

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie des Organismes

Formation Doctorale : Parasitologie

Ecole doctorale : Biologie Intégrative

par

Anna COHUET

**Biologie et génétique des populations d'*Anopheles funestus*, vecteur
du paludisme en Afrique**

Soutenue publiquement le 19 décembre 2003 devant le jury composé de,

M. C. COSTANTINI, Directeur de Recherche, Université la Sapienza, Rome
Mme A.B. FAILLOUX, Chargé de Recherche, Institut Pasteur, Paris
M. D. FONTENILLE, Directeur de Recherche IRD, Montpellier
M. B. GODELLE, Professeur, Université Montpellier II
M. M. RAYMOND, Directeur de Recherche CNRS, Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Examineur
Examineur

Remerciements

Les travaux présentés dans ce document ont été réalisés au laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier. Ils ont été soutenus financièrement par le programme PAL+ du Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie dans le cadre du projet « Anophèles d'Afrique ».

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail et pour ce, de se déplacer parfois de loin:

Carlo Costantini, d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et ainsi de partager votre connaissance exceptionnelle du cas complexe qu'est *Anopheles funestus*. La discussion promet d'être au vif du sujet.

Anna-Bella Failloux, qui me fait l'honneur d'être rapporteur (euse ?) de thèse, merci de votre intérêt pour mon travail.

Michel Raymond, pour ta disponibilité, ton aide précieuse. Merci de m'avoir fait partager un peu de ta large culture scientifique au cours de discussions passionnantes.

Bernard Godelle, d'avoir pris le temps de juger ce travail, je suis honorée de votre participation à mon jury de thèse.

Au cours de ces trois ans, il m'a été offert un cadre de travail stimulant scientifiquement, mais aussi une ambiance de travail agréable et chaleureuse, je tiens à remercier ceux qui y ont participé :

Didier Fontenille, je tiens tout d'abord à te remercier de m'avoir permis de faire cette thèse sous ta direction. Merci de m'avoir fait bénéficier de ta culture scientifique avec enthousiasme et passion. Ta motivation et ton insatiable curiosité m'ont soutenue et confortée dans mes choix. Ta disponibilité, malgré tant de sollicitations, m'a été d'une très grande aide. Très sincèrement, merci.

Jean-Marc Hougard, merci de m'avoir accueillie au LIN et de m'avoir accordé ta confiance. Tu as provoqué ma rencontre avec Didier Fontenille et m'as ainsi permis de réaliser cette thèse, je t'en suis très reconnaissante.

Fred Simard, tu fais décidément un piètre punk, beaucoup trop constructif ! merci pour ta très grande aide lors de la dernière ligne droite. Ta rigueur scientifique est un exemple que je vais tenter de suivre. Merci pour tes nombreuses corrections (non, j'ai pas dis trop nombreuses !). La connection Internet toute « pourrite » du Cameroun n'a pas aidé notre correspondance, merci de ne pas avoir craqué à force de faire le tour des

cyber-café de Yaoundé (du moins de ne pas m'avoir montré quand tu craquais). Ta patience et ton 'zen' sont admirables! Merci aussi à toi et ta famille pour ton accueil à Yaoundé, j'espère venir encore en profiter bientôt.

Isabelle Morlais, ton arrivée a amené un bon paquet d'idées toutes fraîches dans l'équipe. C'est un plaisir de travailler avec toi, parfois même déroutant, pas le temps de lancer l'idée que c'est déjà fait! On devrait avoir l'occasion de travailler ensemble prochainement, j'en suis très contente, non seulement pour le travail qu'on fera mais aussi pour ta gentillesse et ta sympathie.

Au LIN, l'ambiance boîte de sardine, n'a pas eu raison de la bonne entente. J'ai une attention particulière pour Pierre Kengne, pour sa gentillesse, son calme épatant; Marie-Claude, qui nous sauve les uns après les autres de la noyade administrative; Vincent Corbel et Zeinab Annan, on se comprend bien on est dans le même bateau; Philippe Bousès pour ton agréable compagnie lors de ma rédaction de thèse; Philippe Brémond pour tes efforts de cohabitation avec une étudiante parfois franchement râleuse parfois (c'est moi!); Jacques Brunhes pour ta bonne humeur et ta touche artistique, et les autres, Luc Finot, Stéphane Duchon, Raphaël N'Guessan, Myriam Collin, Cécile Brengues, Jean-Pierre Hervé, Frédéric Darriet... pour leur aide et amitié.

