bröcher [ed.], *Endless forms*. Oxford University Press, Oxford.
- Srivastava, A., and Nagpal, B. N. 2004. Mapping and Distribution of Malaria Vectors and others Indian Anophelines using GIS and RS, pp. 11-18,

[http://www.mrcindia.org/MRC\\_profile/vector\\_biology/GIS\\_RS.pdf](http://www.mrcindia.org/MRC_profile/vector_biology/GIS_RS.pdf). Malaria Research Center of India, Delhi.

- Subbarao, S. K., Nanda, N., and Raghavandra, K. 1999. Malariogenic stratification of Inia using *Anopheles culicifacies* sibling species prevalence. ICMR Bulletin 29.
- Sucharit, S., Komalamisra, N., Leemingsawat, S., Apiwathnasorn, C., and Thongrunkiat, S. 1988. Population genetic studies on the *Anopheles minimus* complex in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 19: 717-23.
- Sukowati, S., Baimai, V., and Andris, H. 1996. Sex chromosome variation in natural populations of the *Anopheles sundaicus* complex from Thailand and Indonesia. Mosq Borne Dis Bull 13: 8-13.
- Sukowati, S., Baimai, V., Harun, S., Dasuki, Y., Andris, H., and Efriwati, M. 1999. Isozyme evidence for three sibling species in the *Anopheles sundaicus* complex from Indonesia. Med Vet Entomol 13: 408-414.
- Sun, X., Li, X., Luo, Y., and Chen, X. 2000. The vegetation and climate at the last glaciation on the emerged continental shelf of the south China sea. Palaeogeog Palaeoclim, Palaeoecol 160: 301-316.
- Sundaraman, S., Soeroto, R. M., and Siran, M. 1957. Vectors of malaria in mid-Java. Indian J Malariol 11: 321-338.
- Suzuki, Y., Glazko, G. V., and Nei, M. 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 16138-43.
- Sweeney, A. W. 1987. Larval salinity tolerances of the sibling species of *Anopheles farauti*. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 3: 589-592.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Others Methods) Vers 4.0b10 Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takagi, M., Pohan, W., Hasibuan, H., Panjaitan, W., and Suzuki, T. 1995. Evaluation of shading of fish farming ponds as a larval control measure against *Anopheles sundaicus* Rodenwaldt (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health 26: 748-753.
- Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10: 512-26.
- Templeton, A. R. 1983. Phylogenetic inferences from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. Evolution 37: 221-244.
- Thelwell, N. J., Huisman, R. A., Harbach, R. E., and Butlin, R. K. 2000. Evidence for mitochondrial introgression between *Anopheles bwambae* and *Anopheles gambiae*. Insect Mol. Biol. 9: 203-210.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- Thomson, M., and Connor, S. 2000. Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. Med Vet Entomol 14: 227-244.
- Tougaard, C. 2001. Biogeography and migration routes of large mammal faunas in South-East Asia during the Late Middle Pleistocene: focus on the fossil and extant faunas from Thailand. Palaeogeog, Palaeoclim, Palaeoecol 168: 337-358.
- Toure, Y. T., Petrarca, V., Traore, S. F., Coulibaly, A., Maiga, H. M., Sankare, O., Sow, M., Di Deco, M. A., and Coluzzi, M. 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa, 26: 477-511, Parasitologia.
- Trape, J. F., Pison, G., Spiegel, A., Enel, C., and Rogier, C. 2002. Combating malaria in Africa. Trends Parasitol 18: 224-30.
- Trewick, S. A. 2000. Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand *Peripatoides* (Onychophora). Mol Ecol 9: 269-81.
- Trung, H. D., Van Bortel, W., Sochantha, T., Keokenchanh, K., Quang, N. T., Cong, L. D., and Coosemans, M. 2004. Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia. Trop Med Int Health 9: 230-7.
- Turelli, M., Barton, N. H., and Coyne, J. A. 2001. Theory and speciation. Trends Ecol. Evol. 16: 330-343.
- Van Bortel, W., Trung, H. D., Manh, N. D., Roelants, P., Verle, P., and Coosemans, M. 1999. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. Trop Med Int Health 4: 257-265.
- Van Bortel, W., Trung, H. D., Roelants, P., Harbach, R. E., Backeljau, T., and Coosemans, M. 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex. Insect Mol Biol 9: 335-40.
- Van Bortel, W. 2002. Recognition and characterisation of the members of the *Anopheles minimus* complex: towards improved malaria vector species identification. Institute of Tropical Medicine, Antwerp.
- Van der Brug, P. H. 1997. Malaria in Batavia in the 18th century. Trop Med Int Health 2: 892-902.
- van der Kaars, S., Penny, D., Tibby, J., Fluin, J., Dam, R., and Suparan, P. 2001. Late quaternary Palaeoecology, Palynology and Palaeolimnology of a tropical lowland swamp: Rawa Danau, West-Java, Indonesia. Palaeogeog, Palaeoclim, Palaeoecol 171: 185-212.

- Verstappen, H. T. 1997.** The effect of climatic change on southeast Asian geomorphology. *Journal of Quaternary Science* 12: 413-418.
- Walsh, J. B. 1982.** Rate of accumulation of reproductive isolation by chromosomal rearrangements, 120: 510-532, *Am Nat.*
- Walton, C., Handley, J. M., Kuvangkadilok, C., Collins, F. H., Harbach, R. E., Baimai, V., and Butlin, R. K. 1999.** Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med Vet Entomol* 13: 24-32.
- Walton, C., Handley, J. M., Tun-Lin, W., Collins, F. H., Harbach, R. E., Baimai, V., and Butlin, R. K. 2000.** Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Mol Biol Evol* 17: 962-74.
- Webster, J. 2000a.** Malaria consortium - East Timor. RBM Complex Emergency Malaria Technical Support.
- Webster, J. 2000b.** Malaria consortium - Cambodia. RBM Complex Emergencies Technical Support Network.
- Weir, B. S., and Cockerham, C. C. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- White, G. B. 1985.** *Anopheles bwambae* sp.n., a malaria vector in Semliki Valley, and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex (Diptera : Culicidae). *Syst Entomol* 10: 501-522.
- White, M. D. J. 1973.** Animal cytology and Evolution. In U. P. Cambridge [ed.]. Cambridge, University Press, Cambridge.
- WHO. 1976.** Resistance of vectors and reservoirs of disease of pesticides. 22th report of the WHO expert committee on insecticides. WHO Tech. rep.ser. 585.
- Wondji, C., Simard, F., and Fontenille, D. 2002.** Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol. Biol.* 11: 11-9.
- Yang, Z., and Rannala, B. 1997.** Bayesian Phylogenetic Inference using DNA sequence: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Mol Biol Evol* 14: 717-724.
- Zheng, L., Benedict, M. Q., Cornel, A. J., Collins, F. H., and Kafatos, F. C. 1996.** An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics* 143: 941-52.

## **ENCADRES, FIGURES, ILLUSTRATIONS ET TABLES**

---

## ENCADRES

Encadré I-1 : symptômes du paludisme	9
Encadré I-2 : les membres de la série Pyretophorus (Harbach 1994)	11
Encadré I-3 : études de cytogénétiques chez <i>An. sundaicus</i> s.l.	19
Encadré I-4 : études isoenzymatiques chez <i>An. sundaicus</i> s.l.	19
Encadré II-1 : quelques définitions du concept d'espèces	28
Encadré II-2 : méthodes de phylogénie	30
Encadré II-3 : clades et lignées	32
Encadré II-4: ADNr et évolution concertée	67
Encadré III-1 : espèces cryptiques, espèces jumelles.	90
Encadré IV-1 : le projet MALVECASIA	93
Encadré IV-2 : description du Vietnam	94
Encadré IV-3 : Système d'Information Géographique	102

---

## FIGURES

Figure 1 : distribution du paludisme dans le monde. Copyright <a href="http://rbm.who.int">http://rbm.who.int</a>	4
Figure I-1 : classification des Anopheles de l'ordre au sous-genre. Le nombre d'espèces dans les sous-genres est indiqué entre parenthèses.7	
Figure I-2 : cycle de transmission du paludisme (d'après <a href="http://www.millerandlevine.com/chapter/20/fig-20-7.html">http://www.millerandlevine.com/chapter/20/fig-20-7.html</a> )	9
Figure I-3: distribution of the <i>An. sundaicus</i> complex. Coastal areas lined in black represent the currently recognized distribution. Grey zones are areas where <i>An. sundaicus</i> reportedly disappeared. The taxon is absent or has never been recorded from uncolored areas.	13
Figure I-4 : range and optimal range of salinity reported for breeding sites of <i>An. sundaicus</i> in various countries.	16
Figure II-1 : localisation des populations utilisées lors cette étude.	29
Figure II-2: reported distribution of <i>An. sundaicus</i> s.l. in the studied area (shaded area) and the localities of the six populations studied (black dots).	38
Figure II-3 : maximum parsimony tree derived from the analysis of 930 bp of combined COI and Cyt-b nucleotide sequences. The analysis was performed with unweighted characters and by a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with band swapping by tree bisection-reconnection. Bootstrap support values were calculated by a heuristic search using 500 stepwise addition sequences for each replicate and TBR branch swapping. See Table 6 for abbreviations for populations.	44
Figure II-4 : multiplex PCR for the identification of <i>An. sundaicus</i> s.s. (lanes 2–4; Malaysian Borneo) and <i>An. sundaicus</i> species A from coastal areas of continental Southeast Asia (lane 5, Thailand; lanes 6–7, Vietnam). Lane 1 = 100 bp ladder.	44
Figure II-5 : map of Southeast Asia showing the locations of populations of <i>An. sundaicus</i> s.l. studied and its known distribution (in grey)	49
Figure II-6 : ML rooted tree after bootstrapping 1,000 times. Support values are for reconstruction based on the K81uf+G+I, gamma = 0.7867 and pinv = 0.6227 model (values on the left). The additional support values correspond to ML reconstruction based on HKY+G+I, gamma = 0.7827 and pinv = 0.7318 model (central values) and MP reconstruction (values on the right) with unweighted characters and a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with tree bisection reconnection branch swapping options. Bootstrap support values were calculated by heuristic search using 10 stepwise addition sequences for 1,000 replicates and TBR branch swapping. Specimens in bold were studied by Dusfour et al. (2004b).	55
Figure II-7 : bayesian tree derived using MrBayes3b4. MCMCMC sampling was performed with five incrementally heated chains that were simultaneously run for 1,000,000 generations, using the default program for starting values. Five hundred generations were burned-in. The remaining generations were used to reconstruct the topology and calculate prior probabilities for each node. Specimens in bold were studied by Dusfour et al. (2004b).	56
Figure II-8 : unrooted ML tree after 1,000 bootstraps. Support values indicated on branches are for ML reconstruction based on the HKY+G+I, gamma = 0.7827 and pinv = 0.7318 model (values on the left). The additional support values correspond to the MP tree constructed with unweighted characters and by a heuristic search using 100 random stepwise additions of sequences, with tree bisection reconnection branch swapping options (central value). Bootstrap support values calculated for trees by heuristic search using 10 stepwise addition sequences for 1,000 replicates and TBR branch swapping. Posterior probabilities of BA analysis are on the right side.	57
Figure II-9 : carte de la distribution du Complexe Sundaicus avec extrapolation à partir des sites où les espèces sont connues. Vert: <i>An. sundaicus</i> s.s.; Rouge: <i>An. epiroticus</i> ; Bleu: <i>An. sundaicus</i> espèce E; Jaune: <i>An. sundaicus</i> forme D.	64

Figure II-10 : structure de l'ADN ribosomal. Chaque copie est composée de trois gènes (18S, 5.8S, 28S) et des régions non codantes l'ETS (External Transcribed Spacer), les ITS1 et 2 (Internal Transcribed Spacer 1 et 2) et l'IGS (Intergenic Spacer).	67
Figure III-1: schéma de la larve de quatrième stade, A: tête, B: thorax et abdomen C: Segment VII, VIII et X d' <i>An. sundaicus</i> s.s., D: soie 1-IV (d'après Linton et al. 2001)	74
Figure III-2 : schéma de la pupa (A et B) et du génitalia (C) de la larve mâle d' <i>An. sundaicus</i> s.s. (d'après Linton et al. 2001)	75
Figure III-3 : types d'ailes observés chez <i>An. sundaicus</i> s.s., schéma d'après Linton et al. (2001a). AP= spot pâle apical, HP = spot pâle humeral; PP = spot pâle préapical; PSP = spot pâle présectoriel; SCP = spot pâle subcostal; SP = spot pâle sectoriel.	78
Figure III-4 : résultats de l'Analyses en Coordonnées Principales (ACP) sur les caractères observés pour les larves. Représentation des axes F1 et F2. <i>An. sundaicus</i> s.s. est représenté en vert, <i>An. epiroticus</i> en rouge et <i>An. sundaicus</i> espèce E en bleu.	80
Figure III-5 : résultats de l'ACP sur les caractères observés pour les pupes. Représentation des axes F1 et F2. <i>An. sundaicus</i> s.s. est représenté en vert, <i>An. epiroticus</i> en rouge et <i>An. sundaicus</i> espèce E en bleu.	80
Figure III-6 : positionning of primers on the Cyt-b sequence alignment of the three species	87
Figure III-7 : positioning of primers on the COI sequence alignment of the three species	88
Figure III-8 : multiplex PCR for the identification of <i>An. sundaicus</i> s.s. (lane 1), <i>An. epiroticus</i> (lane 2) and <i>An. sundaicus</i> species E (lane 3) with the specific band for the complex. Lane 1 = 1 kb ladder.	88
Figure IV-1 : carte des trois pays de la région du Mékong inclus dans le SIG du projet MALVECASIA	93
Figure IV-2 : carte générale du Vietnam	94
Figure IV-3 : représentation des canaux d'irrigation et des rivières dans le sud du Vietnam. Les bras du delta du Mékong sont représentés par des étendues bleues.	95
Figure IV-4 : répartition des sites d'étude dans les provinces du sud Vietnam. Les sites sont identifiés par leur code village (Table IV-1).	99
Figure IV-5 : articulation du SIG autour des collectes de terrain jusqu'à l'utilisation dans le SIG	103
Figure IV-6 : répartition des sites d'étude dans les provinces du sud Vietnam. Les sites sont identifiés par leur code village (Table IV-2). Les rectangles représentent le découpage réalisé pour les cartes présentées ci-après	105
Figure IV-7 (en haut) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes (nombre de moustiques capturés par maison par nuit) capturées sur appât humain en avril/mai 2003 incluant les densités d' <i>An. sundaicus</i> .	106
Figure IV-8 (en bas) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur appât humain en avril/mai 2003 n'incluant pas les densités d' <i>An. sundaicus</i>	106
Figure IV-9 (en haut) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur appât humain en octobre/novembre 2003 incluant les densités d' <i>An. sundaicus</i>	107
Figure IV-10 (en bas) : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur appât humain en octobre/novembre 2003 n'incluant pas les densités d' <i>An. sundaicus</i>	107
Figure IV-11 : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur bétail en avril/mai 2003 (nombre de moustiques capturés par maison par nuit)	108
Figure IV-12 : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées sur bétail en octobre/novembre 2003 (nombre de moustiques capturés par maison par nuit)	108
Figure IV-13 : pourcentage d' <i>An. sundaicus</i> piquant les hommes à l'intérieur des maisons selon le calcul (densité d' <i>An. sundaicus</i> / homme / nuit à l'intérieur)/(densité d' <i>An. sundaicus</i> / homme / nuit à l'intérieur + de densité d' <i>An. sundaicus</i> / homme / nuit à l'extérieur)	109
Figure IV-14 (en haut): proportions relatives de la densité d' <i>An. sundaicus</i> capturées sur appât humain et de la densité d' <i>An. sundaicus</i> capturées sur bétail en avril/mai 2003	110
Figure IV-15 (en bas) : proportions relatives de la densité d' <i>An. sundaicus</i> capturées sur appât humain et de la densité d' <i>An. sundaicus</i> capturées sur bétail en octobre/novembre 2003.	110
Figure IV-16 : localisation des 18 sites d'étude dans les zones écogéographiques du sud Vietnam. Les sites encerclés d'orange sont en limite ou hors de l'influence des marées.	111
Figure IV-17 : répartition des sites d'étude dans les provinces du sud Vietnam	112
Figure IV-18: proportions relatives d' <i>An. sundaicus</i> sensibles (gris clair) et résistants (gris foncé) au DDT 4% (a), à la perméthrine 0,75% (b), à la lambda-cyhalothrine 0,05% (c) et à l'alpha-cyperméthrine 30 mg/ml (d).	117
Figure IV-19 : carte des provinces du sud du Vietnam	119

## ILLUSTRATIONS

Illustration I-1 : <i>An. sundaicus</i> s.l. (Photo Mr Michel Dukhan, IRD, 2003.) Collecté en Janvier 2003 dans la province de Bac Lieu, Vietnam.	10
Illustration I-2 : gîtes larvaires d' <i>An. sundaicus</i> s.l.	15
Illustration IV-1 : canal de la province de Ben Tre, Vietnam (photo I. Dusfour, 2003)	95
Illustration IV-2 : exemple d'affichage pour la prévention du paludisme dans le sud Vietnam	98

## TABLES

Table I-1 : behavior of <i>An. sundaicus</i> observed in different localities	17
Table I-2 : résumé des différences entre les chromosomes polytènes et mitotiques des trois formes d' <i>An. sundaicus</i> . +, presence ; -, absence ; ch, block d'hétérochromatine péricentrique du chromosome 2.	19
Table I-3 : résumé des fréquences alléliques de Mpi pour chacune des espèces discriminées par l'étude en cytogénétique.	19
Table I-4 : sporozoite rates observed in different populations of <i>An. sundaicus</i> .	20
Table I-5 : chronological listing of insecticide resistance noted in different populations of <i>An. sundaicus</i> .	22
Table II-1 : résultats des tests de marqueurs moléculaires.	34
Table II-2 : location, number, conservation state, date of collection, and type of larval habitat for specimens of <i>An. sundaicus</i> s.l. used in this study. Numbers of specimens analyzed per mtDNA gene region are also listed.	38
Table II-3 : percentage of AT richness and relative positions (Pos.) of variable/parsimony informative nucleotides associated with codon positions 1, 2, and 3 for the amino-acid translation of the respective partial sequences of COI and Cyt-b generated in this study. Percentage values in parentheses indicate the proportion of variable sites compared to all sites and the proportion of parsimony informative sites compared to all polymorphic sites.	40
Table II-4 : values of Tamura-Nei genetic distances between populations. Genetic distances for COI (below diagonal line) and Cyt-b (above diagonal line) as well as sequence diversities for COI and Cyt-b.	42
Table II-5 : origin of mosquitoes, population code (PC), year of collection (Y), type of larval habitat (LH) numbers of specimens analysed for COI and Cyt-b individually and in combination.	50
Table II-6 : results of Tajima's relative rate test (chi-square and p value) between clades. Tamura Nei (93) net genetic distances and standart error (SE) are indicated and were used to calculate, based on 2% divergence per myr, the interval of time for divergence.	54
Table II-7 : mtDNA diversity parameters: number of specimens (N), segregation sites (S), nucleotide diversity (p), haplotype diversity (h) and mean number of pairwise differences (k) for each mitochondrial marker and each lineage.	58
Table II-8 : proportions of the four ITS2 types distributed among clades. The types are characterized by the nucleic acid in positions 413, 472 and 537 of the ITS2 sequence.	59
Table III-1 : liste et nombre (n) de spécimens étudiés par espèce et par stade, lieu et année de collection.	78
Table III-2 : valeurs de minima, maxima, moyennes et écart-types calculés pour chaque espèce.	81
Table III-3 : probabilités résultantes de la comparaison des moyennes des ratios entre deux espèces. Pa pour les palpes maxillaires, C pour celui de la costa et M pour le ratio de la veine M3+4. Les valeurs avec une étoile sont significatives. Les moyennes des espèces pour lesquelles cette valeur a été trouvée sont donc différentes.	81
Table III-4 : list of collection sites and number of specimens tested during the PCR validation phase	85
Table III-5 : list of primers with their characteristics: name, gene where they were designed, specificity, primer sequences, annealing temperature and fragment size.	86
Table IV-1 : code village, coordonnées et position administrative des villages étudiés. Les sites en gras sont ceux visités au mois d'avril, ceux signalés avec * ont été visités en avril et en octobre, et ceux en écriture normale ont été visités uniquement au mois d'octobre.	100
Table IV-2 : méthodes de collecte utilisées en fonction des sites. Les cases cochées entre parenthèses indiquent la méthode pour la seconde collecte entomologique de ce site. (IH: collecte intérieure sur homme; OH collecte extérieure sur homme; OC collecte extérieure sur bétail; RMI collecte intérieure de faune résiduelle)	100
Table IV-3 : caractéristiques environnementales des sites visités. B=bananier, C=cocotier, E=eucalyptus, F=arbres fruitiers, FC=ferme de crevettes, AP=culture annuelle/pluriannuelle, M=mangrove, R=rizière, Rt=reforestation	113
Table IV-4 : surfaces agricoles en km <sup>2</sup> des 100 km <sup>2</sup> autour de chaque site et densité collectée sur appât humain en avril-mai et octobre 2003 pour les sites VCMC, VCMD, VSTA et VTVA (nombre de moustiques / homme / nuit).	115
Table IV-5 : résultat du test de corrélation de Spearman entre la densité d' <i>An. sundaicus</i> et les surfaces agricoles. La valeur significative est en gras.	116
Table IV-6 : identification des sites où <i>An. sundaicus</i> est endophile et où le statut de résistance est à surveiller. Les deux sites où <i>An. sundaicus</i> présente un pourcentage de résistants supérieur à 10 pour les trois pyréthrinoides, sont représentés en gras.	121

## **ANNEXES**

## Morphological and molecular identity of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia

YVONNE-MARIE LINTON\*, RALPH E. HARBACH\*, CHANG MOH SENG†, THOMAS G. ANTHONY\* and ASMAJ MATUSOP‡

\*Department of Entomology and Biomedical Sciences Theme, The Natural History Museum, Cromwell Road, London, U.K.

†Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Malaysia Sarawak, Jalan Tun Ahmad Zaidi Adruce, Kuching and

‡Vector Borne Disease Control, State Health Department, Jalan Tua Abang Hj Openg, Kuching, Sarawak, Malaysia

**Abstract.** A neotype for *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Rodewaldt), the nominotypical member of a malaria vector species complex, is selected from the progeny of a female collected at Pandan Beach near Lundu, Sarawak, Malaysia. Siblings of the neotype and other topotypic specimens are used to characterize and fix the morphological and molecular identity of the species as a foundation for systematic studies of the species complex. The species is described and illustrated in the adult, pupal and larval stages, and DNA sequence data are included for the mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) gene and the nuclear ITS-2 region.

### Introduction

*Anopheles sundaicus* (Rodewaldt) is an important vector of malaria on islands and coastal areas of Southeast Asia. It is widely distributed from southern India to Vietnam and southward through the Nicobar and Andaman Islands, and the islands of Sumatra, Borneo, Sulawesi and Java. The taxon was originally described by Rodewaldt (1925), as *Myzomyia ludlowi* variety *sundaica* from specimens collected on the Sunda Islands, Java, Sumatra and Borneo, but no type specimens exist (Bonne Wepster & Swellengrebel, 1953; Reid, 1968; Knight & Stone, 1977). Differences in feeding and resting behaviour of females and the occurrence of larvae in fresh and brackish water habitats suggest that *An. sundaicus* is a complex of sibling species. This hypothesis is supported by the discovery of three cytological forms (A, B, C), based on differences in ovarian polytene chromosomes and mitotic karyotypes in larval neuroblast cells (Sukowati & Barina, 1996). Additional evidence of isoenzyme differentiation indicates that sympatric populations of the three cytotypes in Sumatra and Java are reproductively isolated (Sukowati *et al.*, 1999).

*Anopheles sundaicus* belongs to the Pyrethrophorus Series of subgenus *Cellia* Theobald. The series includes sixteen formally named species (Harbach, 1994): eight in the Afrotropical Region and eight in the Oriental Region. Species in Africa include *An. christyi* (Newstead & Carter), *An. daudi* Coluzzi and six members of the notorious Gambiae Complex: *An. gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. bwambae* White, *An. melas* Theobald, *An. merus* Dönitz and *An. quadrimaculatus* (Theobald). In addition to *An. sundaicus*, the Oriental species include *An. indefinitus* (Ludlow), *An. limosus* Kamp, *An. litoralis* Kamp, *An. hadlowae* (Theobald), *An. parungensis* (Ludlow), *An. subpictus* Grassi and *An. vagus* Dönitz. The systematics of the Pyrethrophorus Series is currently under study in our laboratory and a more thorough treatment of the Sundaicus Complex in Southeast Asia will appear later. The purpose of this paper is to fix the identity of *An. sundaicus* s.s. as a foundation for further studies and the formal taxonomic recognition of other species of the complex.

In 1999, we had the opportunity to collect and individually rear numerous samples of 'sundaicus' from brackish and fresh water habitats in Sarawak, Malaysia. In recognition of the historical association of *An. sundaicus* with brackish water, we have chosen to select a neotype and characterize the species from a coastal population where larvae occur in brackish water habitats. Although it is apparent that Rodewaldt's (1925)

Correspondence: Yvonne Linton, Department of Entomology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, U.K. E-mail: Y.Linton@nhm.ac.uk

description of *sundatica* was based principally on specimens from the Lesser Sunda Islands, we feel justified in selecting a neotype from Sarawak for two reasons: (1) Rodenwaldt noted that specimens were also collected from unspecified localities on Borneo, as well as Java and Sumatra, and (2) none of the specimens immediately available to us from other Sunda Islands were individually reared for morphological study of associated life stages or appropriately preserved for DNA analysis.

#### Materials and methods

This study is based on specimens collected along the shore of the South China Sea at Pandan Beach, Lundu District, Sarawak, Malaysia (northwestern coast of Borneo; 1°42'N 109°52'E). Wild caught larvae and the progeny of wild caught adults were individually reared to provide adults with associated larval and pupal exuviae. Observations of adults were made under simulated natural light. Larval and pupal chaetotaxy were studied using differential interference contrast microscopy. Measurements and counts were made from at least ten specimens. Unless indicated otherwise, numbers in parentheses represent modes of the reported ranges. The morphological terminology used in the species description follows Harbach & Knight (1980, 1982). Type specimens are deposited in the Sarawak Biodiversity Centre (SBC), Kuching (full address in Acknowledgements), and The Natural History Museum (BMNH), London.

DNA was extracted from fifty six specimens, including siblings of the neotype and paratypes, which were either preserved in 95% ethanol or dried over silica gel in the field. Mosquitoes were homogenized in 100 µl of extraction buffer (0.2 M sucrose, 0.1 M Tris-HCl at pH 8.0, 50 mM EDTA and 0.5% SDS). The tubes were incubated at 65 °C for 10 min, 24 µl 5 mM KOAc (pH 9.0) added and the tubes placed on ice for another 10 min. Supernatant was removed to a clean tube and 100 µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (BDH, Poole, UK) was added, and the tubes vortexed before spinning at 13 200 rpm for 1 min. The supernatant was again cleaned using analar chloroform (BDH), removed to a clean tube with 90 µl isopropanol (BDH) and stored at -20 °C overnight. Samples were then centrifuged at 13 200 rpm for 10 min to pellet the DNA. The pellet was washed once with 100 µl cold 70% ethanol and spun at 13 200 rpm for 10 min, then again with cold absolute ethanol. The pellet was dried for 10 min at 37 °C before being re-suspended in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. Two µl of re-suspended DNA was used in each PCR reaction.

The 522 bp COI gene fragment was amplified using the universal insect primers C1-J 1718 and C1-N 2191 (Simon *et al.*, 1994). The last five digits of these primer codes indicate the position and orientation of the 3' end of the primers with respect to the *Drosophila yakuba* (X03240) mtDNA genome (Clary & Wolstenholme, 1985). Amplification of the 662 bp amplicon of the ITS 2 nuclear ribosomal spacer region was carried out using the 58NF and 28SR primers recommended by Collins & Paskewitz (1996). In both cases, PCR products

were amplified using the following reaction mix (50 µl): 2 µl DNA, 25.5 µl ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (BioLanc, London, UK), 0.1 µl Taq polymerase (BioLanc) and 5 µl each of primers at 5 µM, 2 mM dNTPs (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) and 10× NH<sub>4</sub> buffer (BioLanc). The PCR thermocycle program consisted of a 2 min denaturation at 94 °C, 34 cycles at 94 °C, 53 °C (ITS 2)/57 °C (COI) and 72 °C for 30 s each, followed by a 10 min extension at 72 °C. Sequence data were obtained following PCR purification using a commercially available PCR purification kit (QIAGEN Ltd, Sussex, UK), and products diluted to 1 ng/µl/200 bp of product for sequencing. Cycle sequencing reactions were prepared using Big Dye Terminator Kit (PE Applied Biosystems) and read by an ABI 377 automated sequencer (PE Applied Biosystems). Sequence data were edited and aligned on Macintosh™ computers using Sequencher™ 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.). After sequencing, the DNA was dried and retained at -70 °C for future reference.

#### *Anopheles (Cellia) sundaticus* (Rodenwaldt)

*Myzomyia ludlowi* variety *sundatica* Rodenwaldt, 1925.  
Neotype (hereby designated): ♀ (MA10234) with associated fourth instar larval and pupal exuviae on microscope slide, MAJAYSIA, Sarawak, Lundu District, Lundu, Pandan Beach (SBC).

**Diagnosis.** Adults of *An. sundaticus* are distinguished from other members of the Pyrethrophorini Series in the Oriental Region in having speckled legs (distinction from *An. indefinitus*, *An. limosus*, *An. subpectus* and *An. vagus*), subapical dark band of maxillary palpus equal to or greater than half length of apical pale band (distinction from *An. indefinitus*, *An. limosus* and *An. vagus*), prehumeral area of costa dark scaled (distinction from *An. limosus*, *An. litoralis*, *An. ludlowae* and *An. parangensis*), and vein with 2 dark spots (distinction from *An. parangensis*), and pale fringe spot absent between the cubitus and anal vein (distinction from *An. ludlowae* and *An. parangensis*). Pupae have seta 6 IV branched (distinction from *An. litoralis*, *An. ludlowae* and *An. vagus*), paddle marginal spicules with hooked tips (distinction from *An. limosus*, *An. litoralis* and *An. vagus*), refractive index of paddle not more than 0.75 (distinction from *An. ludlowae* and *An. subpectus*) and seta 1 P less than two-thirds paddle length (distinction from *An. parangensis*). Pupae of *An. sundaticus* are indistinguishable from those of *An. indefinitus* (Reid, 1968). Larvae are more easily distinguished than pupae: seta 3 C half or more length of seta 2 C (distinction from *An. limosus* and *An. vagus*), setae 9, 10, 12 P, M with simple branches (distinction from *An. parangensis*), seta 6 IV VI branched at base (distinction from *An. ludlowae*), seta 3 C less than three-fourths length of seta 2 C and seta 1 P usually with more than eight branches (distinctions from *An. litoralis*), and seta 4 M with branches (usually three) arising at base (distinction from *An. subpectus* and *An. malehatana*).

**Female Head:** Vertex with white to yellowish erect scales behind frontal tuft, black erect scales posteriorly, frontal tuft with long white setae. Clypeus bare. Antenna length about 1.1 mm, pedicel with small pale scales on mesal surface; flagellomeres 1 and 2 with elongate pale scales on mesal surface. Proboscis about 1.8 mm, about same length as forefemur, prementum entirely dark scaled, scales appressed throughout; labella pale. Maxillary palpus (in dorsal view) with 3 pale bands, apical pale band about length of preapical dark band, preapical pale band narrow, proximal pale band at apex of palpomere 2 represented by few scales, palpomere 2 with semi erect scales giving a bushy appearance to proximal portion of palpus; pale bands at apices of palpomeres 2 and 3 usually incomplete ventrally. **Thorax:** Integument dark brown to black, pleura with usual grey pollinose and darker transverse areas; scutum with broad median pale pollinose area partially divided medially by very narrow dark line on acrostichal area, pale area on either side of prescutellar area confluent with pale lateral areas of scutellum, likewise dark prescutellar area confluent with dark median area of scutellum. Scutum sparsely covered with fine golden piliform scales, anterior pronotory with long pale setae and piliform scales mesally; extreme anterior area of scutum before scutal fossa with patch of long black scales and setae. Scutellum with long dark setae (bronze to brown) and golden piliform scales. Mesopostnotum and postpronotum bare. Anteppronotum without scales, with dark setae. Pleura with brown to golden setae on upper proepisternum, prespiracular area prealar knob, upper and lower mesokatepisternum and upper mesepisternum. **Wing (Fig. 1):** Length about 3.5 mm; dark scaling black, pale scaling pale yellow, not white; costa with humeral pale, subcostal pale and preapical pale spots, presector pale and sector pale spots present or absent, prehumeral area entirely dark scaled; remigium pale scaled; vein R family pale brown at base, with long presector pale spot and short sector pale spot;  $R_1$  with relatively short sector dark spot bearing a pale interruption, with long subcostal pale spot about twice length of subcostal pale spot on costa, and preapical pale spot same length as that on costa,  $R_2$  with preapical dark spot,  $R_{2+3}$  with submedian dark spot,  $R_3$  with small basal dark spot and longer preapical dark spot, sometimes largely or completely dark scaled,  $R_4$  with submedian dark spot and small preapical dark spot;  $R_{4+5}$  largely pale scaled, with small dark spots near base and apex and small dark scaled basal spur; medius with black spot proximal to branching of  $M_{4+5}$ ,  $M_{5+6}$  largely dark scaled,  $M_7$  and  $M_8$  with postbasal and preapical dark spots,  $M_9$  sometimes largely or completely dark scaled, mediotubital crossvein mainly dark scaled,  $M_{4+c}$  and  $CuA$  mainly pale scaled with postbasal and preapical dark spots; anal vein with median and apical dark spots, apices of all veins from  $R_1$  to  $CuA$  narrowly pale scaled, apex of anal vein without scales, narrow pale fringe spots at apices of all veins from  $R_1$  to  $1A$  and a larger one at margin of anal cell (total of 10 pale fringe spots), latter often faint but associated tertiary fringe scales (not shown in Fig. 1) usually distinctly pale. **Holter:** Pedicel pale, scabellum and capitellum dark, capitellum dark scaled. **Legs:** Forecoxae with 1 or 2 dark scales anteriorly at base, mid and hindcoxae without scales, foretrochanter mainly dark scaled posteriorly,

with some pale scales distally, mid and hindtrochanters without scales; femora, tibiae and first tarsomeres with speckles and blotches of pale yellow scaling fore and midtarsi with fairly broad pale bands across joints between tarsomeres 1, 2, 2, 3 and 3, 4, tarsomere 4 entirely dark or very narrowly pale at apex; hindtarsus with narrow pale bands at apices of tarsomeres 1–4, tarsomere 5 entirely dark. **Abdomen:** Integument dark with long golden setae, scales absent except for yellow piliform scales on posterior area of tergum VIII, cercus with black scales proximally and yellow scales distally.

**Male:** Similar to female except for obvious sexual differences, wing generally paler and scaling reduced; other differences include the following. **Head:** Proboscis longer, about 2.2 mm, approximately 1.6 length of forefemur. Maxillary palpus with patches of yellow scales as follows: dorsal patch at apex of palpomere 2 and near middle of palpomere 3, lateral patch at apex of palpomere 3, palpomere 4 with large patch covering most of dorsal and lateral surfaces, dark scaled at base and apex, without scales ventrally; palpomere 5 mainly pale scaled, narrowly dark scaled at base, ventral surface without scales, integument dark at base and pale distally. **Wing:** Veins with fewer scales, all spots posterior to radius and  $R_1$  subdued, pale fringe spots indistinct. **Abdomen:** Tergum VIII largely covered in white to yellow falcate scales. **Genitalia (Fig. 2C):** Gonocoxite with yellow scales on lateral and dorsal surfaces, with 5 parabastral setae; gonostylus strongly and evenly curved in distal half, with row of minute setae along sternomesal margin from near base to near apex, 2 or 3 longer setae on tergal side near apex, claspette with long apical seta about twice length of club, small conical seta sternad of apical seta and 1 or 2 short needlelike setae lateral of apical seta, club formed of 4 or 5 fused setae; aedeagus with 5 or 6 pairs of leaflets, leaflets without teeth or serrations; tergum and sternum IX fused to form complete ring, tergum with rounded lateral lobes proctiger membranous, cleft apically, with lightly sclerotized but distinct paraprost on either side (unique for *Anopheles*).

**Pupa (Fig. 2A,B):** Characters and positions of setae as figured numbers of branches in table 1. **Cephalothorax:** Lightly to moderately pigmented, proboscis and legs slightly darker; seta 7 CT long, about twice length of 6 CT; 8 CT nearly always single. **Truncus:** Moderately pigmented, pinna with short proximal slit; length 0.41–0.48 mm ( $x = 0.45$  mm), width at base 0.09–0.11 mm ( $x = 0.10$  mm), index 4.09–4.80 ( $x = 4.47$ ). **Abdomen:** Length 2.45–3.03 mm ( $x = 2.75$  mm); lightly pigmented, anterior margins of sterna darker, progressively lighter after sternum IV, terga and sterna minutely spiculate. Seta 0 II–VII minute, simple, inserted anterior and mesad of seta 2; 1 V–VII long, single, simple, about 1.5 length of tergum, 6 II usually single, occasionally double, long, about twice length of 7 II, 6 III–VII branched, usually triple on segments III and IV and double on V–VII; 8 II usually absent, 9 I single, long, approaching length of 6 I; 9 II, III very short blunt; 9 IV long and 9 V–VII very long, curved, simple and sharply pointed, 9 IV about half length of 9 V, 9 V–VII about 0.6 length of tergum, 9 VIII relatively short, slightly shorter than 9 VII, about length of 4 VIII, pilinose with 9–14(10) close set branches arising from broad

flattened central stem; 10-II absent. *Genital lobe*. Length about 0.2 mm in female, about 0.4 mm in male, with nipple at apex. *Paddle*. Lightly pigmented (hyaline), buttress and midrib slightly darker, asymmetrical, outer part larger than inner part, length 0.68–0.80 mm ( $\bar{x}$  = 0.76 mm), width 0.51–0.59 mm ( $\bar{x}$  = 0.54 mm), index 1.33–1.51 ( $\bar{x}$  = 1.42), marginal serrations begin 0.43–0.59 ( $\bar{x}$  = 0.52) from base and end 0.69–0.75 ( $\bar{x}$  = 0.72) from base; retractile index 0.69–0.75 ( $\bar{x}$  = 0.72); marginal spicules with hooked tips (not evident in figure), not reaching seta 1-Pa. Seta 1-Pa long, hooked, about one-third length of paddle, arising from shallow emargination at apex.

*Larva, fourth-instar* (Fig. 3). Character and positions of setae as figured; numbers of branches in Table 2. *Head*. Slightly longer than wide, length 0.66–0.72 mm ( $\bar{x}$  = 0.68 mm), width 0.51–0.60 mm ( $\bar{x}$  = 0.64 mm); lightly to moderately pigmented, dark patches (not shown in figure) behind setae 5–7-C and ventrally on gula and ventral area of lateralia, collar

and mentum darkly pigmented. Setae 2,3,4-C single, simple, 3-C 0.5–0.6 length of 2-C, 4-C inserted in line with to slightly laterad of 2-C reaching anteriorly beyond base of 2-C; 8-C usually single or double, occasionally triple; 9-C with 3–6 branches, most often with 5 or 6 branches, 13-C with 3–6 branches, most often with 4 branches. *Antenna*. Mainly lightly pigmented, progressively darker distally, apex darkly pigmented; mesal and ventral surfaces spiculate, length 0.22–0.27 mm ( $\bar{x}$  = 0.25 mm). Seta 1-A short, single, simple, length about diameter of antenna; 4-A with 2–4 branches, usually triple or 4-branched. *Thorax*. Integument hyaline, smooth. Seta 1-P with 6–15(10) branches, inserted on very small tubercle that is not joined to slightly larger tubercle bearing 2-P; 9-P single to 4-branched, usually double, branches simple; 9-M and 10,12-P,M single, simple; 11-P single, significantly larger than 11-M, 11-T apparently absent, support plate of pleural setal groups 9–12 P,M,1 with strong spine, 14-P with 3 or 4 branches, usually

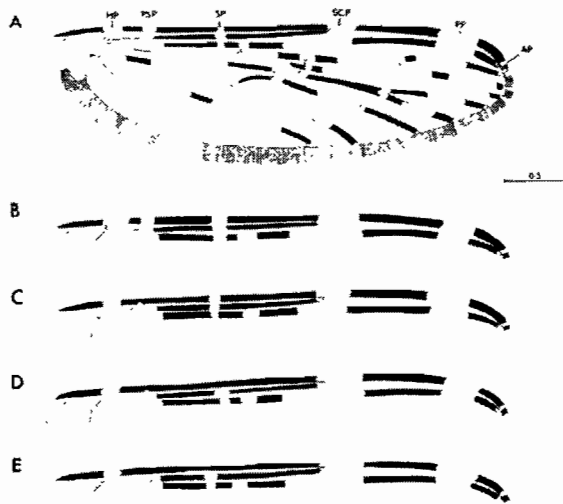
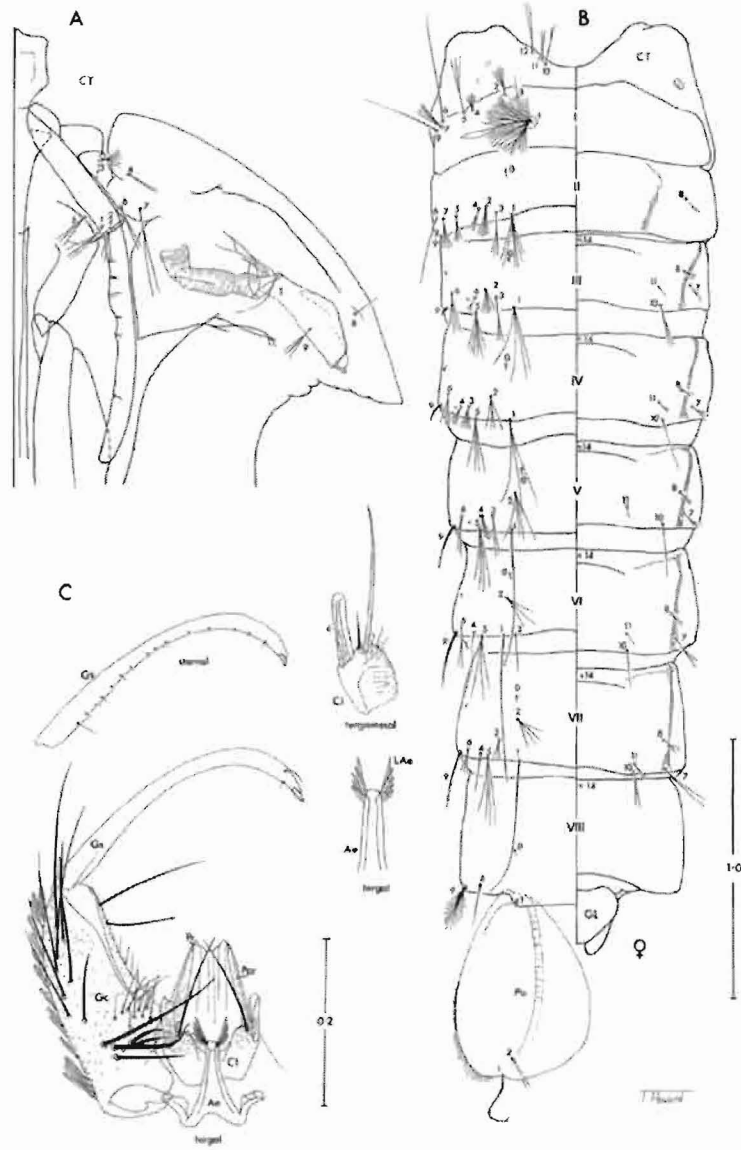


Fig. 1. Schematic outline drawings illustrating the wing (A) and variation of costal spots (B, C, D, E) in *Anopheles (Culiseta) simulans* (C. neotype). AP = apical pale spot, HP = humeral pale spot, PP = preapical pale spot, PSP = presector pale spot, SP = sector pale spot. Scale in mm.

Fig. 2. Pupa and male genitalia of *Anopheles (Culiseta) simulans*. Pupa: (A) left side of cephalothorax, dorsal to right, (B) dorsal (left) and ventral (right) aspects of metathorax and abdomen. C, Male genitalia, aspects as indicated. Ae = aedeagus, cl = club of claspette, Cl = claspette; Ct = cephalothorax, Gc = gonocoxite, GL = genital lobe, Gs = gonostylus, LAe = leaflets of aedeagus, Pr = paddle, Ppr = paracope, Pr = proxiger; 1 = nuplet, I–VIII = abdominal segments I–VIII, 0–14 = setal numbers for specified areas, e.g. seta 3.1. Scales in mm.



4, 4 M usually triple, rarely with 2 or 4 branches, with branches arising at base, 14 M with 5 (2/9) branches arising from one side of stem, 3 I with 1 (6/4) weak branches (not palmate); 9, 10 F plumose, with relatively few short branches. **Abdomen.** Integument hyaline, smooth except for sparse minute spicules ventrally on segments III–VIII; tergal plates of segments I–VIII not very large, about 0.25–0.30 width of segments, segments III–VII with small median accessory tergal plate. Seta 1 I palmate with simple lanceolate leaflets, 1 II–VII fully palmate, leaflets evenly pigmented with distinct shoulders and long fine filaments; 3 I (II, V, VI) single; 3 (IV, VII) double or triple, usually triple; 9 (11) long, usually triple, occasionally with 4 branches, 9 I distinctly longer than 9 II–VI; 13 (11) small, usually triple, 13 II sometimes 4 branched; 13 (11) V, VII long, about half length of segments, normally triple (rarely 4 branched on segments IV and VII); 13 (VI) with 4 (9/6) branches arising from one side of stem; 2 (II, III, VII) branched, 2 (IV–VI) single (2 VI rarely double); seta 6 (IV–VI) branched at base, double or triple, usually triple. Pecten plate with 4 (3/5) long and 6 (8/7) small spines (not evident in figure), long spines usually at each end with several interspersed among short spines, total of 11 (8/13) spines, side of spines spiculate proximally. Seta 1 S large, with 4 (8/8) branches, 2 S small, with 4 (7/4) branches. Saddle moderately pigmented, length about 0.31–0.33 mm ( $\lambda = 0.32$  mm). Seta 1  $\lambda$  single, simple, inserted on saddle, longer than saddle; 2–X 13 (19/14) branches, most basal branches long, relatively straight, with fine tapering tips, distal branches long, tapering

to minutely hooked tips (evident under high magnification); 3 X with 10 (12) long, thick, slightly curved, apically hooked branches. 4 X (ventral brush) with 9 offset pairs of setae, longest branches on anterior side of main stems, longest branches of middle setae distinctly hooked apically. Dorsal and ventral anal papillae equal in length, short, slightly shorter than half saddle length.

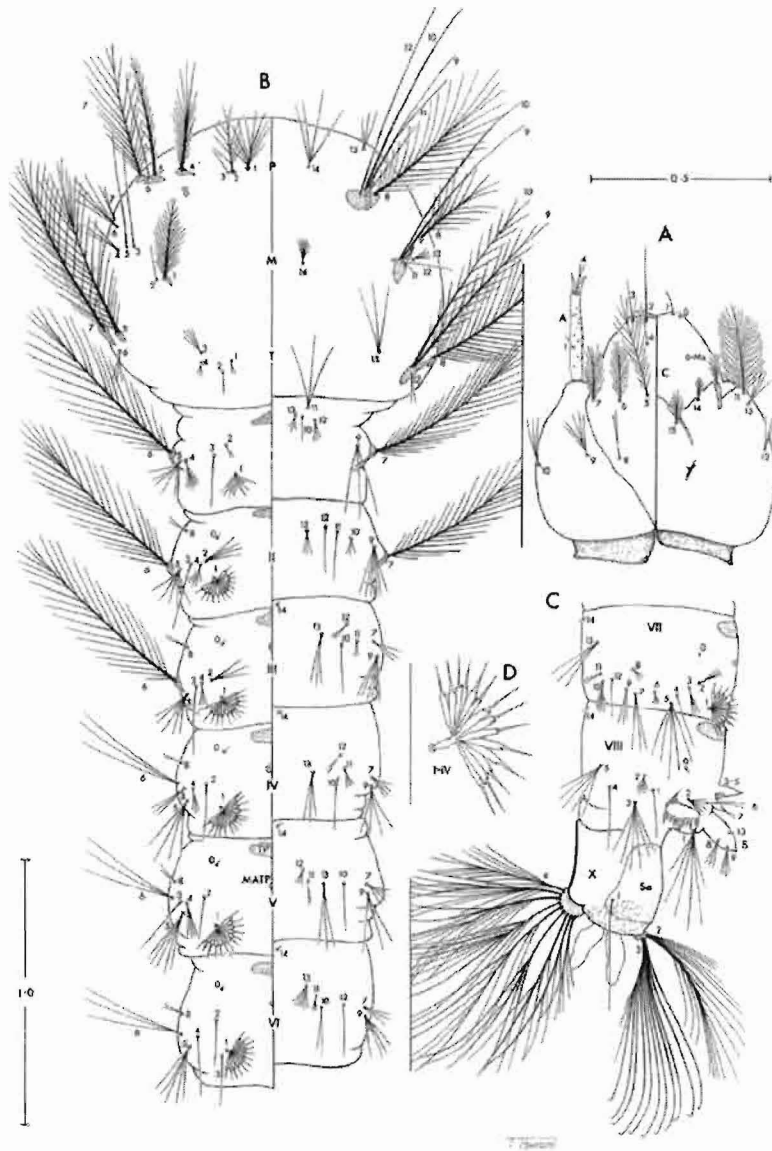
**Molecular characterization.** A total of thirty eight DNA sequences were generated from twenty seven specimens, including the mother and twelve siblings of the neotype. Partial DNA sequence data for the mitochondrial cytochrome c oxidase 1 (COI) gene and nuclear ITS 2 nuclear ribosomal gene spacer region were obtained for twenty four and thirteen samples, respectively. For the purpose of this paper and future phylogenetic studies, sequence data were analysed minus forward and reverse primer sequences. The resulting 619 bp and 42 bp amplicons, for ITS 2 and COI, respectively, can be obtained from Genbank.

The ITS 2 region was sequenced for thirteen individuals, including the mother of the neotype and eight siblings (Genbank accession numbers AF369550–AF369562). The amplicon length was consistent at 662 bp (including primers), and the thirteen ITS 2 sequences revealed a single haplotype. Fragment analysis is based on 619 bases of the PCR product, minus primer sequences. The ITS 2 haplotype comprised the following bases: 22.6% T, 21.4% A, 26.0% C and 30.0% G. A FASTA search (Pearson & Lipman, 1988) of the EMBL database revealed closest

**Table 1.** Range of numbers of branches for pupal setae of *Anopheles (Cellia) sandhensis* Mosler in populations

Setae no.	Cephalo-thorax (C/T)	Abdominal segments								Pudic P.
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
0	–	–	1	1	1	1	1	1	1	–
1	2–3(3)	1(10)	4–9(5)	2–6(4)	3–8(3)	1–2(1)	1	1	–	1
2	2–5(4)	3–7(6)	2–7(6)	4–7(5)	2–5(1)	2–5(3)	2–5(3)	2–5(3)	–	1–3(2)
3	2–3(3)	1,2(1)	1–7(1)	1–3(3)	1–7(6)	1–3(2)	1–3(1)	1–3(3)	–	–
4	1–3(3)	1–7(5)	1–5(2)	2–5(3)	1–5(3)	1–4(2)	1	1	1,2(1)	–
5	5–9(6)	2–3(2)	2–6(4)	3–7(5)	3–5(4)	3–6(4)	2,4(4)	3,4(4)	–	–
6	1–3(3)	1,2(1)	1,2(1)	2–6(3)	2–4(3)	2	1–3(2)	2,3(2)	–	–
7	2–3(2)	2–6(4)	3–7(4)	2–4(2)	1–3(2)	1–4(3)	1–3(2)	1,2(1)	–	–
8	1,2(1)	–	–	2,3(2)	2,3(2)	1–3(2)	2,3(2)	2–4(3)	–	–
9	1–3(3)	1	1	1	1	1	1	1	9–13(10)	–
10	1,2(1)	–	–	1–3(2)	1	1	1	1–3(1)	–	–
11	2–3(3)	–	–	1	1	1	1	1–3(2)	–	–
12	1–4(2)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	–	–	–	1	1	1	1	1	1	–

**Fig. 3.** Fourth-instar larva of *Anopheles (Cellia) sandhensis*. A, Head, dorsal (left) and ventral (right) aspects of left side, II, thorax and abdominal segments I–VI, dorsal (left) and ventral (right) aspects of left side; C, abdominal segments VII–X, left side; D, palmate seta I–IV showing pigmentation of leaflets, E, abdominal segments VII–VIII and X, left side. A – antenna; C – cranium; M – mesothorax; MATP – median accessory tergal plate; P – prothorax; S – spiracular lobe; Sa – saddle; T – metathorax; TP – tergal plate; I–VIII – abdominal segments I–VIII, 0–15 – scale numbers for specified areas, e.g. seta 5–C. Scales in mm.



©2001 Blackwell Science Ltd, *Systematic Entomology*, 26, 357–366

**Table 2.** Range of numbers of individuals for each stage of *Anopheles tritaeniorhynchus* collected from 1992 to 2000.

Stage	Host	Taxa																
		P	M	T	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX					
0	1																	
1	1	6-15 (10)	22-27 (26)	1-2 (2)	5-6 (6)	10-16 (12)	1-17 (13)	13-16 (15)	12-17 (15)	2-16 (14)	12-15 (12)							
2	1	5-10 (6)	12 (1)	1	1,2 (2)	5-8 (4)	2-8 (7)			1,2 (1)	2,3 (3)	1-7 (6)						
3	1			1-6 (1)				2,3 (2)			2,3 (2)							
4	1	12-21 (17)	2-8 (3)	2-8 (5)	5-8 (6)	4-8 (7)	2-10 (3)	2,3 (3)	2-8 (5)									
5	15-24 (20)	17-27 (22)		2-8 (4)	5-5 (1)	8-8 (1)	4-6 (5)	5 (1)	4-6 (5)									
6	12-28 (18)		1-8 (3)	24-36 (29)	2-3 (3)	2-3 (3)	22-31 (27)	2,3 (3)	2,3 (3)	2-15 (2)	2-15 (2)							
7	16-25 (20)		2-3 (1)	26-38 (28)	2-5 (3)	2-5 (3)	5-8 (4)	2-3 (3)	2-5 (3)	2-10 (5)	2-10 (5)							
8	1-3 (1)		24-31 (29)	14-21 (16)	30-45 (40)	2	2,2 (2)	2-3 (2)	1-9 (2)	2-3 (2)	2-5 (4)							
9	2-6 (5)		1-1 (1)	13-21 (14)	3,3 (3)	5-6 (7)	4-6 (4)	3-5 (3)	3-5 (3)	2-10 (3)	2-5 (3)							
10	2,3 (2)		1	12-20 (21)	3,3 (3)	2-1 (2)	1,2 (1)	1-3 (2)	1,2 (1)	1-3 (2)	1-6 (5)							
11	24-35 (32)		1		3,3 (3)		2-4 (3)	1-3 (2)	1-3 (2)	1-3 (2)	1,2 (1)							
12	2-5 (3)		1	1,2 (2)	1,2 (2)	1,2 (1)	1-2 (2)	2	1-3 (2)	1-3 (2)	1,2 (1)							
13	2-6 (4)		4-8 (6)	3,3 (3)	1-3 (3)	1,2 (1)	1-2 (2)	3,3 (3)	1-3 (2)	1-3 (2)	1,4 (3)							
14	5-7 (6)		5-12 (9)			3,3 (3)	1	3,3 (3)	1	1	1,4 (3)							
15	9-15 (12)																	

sequence similarity to the ribosomal ITS 2 spacer region of *An. gambae* (X67187) at 74.0%.

The 472 bp partial sequence for the mitochondrial COI gene showed slightly higher levels of intraspecific variation than the ITS 2 sequences, with four haplotypes in the twenty four individuals sequenced (Genbank accession numbers AF368117- AF368140). Sequence analysis revealed five polymorphic sites, three of which are parsimony informative, with the other two consisting of singleton polymorphic changes. Nucleotide base changes did not affect the protein coding sequence in any case. Maximum sequence divergence from the most prevalent haplotype was three bases (0.6%), with sample MA80.3 showing the highest level of polymorphism. Ranges of base composition in the COI fragment were as follows (mode in parentheses): 37.2-38.2% (38.2%) T, 27.8-28.2% (27.8%) A, 17.6-17.8% (17.8%) C and 16.1-16.3% (16.3%) G. Irrespective of haplotype, the AT richness of all the COI fragments was 66.0%, which falls within the range of previously sequenced COI genes of Culicidae, e.g. *An. quadrimaculatus* (65.4%, L04272) and *An. gambiae* (68.4%, L20934) and reflects the unique high AT content of the mitochondrial genomes of higher Diptera (Jermolov & Crozier, 1994). These low levels of intraspecific variation in both the ITS-2 and COI sequences reflect the relatively small population size in Lundu at the time of collection, perhaps as a result of limited habitats for the immature stages.

**Systematics.** Evidence that *An. sundanensis* is a complex of at least three sibling species is based on a correlation of isoenzyme data (Sukowati *et al.*, 1999) with polytene chromosome arrangements and mitotic karyotypes (Sukowati & Bainna, 1996) from natural populations in Thailand, Sumatra and Java. Species A is the most widespread species of the complex, occurring in the coastal areas of Thailand, Sumatra and Java. Species B has been found in sympatry with species A at an inland site at Purworejo in south central Java, and as an isolated population inland in South Tapanuli in northern Sumatra. Species C has only been found in one coastal locality at Asahan in northeastern Sumatra, where it is sympatric with both species A and B (Sukowati *et al.*, 1999). Whether one of the three genetic species, informally designated species A, B and C, is conspecific with the taxon formally recognized here as *An. sundanensis* is not known. This question will be resolved during a more comprehensive study of the Sundanic Complex that is currently underway at The Natural History Museum. Preliminary studies (Linton *et al.*, unpublished) have revealed that the ITS 2 and COI sequence data for the neotype series do not correspond to either species A from Trat Province in Thailand (samples provided by V. Bainna) or species B from South Tapanuli (samples provided by S. Sukowati). However, sequence data are needed for species C and chromosomes must be examined from the Lundu population before we can determine whether one of the currently recognized cytogenetic species corresponds with the neotype series.

UPGMA dendrograms based on isoenzyme analysis indicate that species C is most similar and basal to species A, with species B forming a distinct and separate cluster (Sukowati *et al.*, 1999). This may reflect the larval habitat preferences of the species, with A and C inhabiting brackish water coastal

sites and species B occurring inland, presumably in fresh water habitats. However, ecological parameters of aquatic sites are not definitely known. We plan to undertake studies to define the larval habitats of each species of the Sundavicus Complex.

A FASTA search of the Lundu *An. sundavicus* COI fragment revealed closest sequence similarity to *An. sundavicus* from Vietnam (98.3–98.9%, AF222324–6) and to other COI sequences for the Pyrethophorus Series generated in our laboratory: *An. subpictus* (97.8%, AF222327), *An. avabensis* (90.0%, AF222877), *An. gambuae* (89.9%, AF222878) and *An. bwambae* (89.9%, AF222328, AF222328). In a cladistic analysis of the Pyrethophorus Series based on anatomical data (Anthony *et al.* 1999), *An. sundavicus* was placed in a basal relationship to a clade comprising *An. subpictus*, *An. indefinitus*, *An. ludlowae* and *An. panangensis*. Using published information about the vector status of these species, the authors suggested that the ability to transmit human malarial parasites is a plesiomorphic condition that has been lost or suppressed in *An. indefinitus* and *An. panangensis*. *Anopheles subpictus* and *An. sundavicus* both comprise sibling species complexes. Members of sibling species complexes often exhibit different ecological traits, which may influence their vector capacity. Of the four genetically recognized species of the *An. subpictus* complex in India (Seguna *et al.*, 1994), only species B is known to vector human malaria. It is possible that all species of the Sundavicus Complex are vectors, but based on available distributional and epidemiological data it is only certain that species A is involved in transmission, e.g. in southern Thailand (Prasittisuk, 1985). Studies are currently underway to assess the vectorial capacity of *An. sundavicus* at the type locality (Chang Moh Seng, personal communication).

**Bionomics.** The mother of the neotype and other specimens of the neotype series were collected along the seashore. Adults were collected landing on humans or resting in animal shelters in a house or in grass. Larvae were found in small rock pools. The rock pools contained stagnant clear or coloured brackish water with or without scarce algae or submerged and emergent vegetation. Pools were situated in rocky outcrops along an otherwise sandy beach, 1–2 m above sea level, where they were exposed both to rain and sea spray. The pools were exposed to sunlight and appeared to be permanent rather than transient.