J'ai manipulé à plusieurs reprises à l'ISEM, merci à Nicole Pasteur, Michel Raymond, Maité Marquine, Arnaud Berthomieu, Mylène Weill et les autres pour leur accueil et leur aide.

Merci également aux personnes à qui j'ai demandé de l'aide pour l'interprétation de mes résultats: François Rousset, Arnaud Estoup, Philippe Jarne, Isabelle Olivieri. Merci pour vos conseils et de m'avoir fait bénéficier de vos expériences en génétique des pop, j'avais et j'ai encore tant à apprendre!

Ma mission à Bouaké a été mouvementée; dans ces moments difficiles, j'ai eu la chance de découvrir une famille à qui je suis très attachée. Fabrice, Nicole, Alice, Garance et Martin Chandre, je vous envoie une pensée amicale, en vous souhaitant bonheur et stabilité politique à Cotonou! Au cours de ce séjour, je n'ai finalement rien vu de la Côte d'Ivoire, si ce n'est le déchirement que vit ce pays. J'ai une pensée pour Marie, Florette, et à travers vous pour les Ivoiriens victimes de ce conflit.

Heureusement, les autres missions en Afrique ont été plus agréables.

Merci à Gilbert Le Goff et Nini, pour leur accueil lors de mon passage à Tana, de m'avoir fait découvrir les environs et donné l'envie de revenir visiter ce grand pays.

Au Cameroun, je garde un souvenir impérissable des missions de terrain avec Parfait Awono-Ambene, Christophe Antonio-Nkondjio, Charles Wondji et Jean-Claude Toto. Merci pour votre bonne humeur et votre infatigable volonté. Merci aussi à Serge et Oumarou qui m'ont conduit à travers le pays, vous avez aussi largement participé au bon déroulement des missions de terrain. Enfin à Sylvie et Rose pour votre aide pour nos papotages au labo.

À « l'immeuble du lac », j'ai rencontré Seb et Delphine avec qui j'ai découvert l'Afrique et qui sont devenus de grands amis. Merci à Delphine de m'avoir fait découvrir ton pays. Et les autres avec qui j'ai des souvenirs inoubliables, Ced, Maud, Stéphanie et notre escapade à l'Ouest qui s'est fini à 30 km de Yaoundé, le bide total ! Roland pour son accueil à Kribi et ses « débrouilles » pour chaque situation. Fred & Mounas Simard (encore eux), Alain, Virgine, Steph Herder, Michel Boussinesq, François Mouchet, Etienne Gadenne dit « villageois », et toutes les mamans qui cuisinent si bien le poisson braisé... pour les soirées chaleureuses à Yaoundé.

« Les tropiques » de Montferrier est presque un petit bout d'Afrique qu'ont s'est construit au retour de Bouaké. Merci aux potes du « QG » pour ces apéros à rallonge. Vincent et Isabelle Jammoneau, Philippe et Sandrine Solano, Vincent Corbel, Fabrice Chandre, Armelle et Thibaut Martin... et bien sûr Jeannot et Jacquot, pour leur accueil exceptionnel.

Merci aux amis de Montpellier, pour leur soutien pendant ces derniers mois durant la dépression pré-doctorale qui nous atteint presque tous les uns après les autres. À qui le tour ? (merci pour les relectures aussi) Christelle, notre maman poule à tous, Fred, Hélène et ses gaffes, Baptiste pour son enthousiasme, Sandra, p'tite Hélène, Laurent, Joel, Angel, Jeff... Et ceux qui sont plus loin et que je ne vois pas assez souvent : Ingrid, on se voit jamais mais toujours là l'une pour l'autre, Marina, ma pepette au grand cœur, Laure, trashouille à l'eau de rose, Yann, on te croit pas quand tu fais ton méchant, Hervé, si choupinou, Nicolas, tant de choses partagées (pas mon mec s'il te plait ! non mais). Comment vous motiver pour venir à Heidelberg ? ben, y'aura moi, pour le reste, je vois pas...

À mes parents, merci pour votre soutien, vos encouragements, ma grande sœur, Estelle, qui a la bougeotte, on a attrapé ça où ? et ma petite sœur, Alice, si craquante. Et bien sûr, Benoît, je ne te remercierai jamais assez, merci pour ta patience et tes attentions.