**Material examined.** Three hundred and twenty four specimens (26 used for DNA extraction): 34 ♂, 5 ♀ genitalia (Gen), 65 ♂, 67 larval exuviae (Le), 26 fourth-instar larvae (L), 10 ♀ pupal exuviae (Pe) and 22 pupae (P), including 103 individual rearings from two progeny broods and 13 larval collections. A specimen number followed by +DNA or a life stage with -DNA in brackets, e.g. [P-DNA], indicates that the specimen or life stage was used for DNA extraction. **Neotype.** ♀ (MA102-34), with LePe on microscope slide, offspring of ♂ (MA96 1-DNA) collected MALAYSIA: Sarawak, Lundu, Pandan Beach, biting/landing on human, 8 xi 99 (Linton *et al.*) (SBC). **Paraneotypes** (same locality and collectors as neotype), MA70 1 LePe, 2 ♀ LePe, 3 ♀ LePe, 3 L, 6 ♂ LePe, 5 xi 99, rock pool; MA71 1 LePe [+DNA], 2 ♀ LePe, 3 ♀ LePe, 4 Le [P-DNA], 5 Pe [-DNA], 6 ♀ Pe, 8 ♂ LePe, 9 ♀ LePe, 10 ♀ LePe, 11 Le [P-DNA], 12 ♀ LePe, 13

♂ LePe, 14 ♀ LePe, 5 xi 99, rock pool; MA72 2 LePe [+DNA], 5 xi 99, rock pool; MA73 3 LePe, 4 Le [P-DNA], 5a L, 5b L, 6 Le [P-DNA], 7 [P-DNA], 8 LePe, 5 xi 99, rock pool; MA79 1 ♀ LePe, 21, 6 xi 99, rock pool; MA80 2 [P-DNA], 3 [P-DNA], 41, 5 [+DNA], 6 ♀ LePe, 7 ♀ LePe, 8 ♀ LePe, 9 ♀ LePe, 10 ♀ LePe, 11 Le [P-DNA], 6 xi 99, rock pool; MA81 1 ♀, 3 ♀ LePe, 4 Pe, 5 ♀ LePe, 6 L, 7 Pe, 8 ♀ Pe, 9 ♀ Pe, 10 ♀ Pe, 11 ♀ Pe, 6 xi 99, rock pool; MA82 1 Le, 2 L, 4 L, 5 L, 6 L, 6 xi 99, rock pool; MA83 1 [+DNA], 6 xi 99, resting in house; MA84 1 [+DNA], 6 xi 99, resting in grass; MA85 1 [+DNA], 6 xi 99, resting in animal shelter; MA90 2 ♀ Pe, 3 ♀ Le, 4 [L-DNA], 5 LePe, 6 LePe [+DNA], 8 xi 99, rock pool; MA91 1 ♀ LePe, 2 ♀ Pe, 4 Pe, 5 Pe, 8 xi 99, rock pool; MA92-3 ♀ LePe, 4 LePe, 5 ♀, 6 Pe, 7 LePe, 8 xi 99, rock pool; MA93 1 ♀ Le, 3 ♀ LePe, 4 Le, 5 LePe, 8 xi 99, rock pool; MA94 1 Le, 2 Pe [+DNA], 3a L, 3b [P-DNA], 4 L, 5 ♀ LePe, 8 LePe, 9 LePe, 10 LePe, 8 xi 99, rock pool; MA96 1 [+DNA], 21 [+DNA], 8 xi 99, biting/landing on human; MA102 (progeny of MA96 1) 1 ♀ LePe, 2 Le [P-DNA], 3 LePe [+DNA], 4 [P-DNA], 5 [P-DNA], 6 [P-DNA], 7 [L-DNA], 8 Pe [-DNA], 9 [+DNA], 11 [L-DNA], 12 [L-DNA], 13 [P-DNA], 14 [P-DNA], 15 [P-DNA], 17 [P-DNA], 18 ♀ Pe, 19 ♀ Pe, 20 ♀ Pe, 21 ♀ Pe (Gen), 22 ♀ Pe (Gen), 23 ♀ Pe, 24 ♀ Pe (Gen), 25 ♀ Pe, 26 ♀ Pe (Gen), 27 ♀ Pe, 29 ♀ Pe, 30 ♀ Pe, 31 ♀ Pe (Gen), 32 ♀ LePe, 33 ♀ Pe, 34 ♀ LePe, 35 ♀ LePe, 36 ♀ LePe, 37 ♀ LePe, 38 ♀ LePe, 39 LePe [+DNA], 40 Le, 41 LePe [+DNA], 42 [L-DNA], 43 [L-DNA], 44 Le, 45 ♀ LePe, 46 ♀ LePe, 47 ♀ LePe, 48 LePe [+DNA], 49 LePe, 50 Pe [+DNA], 51 LePe [+DNA], 52 Pe [+DNA], 53 Le; MA103 (progeny of MA96 2) 1a [L-DNA], 1b [L-DNA], 1c [L-DNA], 1d [L-DNA], 1e [L-DNA], 1f [L-DNA], 2 [P-DNA], 3 [P-DNA], 4 [P-DNA], 5 ♀ Pe, 6 [L-DNA], 7 ♀ Pe, 8 [P-DNA], 9 ♀ Pe, 10 [P-DNA], 11 LePe [+DNA], 12 ♀ Pe, 13 ♀ Pe, 14 ♀ Pe, 15 ♀ Pe, 16 ♀ Pe, 17 ♀ Pe, 18 ♀ Pe, 19 ♀ Pe, 20 ♀ Pe, 21 ♀ Pe, 22 ♀ Pe, 23 ♀ Pe, 24 ♀ LePe, 25 ♀ Pe, 26 ♀ Pe, 27 ♀ Pe, 32 x LePe.

The neotype (MA102-34) and the following specimens are deposited in the SBC: MA-0 2, 3; MA71 2, 3, 6, 8, 9, 10, 13; MA72-2; MA73-4, 5a, 5b; MA80-6, 8, 9, 11; MA81 1, 3, 4, 6, 10, 11; MA82 1, 5; MA90 3, 5; MA91 2, 4; MA92 4, 5, 6; MA93-3, 4; MA94-1, 9, 10; MA102-2, 8, 9, 19, 20, 25, 27, 29, 33, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 48, 50, 53; MA103 7, 11, 13, 14, 16, 18, 20, 22, 26, 27. All remaining specimens, including DNA samples, are deposited in the BMNH.

#### Acknowledgements

We are grateful to Mr Chua Teck Kheng and the staff at the Sarawak Biodiversity Centre, Jalan Borneo Heights, Semengoh, 93990 Kuching, Sarawak, Malaysia, and Puan Munniah of the Economic Planning Unit, Kuala Lumpur, Malaysia, for their support and approval of this project (Contract SBC/RP/003/91), to The Natural History

Museum (NHM), London for funding the field work; to Theresa Howard (NPM) for preparing the illustrations; to Lisa Smith (NHM) for assisting in DNA sequence generation; to the staff of the Sarawak Health Department for help in the field; and to Bruce A. Harrison (North Carolina Department of Environment and Natural Resources, Public Health Pest Management Section, Winston Salem, North Carolina, U.S.A.), Sylvie Maunim (Centre de Biologie et de Gestion des Populations, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France) and John F. Reinert (Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Services, Gainesville, Florida, U.S.A.) for critically reviewing the manuscript. This work was carried out as part of the European Commission INCO-DC research project ERBC18C19-0211, as a basis for resolving the identity of *An. stimulans sensu lato* in southern Vietnam.

## References

- Anthony, T.G., Harbach, R.E. & Kitching, J.J. (1999) Phylogeny of the Lytrotomyia Series of *Anopheles* ssp. *Cyrtia* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, **24**, 193–205.
- Bonnie-Wepster, J. & Swollegrenbel, N.H. (1953) *The Anopheline Mosquitoes of the Indo-Australian Region*. J. H. de Bussy, Amsterdam.
- Clary, D.O. & Wolstenholme, D.R. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila melanogaster*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 252–271.
- Collins, F.H. & Beckwith, S.M. (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among *Anopheles* cryptic species. *Insect Molecular Biology*, **5**, 1–9.
- Harbach, R.E. (1991) Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bulletin of Entomological Research*, **84**, 331–342.
- Harbach, R.E. & Knight, K.L. (1980) *Taxonomist's Glossary of Mosquito Anatomy*. Texas Publishing, Marlton, New Jersey.
- Harbach, R.E. & Knight, K.L. (1982) Corrections and additions to *Taxonomist's Glossary of Mosquito Anatomy*. *Mosquito Systematics* (1981), **13**, 201–217.
- Jenour, L.S. & Crozier, R.H. (1991) The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Leptoponera autingeri*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with taxonomic content. *Journal of Molecular Evolution*, **38**, 282–294.
- Knight, K.L. & Stone, A. (1977) A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae) 2nd edn. *The Thomas Say Foundation*, **6**, ix + 1–611.
- Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1986) Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **85**, 2444–2448.
- Prasitthak, C. (1985) Malaya vectors in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **16**, 141–145.
- Rees, J.A. (1968) Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo. *Studies from the Institute of Medical Research Malaya*, **31**, xiii + 1–520.
- Rodewald, E. (1925) Entomologische notizen. III. *Gene-Studie Indisch-Ost-Indische-Indien*, **65**, 173–201 + 1 pl.
- Segara, S.G., Ratumanan, K.G., Rajavel, A.R. & Dharsana, V. (1994) Morphological and chromosomal descriptions of new species in the *Anopheles subpictus* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, **8**, 88–94.
- Simon, C., Fratt, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651–701.
- Sakowati, S. & Baimai, V. (1996) A standard cytogenetic map for *Anopheles sundanai* (Diptera: Culicidae) and evidence for chromosomal differentiation in populations from Thailand and Indonesia. *Genome*, **39**, 165–173.
- Sakowati, S., Baimai, V., Harun, S., Dawaki, Y., Ariyanti, H. & Utirawan, M. (1999) Isozyme evidence for three sibling species in the *Anopheles sundanai* complex from Indonesia. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 405–414.

Accepted 20 July 2000

---

## ANNEXE 2: *ANOPHELES EPIROTICUS* SP.N.

Linton Y.-M., Dufour I. et al. *Anopheles (Cellia) epiroticus*, a new malaria vector species in the Southeast Asian Sundaicus Complex . Accepted in *Bull Entomol Res*

### INTRODUCTION

*Anopheles (Cellia) sundaicus* (Rodewaldt) is an important vector of malaria on islands and coastal areas of Southeast Asia (Reid, 1968; Kalra, 1978; Brandling-Bennett *et al.*, 1981; Prasittisuk, 1985; Kirnowardoya & Yoga, 1987; Nguyen Tang Am *et al.*, 1993, Chang Moh Seng *et al.*, 2001; Fryauff *et al.*, 2002; Barcus *et al.*, 2002). It is widely distributed from northeastern India through Myanmar, Thailand, Cambodia, Malaysia, southern Vietnam, and southward through the Nicobar and Andaman Islands, and on the islands of Java, Sumatra, Borneo and Sulawesi (Reid, 1968).

The larvae of *A. sundaicus* are typically associated with coastal brackish water (Chow, 1970; Brandling-Bennett *et al.*, 1993; Kumari *et al.*, 1993, Nguyen Tang Am *et al.*, 1993; Kumari & Sharma, 1994, Chang Moh Seng *et al.*, 2001; Linton *et al.*, 2001; Dufour *et al.*, 2004a,b), but they also have been found breeding inland, presumably in fresh water, in Sarawak, Malaysia (Linton *et al.*, 2001; Chang Moh Seng *et al.*, 2001; Dufour *et al.*, 2004a), Sumatra, Indonesia (Sukowati & Baimai, 1996; Sukowati *et al.*, 1999) and Car Nicobar Island (Das *et al.*, 1997). Accounts of host preference and biting behaviour also vary. Adult females are reportedly strongly anthropophilic and exophagic in Java (Chow, 1970), Sarawak (Linton *et al.*, 2001) and Vietnam (Nguyen Tang Am *et al.*, 1993). Linton *et al.* also found females biting humans indoors. In contrast, females were found to be zoophilic, exophagic and exophilic on Car Nicobar Island (Kumari & Sharma, 1994). A wide distribution and differences in host preference and larval habitats indicated that *A. sundaicus* could be a species complex. That *A. sundaicus* does indeed comprise a number of sibling species was first supported by the discovery of three cytological forms (designated A, B and C) from populations in Thailand, Sumatra and Java (Baimai *et al.*, 1996; Sukowati & Baimai, 1996). Additional evidence of isoenzyme differentiation indicated that populations of the three cytotypes in sympatry on Sumatra and Java are reproductively isolated (Sukowati *et al.*, 1999). According to the findings of Baimai *et al.* (1996), Sukowati & Baimai (1996) and Sukowati *et al.* (1999), form A is the most widespread cytotype, occurring in the coastal areas of Thailand, Sumatra and Java. Form B was found in sympatry with species A at inland sites at Purworejo, Java and at South Tapanuli, Sumatra. Species C was only found in a coastal locality at Asahan in northeastern Sumatra where it is sympatric with both species A and B (Sukowati *et al.*, 1999). More recently, another form, designated cytotype D, was described from Car Nicobar Island, India (Nanda *et al.*, 2004).

*Anopheles sundaicus* was originally described from specimens collected on the Lesser Sunda Islands, including Java, Sumatra and Borneo (Rodewaldt, 1925, as *Myzomyia ludlowi* var. *sundaica*). As no original type specimens exist (Bonne-Wepster & Swellengrebel, 1953; Reid, 1968; Knight & Stone, 1977), and given the biomedical importance of this taxon, a neotype was recently designated from the Lundu District of Sarawak (Linton *et al.*, 2001) to fix the identity of the species. The species was described and sequences of the cytochrome oxidase I (COI) gene of mitochondrial DNA and second internal transcribed spacer (ITS2) of nuclear DNA were provided as a foundation for further integrated systematics studies on the *A. sundaicus* complex (Linton *et al.*, 2001).

When sequences for portions of the COI and cytochrome b (Cyt b) genes of mtDNA from topotypic specimens of this taxon from Sarawak were compared to those from Thailand and Vietnam, it was clear that *A. sundaicus* comprised at least two genetic species (Dusfour *et al.*, 2004b). Additional COI and Cyt b sequences, and novel sequences for the nuclear ITS2 region, for specimens from Cambodia, peninsular Malaysia, Thailand and Vietnam provided further evidence for the existence of these two species: *A. sundaicus s.s.* on Borneo and *A. sundaicus* species A on the continent (Linton *et al.*, 2001, Dusfour *et al.*, unpublished). In this paper, species A is formally named *A. epiroticus* sp. n. Linton & Harbach and molecular and morphological data are used to characterize and distinguish it from *A. sundaicus s.s.*

## MATERIALS AND METHODS

**Mosquito specimens.** Specimens were identified as *A. sundaicus* using the morphological keys of Reid (1968) and the keys for identification of Vietnamese *Anopheles* (IMPE, 1987). Specimens were collected from 14 localities in five Southeast Asian countries: Cambodia (1 site), Malaysia (1 site in peninsular Malaysia and 2 in Sarawak, Borneo), Thailand (3 sites) and Vietnam (7 sites) (Table 1). Samples from Lundu Province in Sarawak (MAL) were collected in association with the neotype series of *A. sundaicus*, and include siblings of the neotype and paraneotypes (Linton *et al.*, 2001).

**Molecular methods.** DNA was extracted from specimens, which were either preserved in 95% ethanol or dried over silica gel in the field, following the method listed in Linton *et al.* (2001). The ITS2 was amplified using the 5.8SF and 28SR primers of Collins & Paskewitz (1996) and the reaction and thermocycler parameters described by Linton *et al.* (2001b). Mitochondrial COI and Cyt b fragments were amplified using the primers and conditions listed in Dusfour *et al.* (2004b). The PCR products were cleaned using a commercially available PCR purification kit (QIAGEN Ltd, Sussex, England) and sequencing reactions were carried out in both directions using the Big Dye Terminator Kit (PE Applied Biosystems, Warrington, England). Sequences were edited and aligned using Sequencher™ version 3.1.1 (Genes Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan) or BioEdit (Hall, 1999), and CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Amino acid conversion of the mtDNA nucleotide fragments and calculations of inter- and intraspecific sequence variability in both data sets were carried out using MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001).

The 267 sequences generated in this study are available in GenBank under the following accession numbers: *A. epiroticus* – 82 ITS2 (AF469855-96, AY662406-19, AY662434-46, AY789167-178), 50 COI (AF222324-6, AY789179-189, AY789201-202, AY299105-120, AY245283-284, AY672345-350, AY672355-360, AY672365-368) and 44 Cyt B (AY253150-155, AY256954-955, AY243788-795, AY672286-313); *A. sundaicus* – 29 ITS2 (AF369550-62, AY662242-59), 49 COI (AY299339-40, AY299342-46, AY662242-43, AY789709-26, AF368116-40) and 13 Cyt B (AY243796-99, AY256956-57, AY299095-96, AY299098-99, AY299101, AY299103-04).

**Morphological methods.** Wild-caught larvae and the progeny of wild-caught adults were individually reared to provide adults with associated larval and pupal exuviae. Observations of adults were made under simulated natural light. Larval and pupal chaetotaxy were studied using bright field and differential interference contrast microscopy. Measurements and counts were made from at least ten specimens. Unless indicated otherwise, numbers in parentheses represent modes of the reported ranges. The morphological terminology follows Harbach & Knight (1980, 1982).

## RESULTS

**Molecular differentiation of *An. epiroticus* sp. n. and *An. sundaicus*.** Two hundred and sixty-seven DNA sequences were generated from specimens identified as *A. sundaicus* from Cambodia, peninsular Malaysia, Thailand and Vietnam and Malaysian Borneo, which includes the type locality of *A. sundaicus* s.s. (Linton *et al.*, 2001). Sequences included partial COI (n=99) and Cyt b (n=57) genes, and the nuclear ITS2 region (n=111) (Table 1). Two distinct groups of sequences were obtained using all gene regions, one corresponding to *A. sundaicus* s.s. from Lundu and Miri in Sarawak, Malaysia and the other corresponding to *A. epiroticus* from Cambodia, Thailand, peninsular Malaysia and Vietnam (Table 1).

The ITS2 region was sequenced for 82 specimens of *A. epiroticus* from Vietnam (n = 63) and Thailand (n = 19) and compared to 29 sequences of *A. sundaicus* from Sarawak (Fig. 1). The ITS2 amplicons (inclusive of primers) were one base longer in *A. epiroticus* (663 bp) than in *A. sundaicus* (662 bp) and differed by three fixed variable sites (0.45%), a T↔C transition at base 479, a G↔T transversion at base 538 and an indel event at base 603 (Fig. 1). Although no intraspecific differences were noted among the ITS2 fragments directly sequenced from PCR products (NHM) in this study, a parallel study on cloned ITS2 fragments revealed low levels of intragenomic variation in members of the Sundaicus Complex (Dusfour *et al.*, unpublished). This data suggests caution should be used when using the ITS2 genotypes alone to assign species identity in this closely related complex.

A 445-bp fragment of COI, directly comparable to bases 1724–2169 of the mitochondrial genome of *Anopheles gambiae* (Beard *et al.*, 1993), was amplified. Thirty-eight variable bases were detected in the 445-bp alignment of *A. epiroticus* and *A. sundaicus* (Fig. 2). Mean pairwise-distance values were 1.2% and 0.6% within *A. epiroticus* (n=50) and *A. sundaicus* (n=49), respectively, with a mean interspecific sequence divergence of 2.1% between the sister species. Upon translation to amino acid sequences, the protein COI sequences of both species were identical and no intra-specific protein differences were noted. The most common haplotypes within the 445-bp fragment of *A. sundaicus* (SUNCOI-1(16)) and *A. epiroticus* (EPCOI-1(11)) varied from *A. gambiae* (AF252878) by 9.9 and 11.7%, respectively. A consistent species-specific point mutation (A↔G) distinguishing the COI sequences of the two species was detected at position 294 (Fig. 2).

COI sequences were generated for 50 specimens of *A. epiroticus* from Cambodia (n = 2), peninsular Malaysia (n = 4), Thailand (n = 20) and Vietnam (n = 24). Thirty-four intraspecific variable sites (7.6%) were detected in the 50 sequences, 23 of which (67.6%) were parsimony informative. Of the variable sites, four were in the first position of the codon (all C↔T transitions), and the remaining polymorphisms were all at the third codon position. All nucleotide base substitutions were silent. Twenty-nine unique COI haplotypes were noted in the 50 sequences of *A. epiroticus*. Seven of these were shared as follow: EPCOI-1 (n=11) (7VHCM, 3BL, 1 VST), EPCOI-2 (n=4) (3 VHCM, 1 VBL), EPCOI-3 (n = 3) (1 TTR, 1 TPG, 1MAT), EPCOI-4 (n = 3) (3 TTR), EPCOI-5 (n=2) (1 MAT, 1 TPG), EPCOI-6 (n = 2) (2 VBL), EPCOI-7 (n = 2) (1 TTR, 1 TPG) and EPCOI-8 (1 VCG, 1 VHCM). All 22 other haplotypes are unique. These are listed by their specimen codes in Fig. 2. Shared maternally inherited mtDNA haplotypes across wide geographical distances indicate that this species is well established and gene flow is not restricted between populations in Thailand, Vietnam and peninsular Malaysia. Haplotypes obtained from Cambodian specimens were unique. The 49 *A. sundaicus* COI sequences comprised 10 unique haplotypes, 5 of which were shared as follow: SUNCOI-1 (n=16) (16 MAM), SUNCOI-2 (n=13) (13 MAL), SUNCOI-3 (n=8) (8 MAL), SUNCOI-4 (n=3) (3 MAL) and SUNCOI-5 (n=2) (2 MAM). The remaining five haplotypes are represented by single sequences (Fig. 2).

The Cyt b sequences were generated for 44 *A. epiroticus* from Cambodia (5), peninsular Malaysia (6), Thailand (19) and Vietnam (14) and compared to 13 *A. sundaicus* specimens from Sarawak (Table 1; Fig. 3). Twenty-four variable bases were detected in the alignment of *A. epiroticus* and *A. sundaicus* (Fig. 3) and mean interspecific variability was 2.1%. Five species-specific C↔T transitions were identified at positions 12, 267, 297, 469 and 474 (Fig. 3). Sixteen variable intraspecific sites (3.3%) were detected in the 44 *A. epiroticus* sequences, seven of which (43.7%) were parsimony informative. Seven haplotypes were shared in *A. epiroticus*: EPCB-1(12) (6 VHCM, 5 VBL, 1 TTR); EPCB-2(4) (4 TTR) and EPCB-3(4) (4 TTP); EPCB-4(3) (2 CKK, 1 MAT); EPCB-5(2) (1 CKK, 1 TPG); EPCB-6(2) (1 TTR, 1 MAT); EPCB-7(2) (1 TPG, 1 MAT). All other sequences were unique and are represented by their unique codes (Fig. 3). Four Cyt b haplotypes were detected in the 13 *A. sundaicus* sequences, as follow: SUNCB-1 (n=6) (4 MAL, 2 MAM), SUNCB-2 (n=4) (4 MAM), SUNCB-3 (n=2) (2MAM) and a unique haplotype, represented by its specimen code SUNCB6MAL (Fig. 3). Mean nucleotide diversity in the 44 *A. epiroticus* was 0.6% compared to 0.2% in 13 *A. sundaicus*. Upon translation to amino acid sequences, the protein Cyt-b sequences of the two species were identical. Shared Cyt-b haplotypes confirm gene flow throughout the distribution of *A. epiroticus*. The most common haplotypes of *A. sundaicus* (SUNCB-1(6)) and *A. epiroticus* (EPCB-1(12)) varied from *A. gambiae* (AF252878) by 9.9 and 10.2%, respectively.

Mean sequence divergence between *A. sundaicus* and *A. epiroticus* was 2.1% in both COI and Cyt b regions of the mitochondrial genes, and 0.45% in the nuclear ITS2. These levels of variability correspond to interspecific differences and the molecular data shown above confirm the separate species status of *A. epiroticus* and *A. sundaicus*.

Siblings and associated wild-caught material identified molecularly as *A. epiroticus* and the neotype series of *A. sundaicus* were used in the comparative morphological study and formal description below.

*Anopheles (Cellia) epiroticus* Linton & Harbach, sp. n.

*Anopheles sundaicus*: all previous records and taxonomic treatments of *An. sundaicus* in Cambodia, peninsular Malaysia, Thailand and Vietnam apply to *An. epiroticus*.

*Anopheles sundaicus* form A: Sukowati & Baimai (1996) (chromosomes); Sukowati *et al.* (1999) (isoenzymes).

*Anopheles sundaicus* species A: Dusfour *et al.* (2004a) (mtDNA); Dusfour *et al.* (2004b) (bionomics, systematics).

Detailed comparative morphological studies of the adult, larval and pupal stages did not reveal any differential or diagnostic differences that distinguish *A. epiroticus* from *A. sundaicus*. It was not possible to compare the egg morphology of the two species. The male genitalia and pupa of *A. epiroticus* are illustrated in Fig. 4, and the fourth-instar larva in Fig. 5. The larval and pupal chaetotaxy of *A. epiroticus* are compared to that of *A. sundaicus* in Tables 2 and 3. In comparison with *A. sundaicus*, the leaflets of palmate setae I-II-VII in *A. epiroticus* are generally broader with more strongly toothed shoulders (Fig. 5D) (cf. Fig. 3D of Linton *et al.*, 2001).

*Anopheles epiroticus* is easily distinguished from *A. sundaicus* by differences in their mitochondrial COI or Cyt b sequences, with mean intraspecific sequence divergences of 2.1%. These markers have diagnostic loci for the identification of these two species. Species-diagnostic COI and Cyt b sequences are available in GenBank under the accession numbers listed above.

ITS2 sequences show a lower level of intraspecific variation (0.45%) than the COI and Cyt b sequences, but their diagnostic bases, including an indel at base 603, allow species separation. A PCR-based SCAR assay based on ITS2 sequences is available that differentiates *A. epiroticus* from *A. sundaicus* (Dusfour *et al.*, 2004b), but this may need to be revised when other members of the complex are investigated more fully.

**Bionomics.** Larvae of *A. epiroticus* were found in large open stagnant brackish water, sunlit pools that appeared to be permanent rather than transient. Most of the pools were associated with fish and shrimp farming in coastal areas. The recent increase in land use for shrimp farming in southern Vietnam is believed to be the cause of an increase in population densities of *A. epiroticus* in that region (Trung *et al.*, 2004, as *A. sundaicus*). This reliance on brackish water must restrict the range of *A. epiroticus* to coastal areas. The well-defined breeding sites of *A. epiroticus* are in contrast to those of *A. sundaicus*, which appears to breed in a wide range of habitat types. *Anopheles sundaicus* larvae were collected from small brackish water coastal rock pools at the neotype locality of Pandan Beach in Lundu District (Linton *et al.*, 2001) and from a large, apparently freshwater pond at an inland site at Simpang Jawa in Miri District of Sarawak (Chang Moh Seng *et al.*, 2001).

Blood-fed females that gave rise to the progeny broods that comprise the type series of *A. epiroticus* from southern Vietnam were collected resting inside human habitation. Both *A. epiroticus* and *A. sundaicus* are implicated in malaria transmission. *Anopheles sundaicus* appears to vector malaria in both in Lundu and Miri in Sarawak (Sarawak Health Records from 1957; Chang Moh Seng *et al.*, 2001). *Anopheles epiroticus* (as *A. sundaicus*) is an efficient vector in coastal areas of Thailand (Prasittisuk, 1985) and Vietnam (Nguyen Tang Am *et al.*, 1993; Phan, 1998). However, a recent extensive survey of 11,002 specimens in southern Vietnam revealed no *Plasmodium*-positive specimens (Trung *et al.*, 2004). *Anopheles epiroticus* (as *A. sundaicus*) is also considered a secondary vector in Cambodia, Myanmar and Thailand (Meek, 1995). Interest in this vector in Thailand increased due to its presence near coastal tourist areas (Chowanadisai *et al.*, 1989). The vector capacity of each sibling species in the *A. sundaicus* complex needs to be more specifically determined.

**Systematics.** In a cladistic analysis of the Pyretophorus Series based on morphological data (Anthony *et al.*, 1999), *A. sundaicus* s.l. was placed in a basal relationship to a clade comprising *A. subpictus* Grassi, *A. indefinitus* (Ludlow), *A. ludlowae* (Theobald) and *A. parangensis* (Ludlow). This topology is supported by mitochondrial COI sequence data (Linton *et al.*, unpublished), which indicates that *A. epiroticus* is ancestral to *A. sundaicus*, suggesting that speciation occurred when the islands split from mainland Southeast Asia. Based on calculations of the mitochondrial molecular clock using Brower's (1994) estimation of 2.3% divergence per million years, Dusfour *et al.* (2004b) estimated the time of speciation between *A. epiroticus* (as *A. sundaicus* species A) and *A. sundaicus* to be approximately 0.9 million years ago.

**Etymology.** In old Greek, the adjective 'epiroticus' was used to describe people originating from the northwestern district of Epiros in mainland Greece. However, in modern Greek, the name has become synonymous with 'from the mainland', and thus the new member of the *A. sundaicus* complex is named *A. epiroticus* to reflect its primary distribution in Southeast Asia.

**Type series.** The series consists of 700 specimens from 19 progeny broods: 36 males (♂), 5 male genitalia (Gen), 72 females (♀), 282 larval exuviae (Le), 282 pupal exuviae (Pe) and 23 fourth-instar larvae (L). *Holotype*, ♀LePe (DP30-10), offspring of female collected VIETNAM: *Bac Liêu Province*, Gia Rai District, An Trach Commune, Village Văn Đuốc A, 23 Oct 98, collected resting in house in morning (IMPE). The holotype bears the following labels: "DP30-10" // "Holo- / type" // "Back Lieu / Gia Rai / An Tach / Van Duc A / Ditch" // "23.x.1998" // "IMPE". *Paratypes*, all progeny of females collected at same locality as holotype: 10LePe (DP15-1 through -10); 11LePe (DP16-1 through -10 and -26); 10LePe (DP17-16 through -25); 9LePe (DP18-1 through -6 and -8, -9, -10); 10LePe (DP19-1 through -10); 10LePe (DP20-1 through -10); 10LePe

(DP22-1 through -10); 14LePe (DP23-1 through -10 and -17 through -20); 10LePe (DP24-1 through -10); 10 LePe (DP25-1 through -10), 5L (DP25); 10LePe (DP26-1 through -10), 5L (DP26); 5♀LePe (DP28-1 through -5), 5♂LePe (DP28-6 through -10), 22LePe (DP28-11 through -30 [associated adults preserved in Beem® capsules]); 5♂LePe (DP29-1 through -5), 23LePe (DP29-15 through -38 [associated adults preserved in Beem® capsules]), 20♀LePe (DP29-6 through -25); 6♂LePe (DP30-1 through -5 and -8), 8♀LePe (DP30-7 and -9 through -15), 1LePe (DP30-6 [adult lost]), 15LePe (DP30-16 through -30 [associated adults preserved in Beem® capsules]); 5♂LePe (DP31-1 through -5), 10♀LePe (DP31-6 through -15); 5♂LePe (DP32-1 through -5), 5♀LePe (DP32-6 through -10); 5♂LePe (DP33-1, -3, -4), 2♂LePe(Gen) (DP33-2, -5), 9♀LePe (DP33-6 and -8 through -15), 1LePe (DP33-7 [adult lost]), 5L (DP33); 3♂LePe (DP34-1, -4, -5), 2♂LePe(Gen) (DP34-2, -3), 10♀LePe (DP34-6 through -15), 3L (DP34); 4♂LePe (DP35-1, -2, -4, -5), 1♂LePe(Gen) (DP35-3), 10♀LePe (DP35-1 through -15), 5L (DP35). Thirty-two larvae from progeny broods DP25 (5L), DP26 (7L), DP33 (9L), DP34 (5L) and DP35 (6L) were used for DNA extraction and sequencing (GenBank accession numbers AF469865–AF469896). Many adults from the progeny broods are preserved in Beem® capsules and their associated larval and pupal exuviae are preserved in ethanol for future study. The holotype and most paratypes are deposited in the Natural History Museum (BMNH), London. The following paratypes are deposited in the National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology (NIMPE), Hanoi: DP15-1, -2, -3, -6, -7; DP16-1, -2, -3, -6, -7; DP17-16 through -10; DP18-1, -2, -3, -9, -10; DP19-1, -2, -3, -6, -7; DP20-1, -2, -3, -6, -7; DP22-1, -2, -3, -6, -7; DP23-1, -2, -3, -6, -7, -17, -18; DP24-1, -2, -3, -6, -7; DP25-1, -2, -6, -7; DP26-1, -2, -3, -6, -7; DP28-4 through -8; DP2-4 through -15; DP30-4, -5, -8, -9, -11, -13, -15; DP31-2, -4, -6, -7, -8, -14, -15; DP32-2, -3, -4, -7, -9; DP33-3, -4, -6, -9, -12 through -15; DP34-4, -5, -7, -10, -11, -12; DP35-4, -5, -6, -12 through -15.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Trung Ho Dinh, Dr Lê Xuân Hói and other staff members of the National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology, Hanoi, for collecting and rearing the progeny broods of *A. epiroticus* from Bac Liêu Province. They are also grateful to Dr Tho Sochantha (National Centre for Malaria Control, Parasitology and Entomology, Phnom Penh, Cambodia), Prof. Visut Baimai (Mahidol University, Bangkok, Thailand) and Dr Indra Vythilingam (Institute for Medical Research, Kuala Lumpur, Malaysia) for providing specimens from mainland Southeast Asia for comparative study. Specimens from Vietnam and Cambodia were collected as part of the European Commission INCO-DC research project ERBIC18CT970211. Thanks also are due to Joanna Elphick, formerly of the Natural History Museum (NHM), London, for her technical assistance in the early stages of this study. The NHM funded the collections of *A. sundaicus* in Sarawak in 1999. These collections, which resulted in the neotype description of the nominotypical member of the complex, would not have been possible without the help of the following people: Dr Tom Anthony (London School of Hygiene and Tropical Medicine, London), Dr Chang Moh Seng (WHO representative, Phnom Penh, Cambodia), Mr Asmad Matusop (Sarawak State Health Department, Kuching, Sarawak) and the staff of the Sarawak Biodiversity Centre, Kuching (contract number SBC-RP-0003-YL to YML).

## References

- Anthony, T.G., Harbach, R.E. & Kitching, I.J. (1999) Phylogeny of the Pyrethophorus Series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology* 24, 193–205.
- Baimai, V., Kijchalao, U. & Rattarithikul, R. (1996) Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: V. The Myzomyia Series, subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 12, 97–105.
- Barcus, M.J., Laihad, F., Sururi, M., Sismadi, P., Marwoto, H., Bangs, M.J. & Baird, J.K. (2002) Epidemic malaria in the Menoreh Hills of central Java. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66, 287–292.
- Beard, C.B., Hamm, D.M. & Collins, F.H. (1993) The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of the other insects. *Insect Molecular Biology* 2, 103–124.
- Brandling-Bennett, A.D., Doberstyn, E.B. & Pinichpongse, S. (1981) Current epidemiological of malaria in Southeast Asia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 12, 289–297.
- Bonne-Wepster, J. & Swellengrebel, N.H. (1953) The Anopheline Mosquitoes of the Indo-Australian Region. J.H. de Bussy, Amsterdam.
- Chang Moh Seng, Linton, Y.-M. & Harbach, R.E. (2001) The *Anopheles sundaicus* species complex – a preliminary study of larval ecology from two sites in Sarawak, Malaysia. *Mekong Malaria Forum* 8, 91–95.
- Chowanadisai, L., Krairiksh, S. & Thanasripukdikul, S. (1989) Microbial control of *Anopheles sundaicus*, a malaria vector in Thailand, by *Bacillus sphaericus* 2362. *Mosquito Borne Disease Bulletin*, 6, 39–44.
- Chow, C.Y. (1970) Bionomics of malaria vectors in the western pacific region. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1, 40–57.
- Clary, D.O. & Wolstenholme, D.R. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organisation and genetic code. *Journal of Molecular Evolution* 22, 252–271.
- Collins, F.H. & Paskewitz, S.M. (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among *Anopheles* cryptic species. *Insect Molecular Biology* 5, 1–9.
- Das, M.K., Adak, T. & Sharma, V.P. (1997) Genetic analysis of a larval colour mutant, yellow larva, in *Anopheles sundaicus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 13, 203–204.

- Dusfour, I., Harbach, R.E. & Manguin, S. (2004a) Bionomics and systematics of the Oriental *Anopheles sundaicus* complex in relation to malaria transmission and vector control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 518–524.
- Dusfour, I., Linton, Y.-M., Cohuet, A., Harbach, R.E., Baimai, V., Trung, H.D., Seng, C. M., Matusop, A. & Manguin, S. (2004b) Molecular evidence of speciation between island and continental populations of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), a principle malaria vector taxon in Southeast Asia. *Journal of Medical Entomology* 41, 287–295.
- Fryauff, D.J., Leksana, B., Masbar, S., Wiady, I., Sismadi, P., Susanti, A.I., Nagesha, H.S., Syafruddin, Atmosoedjono, S., Bangs, M.J. & Baird, J.K. (2002) The drug sensitivity and transmission dynamics of human malaria on Nias Island, North Sumatra, Indonesia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 96, 447–462.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor, and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Harbach, R.E. (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research* 537–553.
- Harbach, R.E. & Knight, K.L. (1980) *Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy*. Plexus Publishing, Marlton, New Jersey.
- Harbach, R.E. & Knight, K.L. (1982) Corrections and additions to *Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy*. *Mosquito Systematics (for 1981)* 13, 201–217.
- IMPE [Institute of Malariology, Parasitology and Entomology]. (1987) *Keys to Vietnam (adults-pupae-larvae)*. Department of Entomology, Institute of Malariology, Parasitology and Entomology, Hanoi, Vietnam.
- Jermiin, L.S. & Crozier, R.H. (1994) The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution* 38, 282–294.
- Kalra, N.L. (1978) National Malaria Eradication Programme, India – its problems, management and research needs. *Journal of Communicable Diseases* 10, 1–20.
- Kirnowardoya, S. & Yoga, G.P. (1987) Entomological investigations of an outbreak of malaria in Cilacap on the south coast of central Java, Indonesia during 1985. *Journal of Communicable Diseases* 19, 121–127.
- Knight, K.L. & Stone, A. (1977) *A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae)*. Second edition. The Thomas Say Foundation 6, ix + 1–611.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244–1245.
- Kumari, R., Joshi, H., Giri, A. & Sharma, V.P. (1993) Feeding preferences of *Anopheles sundaicus* in Car Nicobar Island. *Indian Journal of Malariology*, 30, 201–206.
- Kumari, R. & Sharma, V.P. (1994) Resting and biting habits of *Anopheles sundaicus* in Car Nicobar Island. *Indian Journal of Malariology* 31, 103–114.
- Linton, Y.-M., Harbach, R.E., Chang, M.S., Anthony, T.G. & Matusop, A. (2001) Morphological and molecular identity of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. *Systematic Entomology* 26, 357–366.
- Meek, S.R. (1995) Vector control in some countries of Southeast Asia: comparing the vectors and the strategies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89, 135–147.
- Nanda, N., Das, M.S., Wattal, S., Adak, T., Subbarao, S.K. (2004) Cytogenetic characterization of *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) population from Car Nicobar Island, India. *Annals of the Entomological Society of America* 97, 171–179.
- Nguyen Tang Am, Le Quy, R., Vu Thi, H. & Nguyen Bieh, L. (1993) Entomo-epidemiological studies of malaria in the coastal zone of Ho Chi Minh City, 1990–1992. 3, 464–473.
- Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 85, 2444–2448.
- Phan, V.T. 1998. *Epidémiologie du paludisme et lutte antipaludique au Vietnam*. Edition médicales Vietnam, Hanoi.
- Prasittisuk, C. (1985) Malaria vectors in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 16, 141–145.
- Reid, J.A. (1968) *Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo*. Studies from the Institute of Medical Research Malaya 31, xiii + 1–520.
- Rodenwaldt, E. (1925) Entomologische notities. III. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië* 65, 173–201 + 1 pl.
- Simon, C., Fratti, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Lui, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic unity of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651–701.
- Suguna, S.G., Gopala, K., Rathinam, Rajavel, R. & Dhanda, V. (1994) Morphological and chromosomal descriptions of new species in the *Anopheles subpictus* complex. *Medical and Veterinary Entomology* 8, 88–94.
- Sukowati, S. & Baimai, V. (1996) A standard cytogenetic map for *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) and evidence for chromosomal differentiation in populations from Thailand and Indonesia. *Genome* 39, 165–173.
- Sukowati, S., Baimai, V., Harun, S., Dasuki, Y., Andris, H. & Efriwati, M. (1999) Isozyme evidence for three sibling species in the *Anopheles sundaicus* complex from Indonesia. *Medical and Veterinary Entomology* 13, 408–414.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24, 4876–4882.
- Trung, H.D., Van Bortel, W., Sochantha, T., Keokenchanh, K., Quang, N.T., Cong, L.D. & Coosemans, M. (2004) Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia. *Tropical Medicine & International Health* 9, 230–237.