Sommaire

Avant-propos	1
Introduction bibliographique	6
CHAPITRE 1 : LE GROUPE FUNESTUS	7
1.1. Classification	7
1.2. Répartition, biologie et rôle vecteur	11
1.3. Identification des membres du groupe <i>Funestus</i>	17
1.4. Identification des espèces et étude de leur biologie pour la lutte	21
CHAPITRE 2 : OUTILS D'ETUDE DE LA STRUCTURATION DES POPULATIONS	23
2.1. Génétique des populations et entomologie	23
2.2. Modèles théoriques	23
2.2.1. Le modèle de Hardy-Weinberg	23
2.2.2. Liaison et déséquilibre de liaison	25
2.2.3. Modèles de structuration des populations	27
2.3. Estimation indirecte de la structuration des populations.....	29
2.4. Outils moléculaires, le choix des microsatellites.....	30
2.4.1. Définition	31
2.4.2. Séquences et distribution génomique	31
2.4.3. Accès au polymorphisme	32
2.4.4. Taux et mécanismes de mutation	32
2.4.5. Modèles de mutation	33
2.4.6. Analyse de la variabilité	33
2.4.7. Problèmes liés à l'utilisation des microsatellites	34
CHAPITRE 3 : POLYMORPHISME D'ANOPHELES FUNESTUS S.S., SUSPICION DE SPECIATION	37
3.1. Formes chromosomiques et formes moléculaires chez <i>An. gambiae s.s.</i>	35
3.2. Polymorphisme d' <i>An.funestus s.s.</i>	40

3.3.	Inversion chromosomiques, adaptation à l'environnement et spéciation	44
	Présentation de l'étude.....	49
	Matériel biologique.....	50
1.	LE CAMEROUN.....	51
1.1.	Présentation générale du pays	51
1.2.	Climat	52
1.3.	Végétation	52
1.4.	Sites de collecte	55
2.	LE SENEGAL.....	58
2.1.	Présentation générale du pays	58
2.2.	Climat	58
2.3.	Végétation	58
2.4.	Sites de collecte	59
3.	METHODES DE CAPTURE.....	60
3.1.	Capture sur volontaires	61
3.2.	Capture par pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide	61
3.3.	Capture à l'aide d'un aspirateur à bouche	61
3.4.	Capture de larves	62
4.	IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE.....	62

Première Partie : Identification des membres du groupe *Funestus* et suivi de transmission palustre.....63

1. Article 1 : Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence of a new species64
2. Article 2 : High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* in a village of savannah-forest transition area in Cameroon.....71

Seconde Partie : Isolement et localisation de marqueurs microsatellites chez *Anopheles funestus* s.s.....85

1. Article 3 : Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*.....86
2. Article 4 : A microsatellite physical map of the african human malaria vector *Anopheles funestus*.....90

Troisième Partie : Structure génétique d'*Anopheles funestus* s.s. au Cameroun et au Sénégal.....105

1. Article 5 : Evidence of gene flow between chromosomal forms of the malaria vector *Anopheles funestus*, in Cameroon, Central Africa.....106
2. Article 6 : Populations structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data.....130

Discussion générale.....	151
1. SYNTHÈSE DES PRINCIPAUX RESULTATS.....	152
1.1. Les espèces du groupe <i>Funestus</i>	152
1.1.1 Validation et amélioration de la technique d'identification des principales espèces du groupe <i>Funestus</i>	152
1.1.2 Rôle prépondérant d' <i>An. funestus</i> dans la transmission du paludisme dans un village en zone de transition savane-forêt	153
1.2. Caractérisation de marqueurs microsatellites chez <i>An. funestus</i> s.s... ..	154
1.2.1. Isolement de loci microsatellites	154
1.2.2. Localisation sur le génome des loci microsatellites	154
1.3. Structure des populations d' <i>An. funestus</i>	155
1.3.1. Cameroun	155
1.3.2. Sénégal	158
2. PERSPECTIVES.....	159
2.1. Identification des espèces du groupe <i>Funestus</i>	159
2.2. Statut taxonomique des formes chromosomiques d' <i>An. funestus</i>	161
2.3. Coévolution d' <i>An. funestus</i> - <i>P. falciparum</i> - <i>Homo sapiens</i>	163
2.4. La transmission et la lutte antivectorielle	165
2.5. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle	166
2.6. Lutte antivectorielle par moustiques génétiquement modifiés	167
2.7. Identification de gènes d'intérêt	170
Références bibliographiques.....	172
Annexes.....	199