**Table 1. Relative numbers of nuclear ITS2 and partial mtDNA COI and Cyt b sequences generated for *A. sundaicus* and *A. epiroticus*. 1Sarawak, Malaysia. \*Neotype locality.**

Country	Province	Code	<i>A. sundaicus</i>			<i>A. epiroticus</i>		
			ITS2	COI	Cyt B	ITS2	COI	Cyt B
Cambodia	Kaoh Kong	CKK	-	-	-	-	2	5
Malaysia	Lundu <sup>1*</sup>	MAL	13	27	7	-	-	-
	Miri <sup>1</sup>	MAM	16	22	6	-	-	-
	Terengganu	MAT	-	-	-	-	4	6
Thailand	Trat	TTR	-	-	-	6	11	6
	Pattani	TPA	-	-	-	-	4	8
	Phangngu	TPG	-	-	-	13	5	5
Vietnam	Bac Lieu	VBL	-	-	-	35	7	7
	Can Gio	VCG	-	-	-	14	1	-
	Ha Giang	VHG	-	-	-	1	-	-
	Ho Chi Minh	VHCM	-	-	-	6	15	7
	Soc Trang	VST	-	-	-	4	1	-
	Tien Giang	VTG	-	-	-	1	-	-
	Tra Vinh	VTV	-	-	-	2	-	-
	Total			29	49	13	82	50

**Table 2. Range (mode) of branches for pupal setae of *Anopheles epiroticus* sp. n. (in boldface type) and *An. sundaicus* (below boldface entries).**

Setae no.	Cephalo thorax CT	Abdominal segments								Paddle Pa	
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
0	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-
1	1-3(2) 2,3(3)	45-101(82) ≈100	5-7(5) 4-9(5)	3-5(4) 3-6(4)	2-4(3) 3-6(4)	1,2(1) 1,2(1)	1	1	1	1	1
2	1-4(2) 2-5(4)	3-6(5) 3-7(6)	4-6(4) 2-7(6)	4-6(5) 4-7(5)	3,4(3) 2-5(4)	1-5(3) 3-5(3)	2-4(3) 3-5(3)	2-4(2) 3-5(3)	-	-	1-4(2) 1-3(2)
3	2-5(3) 2,3(3)	1,2(1) 1,2(1)	1-3(1) 1-7(1)	1-6(3) 1-3(3)	3-6(3) 4-7(6)	1-3(1) 1-3(2)	1,2(1) 1-3(1)	1-5(2) 1-3(3)	-	-	-
4	1-3(2) 1-3(3)	3-7(4) 4-7(5)	2-5(3) 1-5(2)	1-5(4) 2-5(3)	1-5(4) 1-5(3)	1-4(3) 1-4(2)	1,2(1) 1	1-3(1) 1	1, 2(1) 1,2(1)	-	-
5	2-6(5) 5-9(6)	1-3(2) 2,3(2)	2-6(4) 3-6(4)	4-6(5) 3-7(5)	2-5(3) 3-5(4)	3,4(3) 3-5(4)	2-4(3) 3,4(4)	2-4(3) 3,4(4)	-	-	-
6	1-3(2) 1-3(3)	1,2(1) 1,2(1)	1,2(1) 1,2(1)	2-5(3) 3-6(3)	1-4(2) 2-4(3)	1,2(2) 2	1,2(1) 1-3(2)	1-4(2) 2,3(2)	-	-	-
7	1-3(2) 2,3(2)	1-6(3) 2-6(4)	1-3(2) 3-7(4)	1-4(1) 2-4(2)	1-4(1) 1-3(2)	1-5(1) 1-4(3)	1-4(1) 1-4(2)	1-3(1) 1,2(1)	-	-	-
8	1,2(1) 1,2(1)	-	-	1-4(3) 2,3(2)	1-3(2) 2,3(2)	1-4(2) 1-3(2)	1-4(2) 2,3(2)	1-4(3) 2-4(3)	-	-	-
9	1-3(2) 1-3(3)	1	1	1	1	1	1	1	9-18(11) 9-14(10)	-	-
10	1-4(1) 1,2(1)	-	-	1-3(1) 1-3(2)	1	1	1	1,2(1) 1-3(1)	-	-	-
11	1-4(3) 2-4(3)	-	-	1,2(1) 1	1,2(1) 1	1,2(1) 1	1,2(1) 1	1,3(1) 1-3(2)	-	-	-
12	1-4(2) 1-4(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-

No.	Head		Thorax				Abdominal segments							
	C	P	M	T	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	X	
	1	—	—	—	—	1	1	1	1	—	1	1	—	
	1	1	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	—	
	1	5-13	18-	1,2(1)	3-8(5)	8-	9-	12-	10-	9-	8-	1	1	
	1	(10)	32(28)	1,2(2)	5-9(6)	16(10)	16(11)	16(14)	17(15)	15(14)	15(11)	1	1	
		6-	22-			10-	11-	13-	12-	12-	12-			
		15(10)	30(26)			16(12)	17(14)	16(15)	17(15)	16(14)	15(12)			
	1	7-13(8)	1	1,2(1)	1-5(2)	2-4(3)	2-6(3)	1	1	1,2(1)	2-4(2)	2-4(4)	12-	
	1	5-10(9)	1,2(1)	1	1,2(2)	3-5(4)	2-5(3)	1	1	1,2(1)	2,3(3)	4-7(6)	29(13)	
													13-	
	1	1	1	1-4(3)	1-3(1)	1	1,2(1)	1-3(3)	1,2(1)	1,2(1)	1-3(2)	5-	8-	
	1	1	1	1-6(4)	1	1	1	2,3(3)	1	1	2,3(3)	11(7)	16(11)	
												5-9(6)	10-	
													17(12)	
	1	14-	2-4(3)	1-4(3)	3-8(5)	2-7(4)	1-6(3)	2-4(2)	2-4(3)	1,2(1)	1,2(1)	1,2(1)	5-12	
	1	26(24)	2-4(3)	2-4(3)	5-9(6)	4-8(6)	2-4(3)	2,3(3)	2-4(3)	1	1	1	5-17	
		12-												
		21(17)												
	17-	14-	1	27-	2-8(3)	3-6(4)	3-6(3)	2-4(3)	3-5(3)	3-6(4)	3-6(5)	3-7(5)	—	
	24(20)	25(23)	1	42(35)	3-5(5)	5,6(5)	4-6(5)	3,4(4)	3-6(5)	5-7(5)	5-8(6)	3-5(4)	—	
	15-	17-		28-										
	24(20)	27(22)		44(34)										
	13-	1	1-6(2)	2-4(3)	20-	22-	22-	2-4(2)	2,3(2)	2,3(3)	2-4(3)	—	—	
	22(16)	1	3-6(4)	1-4(3)	37(32)	40(35)	33(23)	2,3(3)	2,3(3)	2,3(3)	3-5(4)	—	—	
	13-				24-	27-	22-							
	20(18)				36(29)	36(33)	31(27)							
	17-	14-	2-5(4)	21-	25-	25-	2-4(3)	2-6(3)	1-5(3)	1-5(3)	2-4(3)		4-9(7)	
	25(20)	25(23)	2,3(3)	41(34)	39(32)	41(33)	3-5(4)	2-5(4)	2-5(4)	2-4(3)	2-4(3)	1-S,	4-8(8)	
	16-	15-		26-	25-	28-								
	25(20)	25(21)		38(28)	35(32)	39(37)								
	1,2(1)	19-	12-	14-	—	1-3(2)	2,3(2)	2	1-3(2)	1-3(2)	2-6(3)		2-7(4)	
	1-3(1)	38(33)	23(14)	43(40)	—	2	2,3(2)	2,3(2)	1-3(2)	2,3(2)	3-5(4)	2-S,	4-7(4)	
		24-	14-	30-										
		34(29)	21(16)	45(40)										
	3-5(4)	1-4(2)	1	14-	3	3-9(5)	2-7(5)	2-4(3)	2-4(3)	2-5(3)	1-4(3)		1-3(1)	
	3-6(5)	1-4(2)	1	39(20)	3,4(3)	5-8(7)	4-6(4)	3-5(3)	3-5(3)	2-4(3)	2-5(3)	6-S,	1-3(2)	
				13-										
				21(14)										
	2,3(2)	1,3(1)	1	12-	1	1-4(3)	1,2(1)	1-3(1)	1,2(1)	1-3(2)	1-8(5)		1,2(2)	
	2,3(2)	1	1	32(18)	1	2-4(2)	1	1	1,2(1)	1-3(2)	4-9(5)	7-S,	1-3(2)	
				12-										
				26(21)										
	18-	1	1	0,1(0)	3	1	2-4(2)	1-4(2)	1,2(2)	1,2(1)	1-3(2)		1-4(3)	
	39(31)	1	1	—	3,4(3)	1	2-4(3)	1-3(2)	1-3(2)	1-3(2)	1,2(1)	8-S,	2-4(3)	
	24-													
	35(32)													
	2-5(3)	1	1,2(2)	1-3(2)	2,3(2)	1-3(1)	1-3(2)	1-3(2)	1-3(2)	1,2(1)	1,2(1)	9-S,	2-4(3)	
	3-5(3)	1	1	1,2(2)	1-3(3)	1,2(1)	1-3(2)	2	1-3(3)	1-3(1)	1		2-4(3)	
	3-5(3)	2-4(3)	3-6(4)	2-4(3)	2,3(3)	3,4(3)	2-5(3)	2,3(3)	2-5(3)	2-7(6)	2-7(3)	—	—	
	3-6(4)	3-5(4)	4-8(6)	3,4(3)	3	3,4(3)	3	3,4(3)	3	4-9(6)	3,4(3)	—	—	
	□	3-5(4)	5-10(6)	—	—	—	1	1	1	1	1	1	—	
	5-7(6)	3,4(4)	5-12(9)	—	—	—	1	1	1	1	1	1	—	
	□	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	9-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	15(12)													

□ Not observed.

**Table 3. Range (mode) of numbers of branches for fourth-instar larval setae of *Anopheles epiroticus* sp. n. (in boldface type) and *An. sundaicus* (below boldface entries).**



**Fig. 2. Alignment of the polymorphic sites along a 445-bp fragment of the mitochondrial COI gene in 49 *A. sundaicus* (SUN) and 50 *A. epiroticus* (EP). Numbers in parentheses following the haplotypes indicate the number of individuals represented, Base 294 is highlighted as a species diagnostic polymorphism.**

		1111111111	1112222233	33344444
	2233344568	0002355666	7891348916	78922233
	7836928107	0250209358	4356192424	81336925
EPCOI-1 (11)	GTATACACAA	CGAGAGTCAT	GCAAGGAGAT	CAATCTCC
EPCOI-2 (4)	.....	.....G.....	.....	.....
EPCOI-3 (3)	AC.....C	T.....	...G.A...C	.....
EPCOI-4 (3)	A.....T	.....	...G.....C	...C....
EPCOI-5 (2)	.....	.....G.....	...C.....	.....
EPCOI-6 (2)	A...T.T.T	.....C	...G.....C	.....
EPCOI-7 (2)	AC.....T	.....G.	...G.....C	.G.....
EPCOI-8 (2)	A.....	.....	.....	.....
EP1169TTR	A.....T.T	.....T.	.T.G.....C	...T...
EP1171TTR	.....T	.....A...	...G.....C	.G.....
EP1173TTR	A..C.....T	.....	...G.....C	.....
EP1174TTR	A.....T	.....	...G.A...C	.....
EP24TTR	.....T	.....A...	...G..G..C	.G.....
EP20TTR	A.....T.T	.....	...G.....C	.....
EP6TPG	.....	TA..G.....	...T.....G.	.....T.
EP14TPG	AC.....T	T.....	...G.A...C	.....
EP15TPA	..G.....	.....G.....	...T.....	.....TT
EP22TPA	..G...C..T	...G.....	A..T.....	.G...T.
EP25TPA	..G.....	.....	...T.A...	..G...T.
EP29TPA	..G.....T	.....	...TAA...	..G.T...
EP18VHCM	.....	.....	...A.....	.....
EP27VHCM	...T.....	.....	.....	.....
EP12VHCM	.....	.....G.....	.....	.....
EP45VHCM	.....	.....	...AA.....	.....
EP93VBL	.....	...A.....	.....	.....
EP19CKK	.....	.....	.....	...C..
EP60CKK	A.....T	.....A...	...G..G..C	.G.....
EP4MAT	A.....T	.....	...G.A...C	...C....
EP5MAT	A.....T	.AC.....	...G.....C	.....
SUNCOI-1 (16)	A.....G.	...G.C...	...T.A.A.	G.....
SUNCOI-2 (13)	A.....GT	...G.....	...T..A.	G..C....
SUNCOI-3 (8)	A.....TGT	...G.C...	...T..A.	G..C....
SUNCOI-4 (3)	A.....GT	...G.C...	...T..A.	A..C....
SUNCOI-5 (2)	A.....	...G.....	...T..A.	G.....
SUN2261MAL	A.....G.	...G.C...	...T.A.A.	G..C....
SUN1391MAM	A.....	...GAC...	...T..A.	G.....
SUN48MAM	A.....GG	...G.C...	...T.A.A.	G.....
SUN14MAL	A.....G	...G.C...	...T..A.	G.....
SUN6MAL	A.....TGT	...G.....	...T.A.A.	G..C....

**Fig. 3. Alignment of the polymorphic sites along a 485-bp fragment of mitochondrial Cyt b sequences of 13 *A. sundaicus* (SUN) and 44 *A. epiroticus* (EP). sequences, showing only variable bases. Bases indicated in bold (12, 267, 297, 469, 474) represent species-specific differences in the samples studied to date. Numbers in parentheses following the haplotypes indicate the number of individuals represented.**

	111122222333444444
	11291336123691781226667
	723464265384775867562894
SUNCB6MAL	GTATGTTCTAA <b>ACT</b> CTTAGCC <b>ACC</b>
SUNCB-1 (6)	.....A.....
SUNCB-2 (4)	.....G..T...A.....
SUNCB-3 (2)	.....T...A.....
EPCB-1 (12)	.C.CA..TC... <b>TC</b> ...A.. <b>GTT</b>
EPCB-2 (4)	.C.C...T... <b>TC</b> ...AT.. <b>TT</b>
EPCB-3 (4)	.C.C...T... <b>TC</b> ...A.. <b>TT</b>
EPCB-4 (3)	.C.CA..T... <b>TC</b> ..C.A.. <b>TT</b>
EPCB-5 (2)	.C.CA..T... <b>TC</b> ...A.T.. <b>TT</b>
EPCB-6 (2)	.C.CA..T... <b>TC</b> ...A.. <b>TT</b>
EPCB-7 (2)	.C.CA..AT... <b>TC</b> ...A.. <b>TT</b>
EPCB2792VBL	.C.CA..TC... <b>TC</b> ..C.A.. <b>GTT</b>
EPCB24VHCM	.C.CA..TC... <b>TC</b> ...A.. <b>TT</b>
EPCB19CKK	.C.CA..TC... <b>TC</b> ...AT.. <b>GTT</b>
EPCB57CKK	CC.CA..TC... <b>TCA</b> ...A.. <b>GTT</b>
EPCB6TPG	.C.C...TC... <b>TCT</b> ...A.T.. <b>TT</b>
EPCB202TPG	.C.CA..T... <b>TCT</b> ...A.. <b>TT</b>
EPCB14TPG	.C.CA..T..T.. <b>TC</b> ...A.T.. <b>TT</b>
EPCB15TTP	.C...T... <b>TC</b> ...A.. <b>TT</b>
EPCB25TTP	.C.C... <b>TCT</b> ...A.. <b>TT</b>
EPCB26TTP	.CTCA..TC... <b>TC</b> ...A.. <b>GTT</b>
EPCB22TTP	.C..A..T... <b>TC</b> .C.GA.. <b>TT</b>
EPCB1MAT	.C.CAC.T... <b>TC</b> ...A.T.. <b>TT</b>
EPCB3MAT	.C..A..T... <b>TC</b> ...A.T.. <b>TT</b>
EPCB5MAT	.C.CA..T.G.. <b>TC</b> ...A.. <b>TT</b>

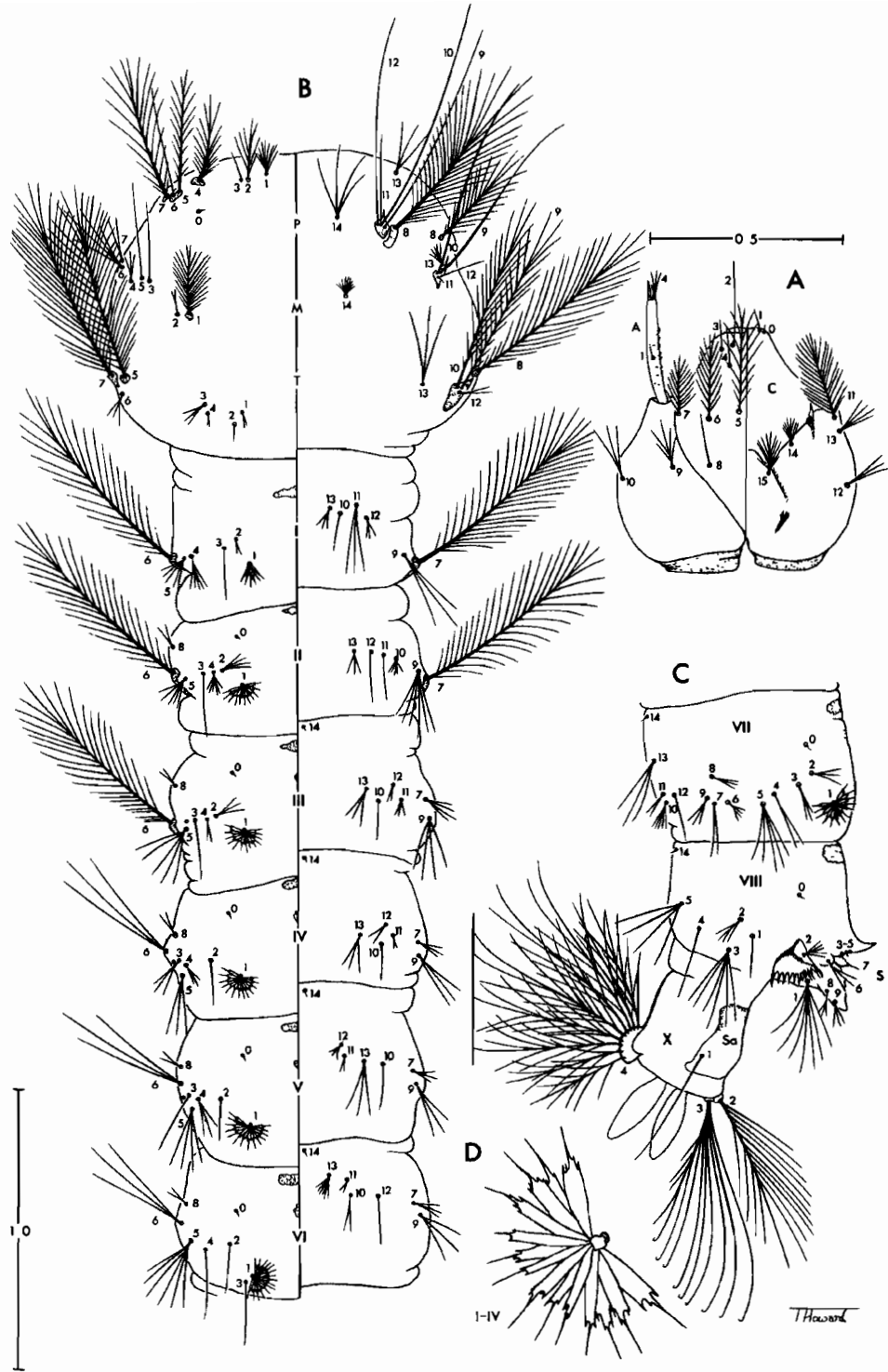


Fig. 4. Pupa and male genitalia of *Anopheles epiroticus* sp.n. Pupa: (A) left side of cephalothorax, dorsal to right; (B) dorsal (left) and ventral (right) aspects of metathorax and abdomen. C, Male genitalia, aspects as indicated. Ae = aedeagus; Cl = claspette; CT = cephalothorax; Gc = gonocoxite; Gs = gonostylus; LAe = leaflets of aedeagus; Pa = paddle; Ppr = paraproct; Pr = proctiger; I-VIII = abdominal segments I-VIII; 0-14 = setal numbers for specified areas, e.g., seta 3-I. Scales in mm.

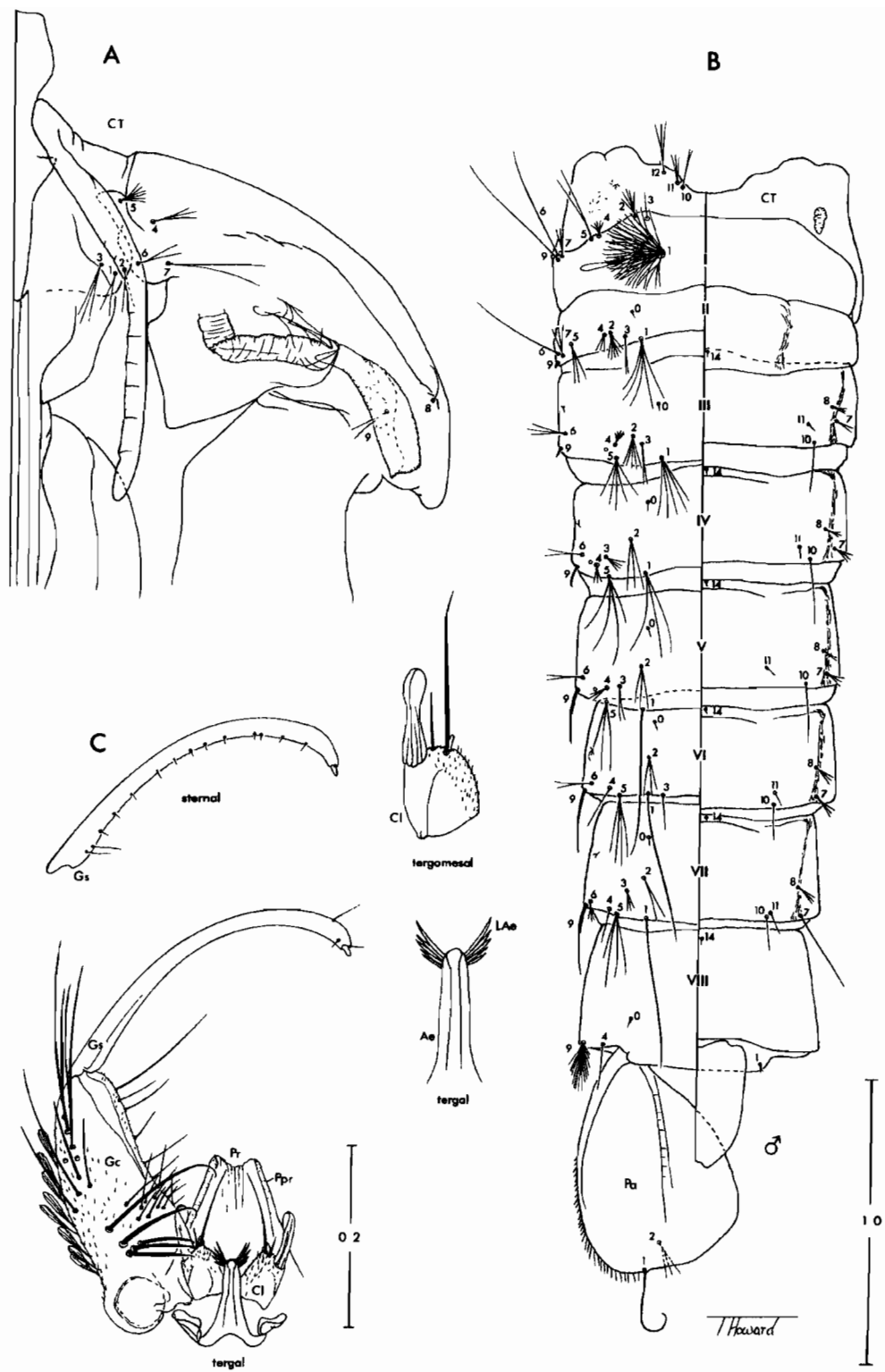


Fig. 5. Fourth-instar larva of *Anopheles epiroticus* sp. n. A, Head, dorsal (left) and ventral (right) aspects of left side; B, thorax and abdominal segments I-VI, dorsal (left) and ventral (right) aspects of left side; C, abdominal segments VII-X, left side; D, palmate seta 1-IV showing the structure of leaflets. A = antenna; C = cranium; M = mesothorax; P = prothorax; S = spiracular lobe; Sa = saddle; T = metathorax; I-VIII, X = abdominal segments I-VIII, X; 0-15 = setal numbers for specified areas, e.g., seta 5-C. Scales in mm.

---






















### **ANNEXE 3 : REFERENCES DES IMAGES SATELLITES**

Liste des images satellites pour chaque village avec le type de satellites, la date de chaque image et la composition colorée pour celles obtenues de LANDSAT.

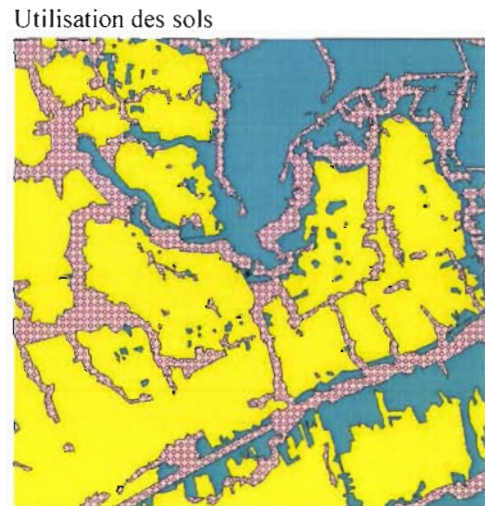
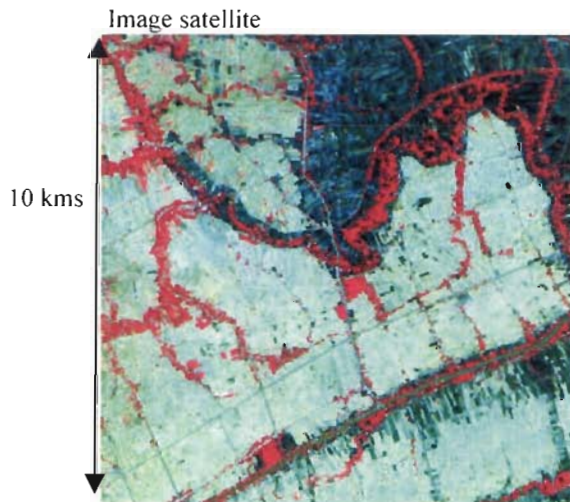
Code Village	Référence de l'image
VBLA	SPOT XS KJ 275-331 - 05/02/2001
VBLB	SPOT 5 - KJ 274-332 - 19/01/2003
VBTA	LANDSAT 7 - 13/02/2002 - RGB: 452
VBTB	LANDSAT 7 - 13/02/2002 - RGB: 452
VCMA	LANDSAT 7 - 07/02/2003 - RGB: 452
VCMB	LANDSAT 7 - 07/02/2003 - RGB: 452
VCMC	LANDSAT 7 - 07/02/2003 - RGB: 452
VCMD	SPOT 5 - KJ 274-332 - 19/01/2003
VHCA	LANDSAT 7 - 13/02/2002 - RGB: 452
VHCB	LANDSAT 7 - 13/02/2002 - RGB: 452
VKGA	LANDSAT 7 - 07/02/2003 - RGB: 452
VKGB	LANDSAT 7 - 07/02/2003 - RGB: 452
VLAA	LANDSAT 7 - 13/02/2002 - RGB: 452
VLAB	LANDSAT 7 - 13/02/2002 - RGB: 452
VSTA	SPOT XS KJ 275-331 - 05/02/2001
VTGA	SPOT 5 - KJ 276-329 - 09/02/2003
VTGB	SPOT 5 - KJ 276-329 - 09/02/2003
VTVA	LANDSAT 7 - 13/02/2002 - RGB: 452

**ANNEXE 4: IMAGE SATELLITE, CARTE D'UTILISATION DES SOLS ET ILLUSTRATION DES VILLAGES ETUDIES  
DANS LE SUD VIETNAM**

**LEGENDE**

-  BARE LAND
-  BEACH
-  DEFORESTED MANGROVE
-  ESTUARY
-  FOREST PLANTATION
-  FRUIT TREE PLANTATION
-  GRASSLAND
-  HIGHLY DEFORESTED MANGROVE
-  IRRIGATED RICE FIELDS IN PLAINS OR VALLEYS
-  NATIVE MANGROVE
-  REGROWTH MANGROVE
-  RICE-FISH FARMS
-  RIVER
-  RURAL HABITAT
-  RURAL HABITAT AND GARDENS
-  SEA
-  SHRIMP FARMS
-  SOYA BEAN
-  URBAN HABITAT
-  VEGETABLES OR FRUITS
-  WETLANDS

**VBIA - BAC LIEU, VINH LOI, HUNG THANH, GIA HOI (N9°22'13.4" E105°48'39.8")**



**Dates de collecte:** 5-12 avril 2003

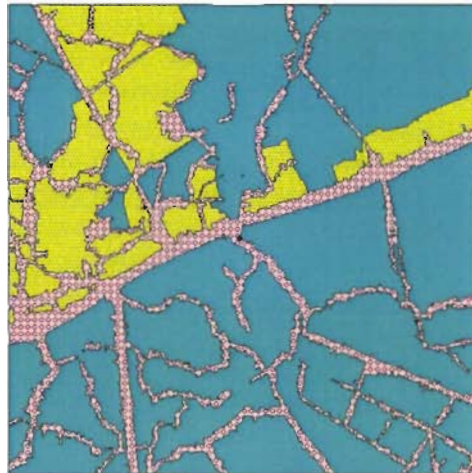
**Espèces trouvées:** *An. barbirostris*, *An. sinensis*, *An. sundaicus*, *An. tessellatus*

**VBLB, BAC LIEU, DONG HAI, AN TRACH, VAN DUC A (N9°11'01.0" E105°18'12.4")**

Image satellite



Utilisation des sols



Bassins d'élevage de crevettes



**Dates de collecte:** 14-16 avril 2003 / 15-18 oct 2003

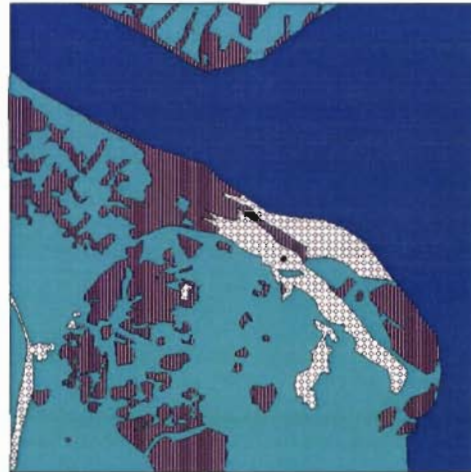
**Espèces trouvées :** *An. nimpe*, *An. sundaicus* / *An. nimpe*,  
*An. sinensis*, *An. sundaicus*, *An. tessellatus*

**VBTA, BEN TRE, BINH DAI, THUA DUC, THUA LONG (N10°09'57.56" E106°45'39.17")**

Image satellite



Utilisation des sols



Arbres fruitiers



**Dates de collecte:** 5-11 avril 2003

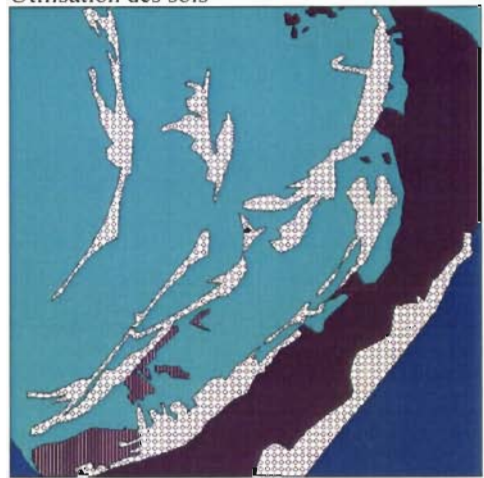
**Espèces trouvées :** *An. indiginitus*, *An. nimpe*, *An. subpictus*,  
*An. sundaicus*, *An. vagus*

**VBTB, BEN TRE, THANH PHU, THANH PHONG, THANH PHUOC (N9°51'42.07" E106°38'04.7")**

Image satellite



Utilisation des sols



Bassins aquacoles d'eau saumâtre



**Dates de collecte:** 15-22 avril 2003

**Espèces trouvées :** *An. indiginitus*, *An. nimpe*, *An. subpictus*,  
*An. sundaicus*, *An. vagus*

**VCMA, CA MAU, U MINH, KHANH AN, AP (N9°14'47.04" E105°04'24.58")**

Image satellite



Utilisation des sols



Bassins d'élevage de crevettes

**Dates de collecte:** 19-21 avril 2003

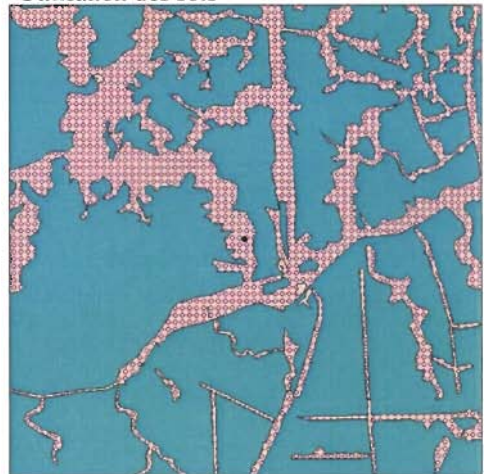
**Espèces trouvées :** *An. barbirostris*, *An. nimpe*, *An. sundaicus*

**VCMB, CA MAU, CAI NUOC, TRAN THOI, MY HUNG (N8°51'55.05" E105°0'51.4")**

Image satellite



Utilisation des sols



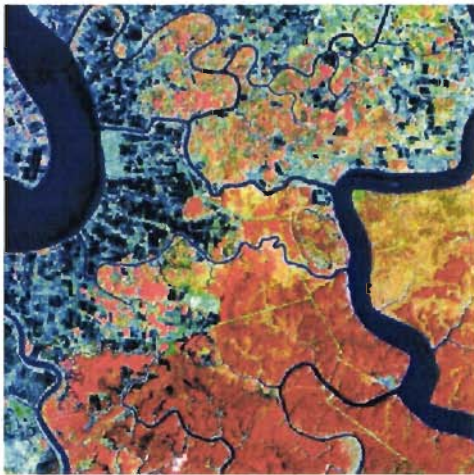
**Dates de collecte:** 19-21 avril 2003

**Espèces trouvées :** *An. sundaicus*

Bassins l'élevage de crevettes

**VHCA, HO CHI MINH, CAN GIO, AN THOI DONG, AN DONG (N10°34'17.7" E106°48'51.8")**

Image satellite



Utilisation des sols



**Dates de collecte:** 04-08 avril 2003 / 10-21 oct 2003

**Espèces trouvées :** *An. nimpe*, *An. sundaicus* / *An. nimpe*,  
*An. sundaicus*, *An. tessellatus*

Déforestation et préparation des bassins d'élevage

**VHCB, HO CHI MINH, CAN GIO, TAM TON HIEP, TRAN HUNG DAO (N10°37'05.04"  
E106°51'21.0")**

Image satellite



Utilisation des sols



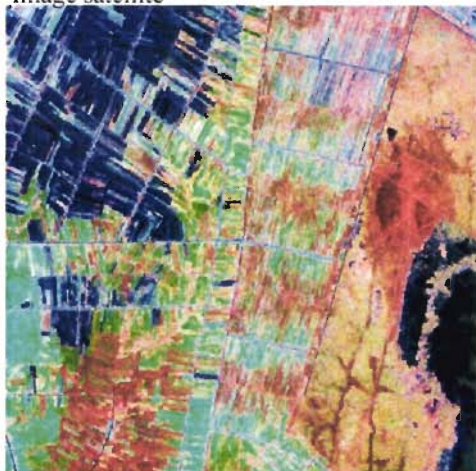
Dates de collecte: 12-15 avril 2003

Espèces trouvées : *An. nimpe*, *An. sundaicus*

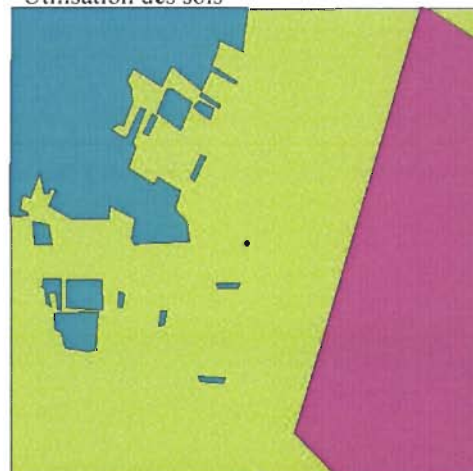
Déforestation et bassins d'élevage de crevettes

**VKGA, KIEN GIANG, AN MINH, AN MINH BAC, AN THANH (N9°36'54.9 E105°02'29.2")**

Image satellite



Utilisation des sols



Dates de collecte: 04-08 avril 2003

Espèces trouvées : *An. sinensis*, *An. sundaicus*

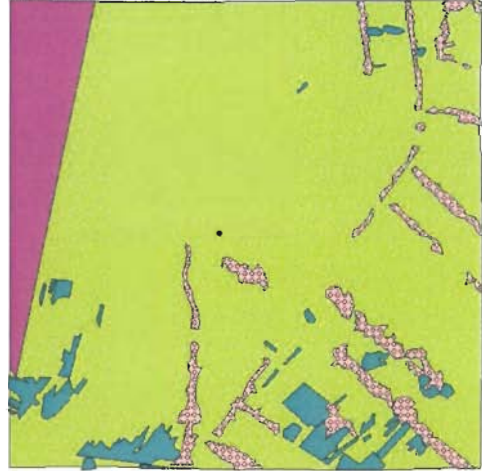
Rizières et habitation

**VKGB, KIEN GIANG, AN MINH, MINH TUAN, MINH KIEN (N9°32'47.66" E105°9'3.21")**

Image satellite



Utilisation des sols



Dates de collecte: 12-14 avril 2003

Espèces trouvées : *An. sinensis*, *An. subpictus*, *An. sundaicus*

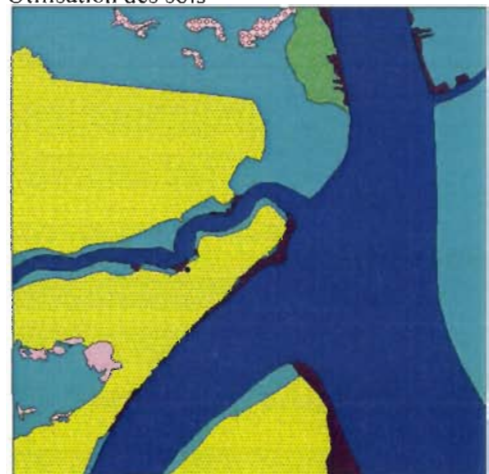
Mare d'eau douce chargée en fer

**VIAA, LONG AN, CAN DUOC, LONG HUU DONG, LONG NINH (N10°29'53.7" E106°42'33.9")**

Image satellite



Utilisation des sols



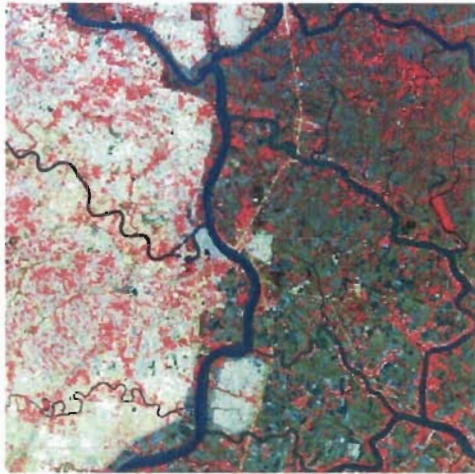
Mangrove dégradée

Dates de collecte: 18-21 avril 2003

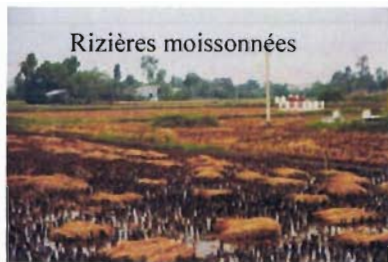
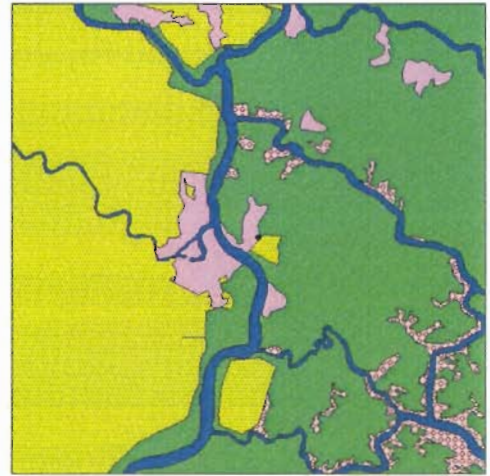
Espèces trouvées : *An. subpictus*, *An. sundaicus*

**VLAB, LONG AN, CAN GIUOC, PHUOC LAI, TAN THANH (N10°36'29.3" E106°40'40.3")**

Image satellite



Utilisation des sols



Rizières moissonnées

Dates de collecte: 24-27 avril 2003

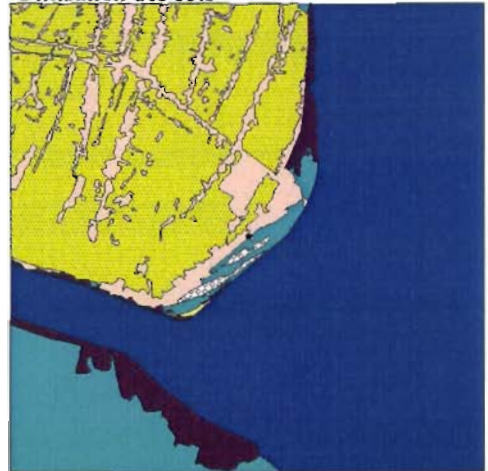
Espèces trouvées : *An. subpictus*, *An. sundaicus*

**VTGA, TIEN GIANG, GO CONG DONG, TAN THANH, CAU MUONG (N10°16'58.2"E106°46'06.9")**

Image satellite



Utilisation des sols



Dates de collecte 25-30 mai 2003

Espèces trouvées : *An. sinensis*, *An. subpictus*, *An. sundaicus*

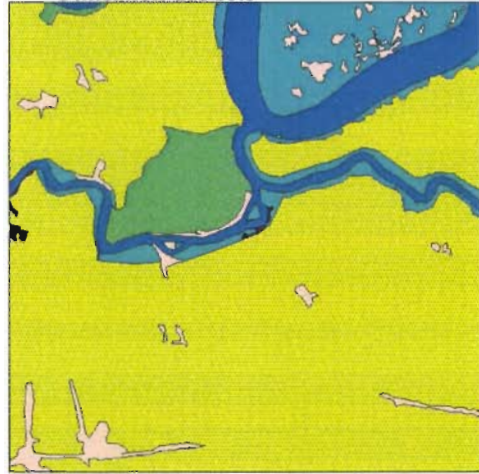
Bassin d'élevage de crevettes asséché au premier plan et cultues annueles au deuxième plan

**VTGB, TIEN GIANG, GO CONG TAY, BINH PHU, THO KHUONG (N10°24'35.4" E106°35'12.6")**

Image satellite



Utilisation des sols



Bassin de crevettes asséché

Dates de collecte: 02-06 mai 2003

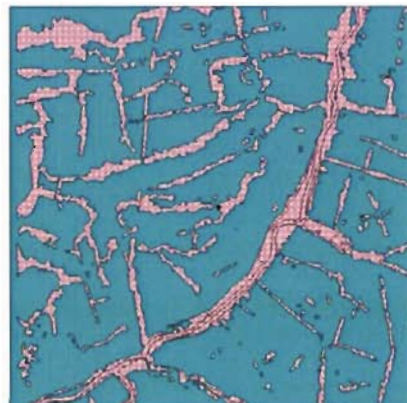
Espèces trouvées : *An. barbirostris*, *An. campestris*, *An. indefinitus*, *An. sinensis*, *An. subpictus*, *An. sundaicus*, *An. tessellatus*, *An. vagus*.

**VCMC, CA MAU, CAI NUOC, DONG THOI, BAU TRON**

Image satellite



Utilisation des sols

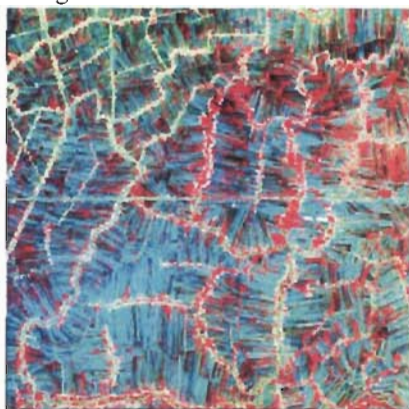


Dates de collecte : 18-22 oct 2003 Densité d'*An. sundaicus* collectée sur homme: 156.81 m/h/n

Espèces trouvées : *An. nimpe*, *An. sundaicus*;

**VCMD, CA MAU, DAM DOI, TAN THUAN, THUAN HOA B**

Image satellite



Utilisation des sols



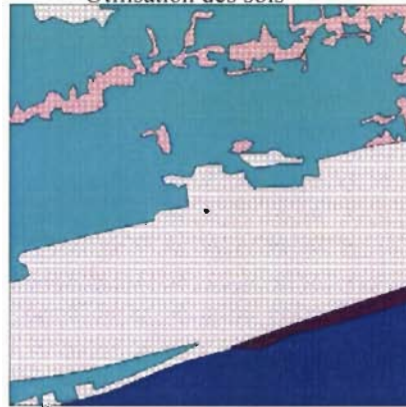
Dates de collecte : 31 oct – 8 nov 2003 Espèces trouvées : *An. nimpe*, *An. sundaicus*.

**VSTA, SOC TANG, VINH CHAU, VINH CHAU, DAI RUNG**

Image satellite



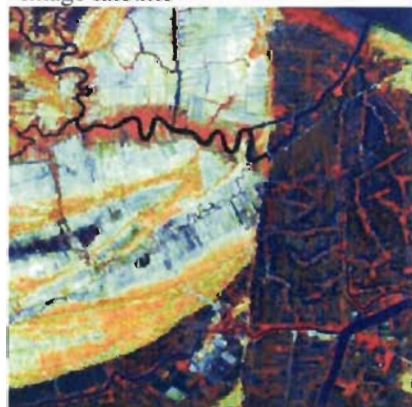
Utilisation des sols



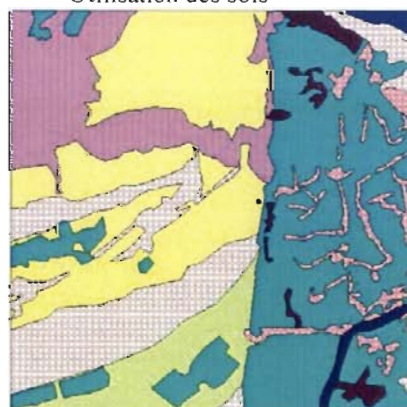
Dates de collecte : 31 oct – 8 nov 2003 Espèces trouvées : *An. campestris*, *An. sundaicus*, *An. sinensis*, *An. tessellatus*

**VTVA, TRA VINH, DUyen HAI, LONG HIEU, AP11**

Image satellite

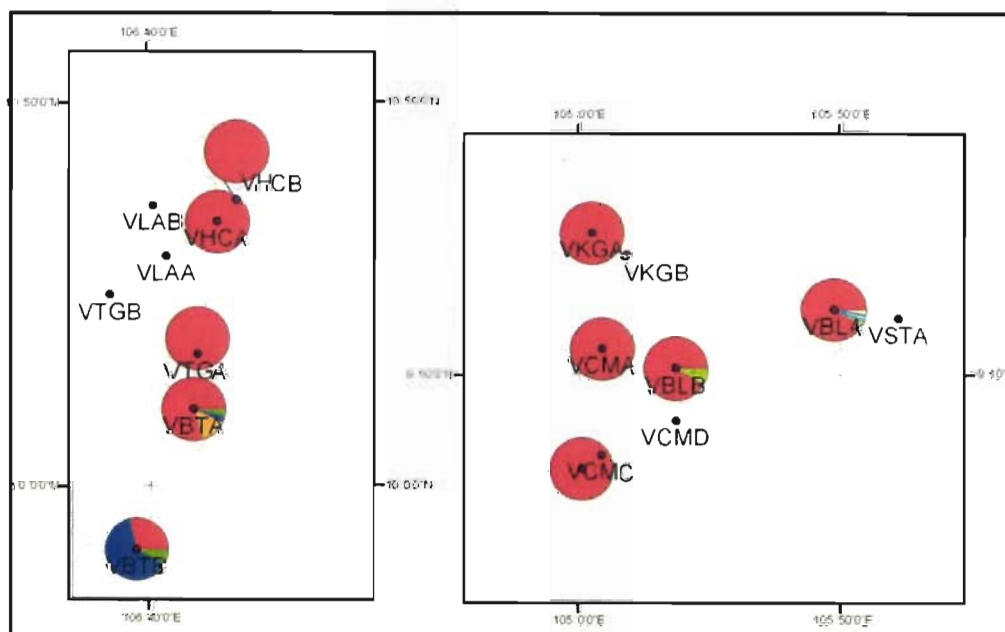
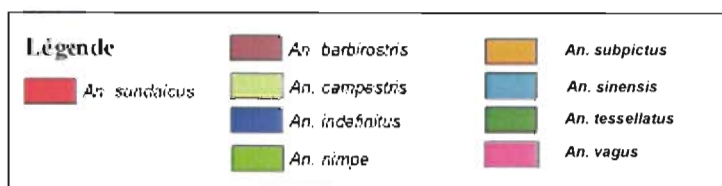
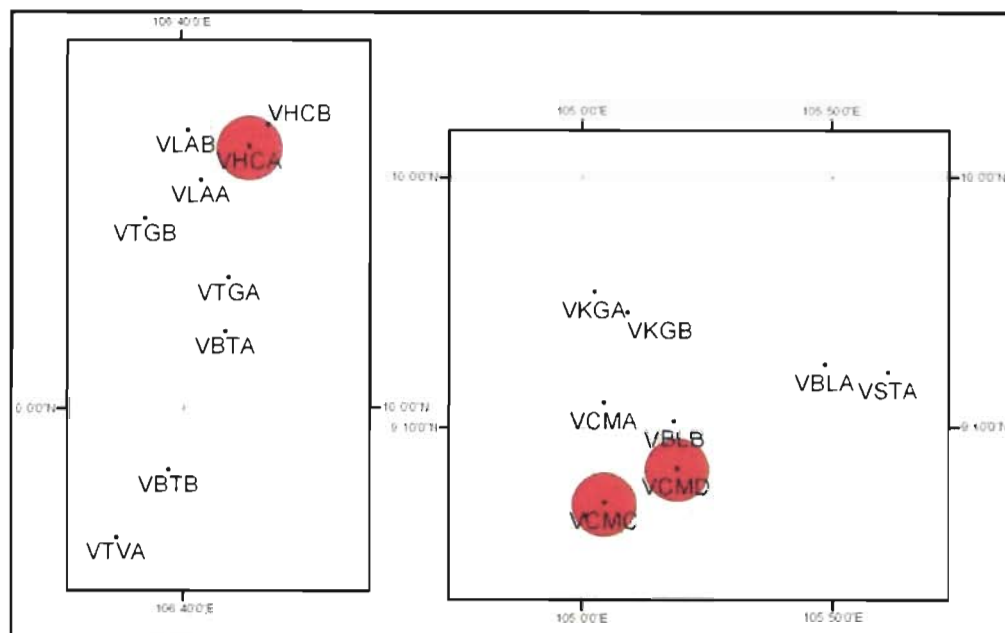


Utilisation des sols



Dates de collecte : 31 oct – 8 nov 2003 Espèces trouvées : *An. campestris*, *An. sundaicus*, *An. sinensis*, *An. tessellatus* Densité d'*An. sundaicus* collectée sur homme: 43,65 m/h/n

## ANNEXE 5 : FAUNE RESIDUELLE MATINALE



En bas : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées en faune résiduelle matinale en octobre/novembre 2003 (nombre de moustiques capturés par maison)

En haut : proportions relatives des densités d'espèces anophéliennes capturées en faune résiduelle matinale en avril/mai 2003 (nombre de moustiques capturés par maison)

## **TABLE DES MATIERES**

<b>AVANT PROPOS</b>	<b>2</b>
<b>PARTIE I • INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
Chapitre 1 • Les anophèles, vecteurs du paludisme	6
Chapitre 2 • Présentation d' <i>An. sundaicus</i> s.l.	10
Article 1 - Biologie et systématique du complexe <i>An. sundaicus</i> , impact sur la transmission du paludisme et la lutte antivectorielle	12
<b>PROBLEMATIQUE &amp; PRESENTATION DES TRAVAUX</b>	<b>23</b>
<b>PARTIE II • TAXONOMIE ET PHYLOGÉOGRAPHIE</b>	<b>26</b>
Chapitre 1 • Méthodologie	29
Taxonomie : mise en évidence des espèces	29
Phylogéographie	32
Choix des marqueurs	33
Chapitre 2 • Analyses	36
Article 2 - Mise en évidence de la spéciation entre des populations insulaires (Sarawak, Malaisie) et continentales (Thaïlande & Vietnam)	36
Article 3 - Spéciation et phylogéographie du complexe sud-est asiatique <i>An. sundaicus</i> .	47
Chapitre 3 • Synthèse et discussion générale	63
Statut taxonomique	63
Distribution générale	64
Phylogéographie	65
Congruence et incongruence des marqueurs	66
Méthodes d'analyses utilisées	69
<b>PARTIE III • METHODES D'IDENTIFICATION</b>	<b>71</b>
Chapitre 1 • Identification morphologique d' <i>An. sundaicus</i> s.l.	73
Chapitre 2 • Mise au point de méthodes d'identification	76
Comparaison morphologique des 3 espèces	76
Article 4 - PCR allèle spécifique pour identifier les membres du Complexe Sundaicus	83
Conclusion	90

**PARTIE IV • CARACTÉRISATION D'AN. SUNDAICUS S.L. DANS LE SUD VIETNAM** **91**

Chapitre 1 • Contexte	94
Présentation générale du sud Vietnam	95
Paludisme	96.
Problématique et objectifs	98
Chapitre 2 • Méthodologie	99
Sites et collectes entomologiques	99
Caractérisation de l'environnement sur le terrain et extrapolation aux 100 km <sup>2</sup>	101
Développement du SIG	102
Chapitre 3 • Environnement, biologie et résistance	105
Diversité et densité anophélienne	105
Comportement trophique d' <i>An. sundaicus</i> au sud Vietnam.	109
Caractérisation environnementale d' <i>An. sundaicus</i> dans le sud vietnam	111
Résistance	117
Chapitre 4 • Applications, discussion et perspectives	118
Caractéristiques environnementales et présence d' <i>An. sundaicus</i>	118
Comportement et résistance	120
Outil d'aide à la décision dans le développement de stratégies de lutte	121
Perspectives	122

**PARTIE V • CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE**  
**DU COMPLEXE SUNDAICUS** **122**

**BIBLIOGRAPHIE** **127**

**ENCADRES, FIGURES, ILLUSTRATIONS ET TABLES** **139**

**ANNEXES** **143**

**TABLE DES MATIERES** **178**

---

## RESUME en français

*Anopheles sudaicus* est un vecteur majeur du paludisme en Asie du Sud Est. Sa distribution s'étend sur les côtes de l'Inde au sud Vietnam jusqu'en Indonésie. L'hypothèse d'un complexe d'espèces a été avancée, d'une part, sur l'observation de différences écologiques et sur la présence trois espèces A, B et C, mises en évidence par cytogénétique et études Isoenzymatiques en Thaïlande et en Indonésie. Un quatrième cytotype a été observé dans les îles Nicobar, Inde. Notre étude, basée sur des marqueurs moléculaires (mitochondriaux et nucléaires), n'est pas en congruence avec les résultats précédents. Nous avons démontré la présence de trois espèces allopatriques : *An. sudaicus* s.s. présent dans le Nord de Bornéo, *An. epiroticus* réparti sur le continent du Vietnam, Cambodge, Thaïlande jusqu'à la péninsule malaise, et *An. sudaicus* espèce E distribué en Indonésie. La différenciation de ces trois espèces a eu lieu lors du Pléistocène au moment des variations cycliques du niveau de la mer dues aux cycles glaciaires. Leur mise en évidence est la première étape pour une meilleure compréhension de la biologie, du comportement et de la capacité vectorielle du complexe. Afin de mener à bien l'étude sur le Complexe Sudaicus et en l'absence de critères morphologiques discriminants, nous avons mis au point une méthode d'identification moléculaire par PCR multiplexe, facilement transférable dans les pays du sud concernés par l'étude du Complexe Sudaicus. Une étude de caractérisation d'*An. sudaicus* s.l. dans les provinces du sud Vietnam a permis d'évaluer l'environnement, le comportement et le degré de résistance cette région. Les gîtes larvaires propres à *An. sudaicus* s.l. sont des bassins ou mares ensoleillés d'eau stagnante, saumâtre. Cette description correspond aux bassins d'élevage de crevettes largement répandus dans la région asiatique. *An. sudaicus* s.l. est principalement anthropophile et aussi bien endophage qu'exophage. Aucune population n'a été observée résistante. Cependant, des populations restent à surveiller en terme d'évolution probable de la résistance à certains pyréthrinoides. La synthèse de ces données intégrée dans un Système d'Information Géographique a pour but de mettre en place des stratégies de lutte antivectorielle plus appropriées et de développer un système de prédiction de présence d'*An. sudaicus* s.l. Le paludisme au sud Vietnam est actuellement sous contrôle avec très peu de cas de paludisme recensés. Cependant, *An. sudaicus* s.l. est régulièrement impliqué dans des épidémies. De ce fait, face à l'augmentation de densités d'*An. sudaicus* s.l. due à l'expansion des fermes d'élevage de crevettes, la vigilance de ce vecteur doit rester accrue et la lutte antivectorielle avant tout maintenue.

**MOTS-CLES :** Complexe Sudaicus, paludisme, Asie du Sud-Est, taxonomie, phylogéographie, identification, système d'information géographique, environnement, comportement, résistance, lutte antivectorielle.

---

**TITRE en anglais :** *An. sudaicus* s.l., major malaria vector on the coastal area of Southeast Asia. From its characterization to its surveillance in southern Vietnam.

## RESUME en anglais

*Anopheles sudaicus* is a major vector of malaria in southeast Asia. Its distribution extends from the coasts of India to southern Vietnam southwards to Indonesia. The hypothesis of a species complex has been suggested on the basis of ecological variations, as well as the presence of three species A, B and C in Thailand and Indonesia, revealed by cytogenetics and isozyme analyses. A fourth cytotypic form has also been observed in the Nicobar Islands, India. Our study, based on molecular markers (mitochondrial and nuclear), is not congruent with the previous results. We demonstrated the presence of three allopatric species: *An. sudaicus* s.s. that occurs in northern Borneo, *An. epiroticus* distributed on the continent from Vietnam, Cambodia, Thailand southwards to the Malaysian Peninsular, and *An. sudaicus* species E present throughout Indonesia. The differentiation of these three species occurred during the Pleistocene as the consequence of cyclical variations of sea level from glacier cycles. This evidence is the first step for a better comprehension of the biology, the behaviour and the vectorial capacity of the complex. For further investigation of the Sudaicus Complex and in absence of discriminant morphological characters, we developed a molecular identification method by multiplex PCR, easily transferable to south countries concerned by the study of the Sudaicus Complex. A characterisation study of *An. sudaicus* s.l. in the provinces of southern Vietnam allowed the evaluation of the environment, the behaviour and the level of resistance in this region. The preferential larval habitats of *An. sudaicus* s.l. are sunlit pools or ponds with stagnant brackish water. This description corresponds to shrimp farm ponds, widely represented in the Asian region. *An. sudaicus* s.l. is mainly anthropophilic and as endophagic than exophagic. No population was found resistant. However, some populations need to be monitored for a possible evolution of the resistance to some pyrethroids. The objective of integrating the synthesis of these data into a Geographic Information System is to develop not only more appropriate vector control strategies, but also a predictive system of *An. sudaicus* s.l. presence. Malaria in southern Vietnam is now under control with a small number of malaria cases reported. However, *An. sudaicus* s.l. is regularly involved in outbreaks and epidemics. Therefore, with the increase of *An. sudaicus* s.l. densities as the result of the expansion of shrimp farming, the vigilance of this vector has to be enhanced and vector control moreover maintained.

---

## INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Centre de Biologie et Gestion des Populations, Institut de Recherche pour le Développement CS30016 Campus international de Baillarguet 34988 Montpellier sur Lez