Avant-propos

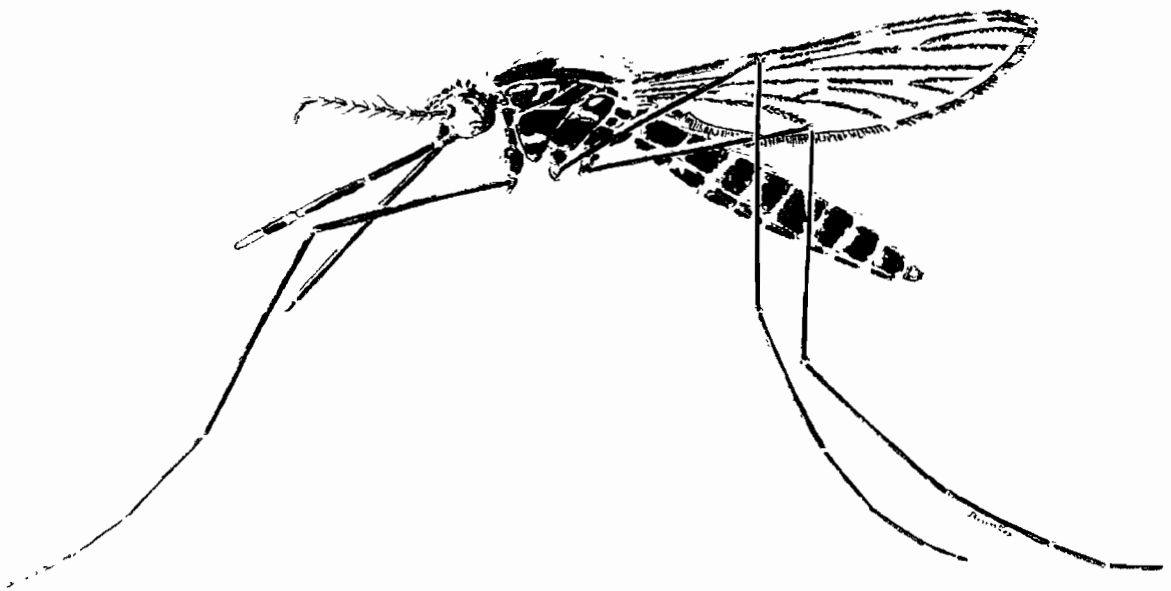


Illustration 1 : Dessin d'*Anopheles funestus* (Jacques Brunhes).

Un siècle après la découverte du rôle vecteur des moustiques dans la transmission du paludisme, la lutte contre ces insectes pour le contrôle de la maladie est encore loin d'être gagnée, et le paludisme demeure la plus grande endémie parasitaire mondiale. Malgré l'absence de statistiques fiables, l'OMS estime l'incidence de la maladie à 300-500 millions de cas cliniques, dont plus de 90% surviennent en Afrique sub-saharienne. Le nombre de victimes est évalué entre 1 et 3 millions par an, essentiellement comptées parmi les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (Collins *et al.*, 2000).

Les 4 espèces du genre *Plasmodium* responsables des paludismes humains sont transmises exclusivement par des moustiques du genre *Anopheles*. Ce genre comprend environ 400 espèces dont une soixantaine sont vectrices. A elles seules, les trois espèces africaines *Anopheles gambiae* Giles, *Anopheles arabiensis* Patton et *Anopheles funestus* Giles sont responsables de la plupart des accès palustres. Toutes les investigations menées sur le rôle vecteur, la systématique et la biologie des vecteurs du paludisme ont montré la complexité du système vectoriel en Afrique. Dans la grande majorité des cas, plusieurs espèces transmettent le parasite en même temps ou de façon alternée au cours de l'année (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Coluzzi, 1984; Fontenille & Lochouart, 1999; Fontenille *et al.*, 1997a; Hamon *et al.*, 1956; Mouchet *et al.*, 1993).

Pour être un vecteur potentiel de plasmodies humaines, un anophèle doit (i) être génétiquement compatible au développement du parasite, (ii) avoir un comportement anthropophile, c'est-à-dire préférer prendre ses repas sanguins sur l'homme, et enfin (iii) avoir une durée de vie adulte suffisante pour permettre la réalisation du cycle sporogonique. Ce dernier point est à la base de stratégies de lutte antivectorielle qui visent à diminuer la taille de la population de vecteurs d'âge épidémiologiquement dangereux par pulvérisation d'insecticides dans les habitations.

La lutte contre le paludisme repose à la fois sur la stérilisation du réservoir humain, par des mesures préventives et chimiothérapeutiques, et sur la diminution des populations de vecteurs, essentiellement par l'utilisation d'insecticides. Cependant, l'apparition et l'expansion rapide de la résistance aux médicaments les moins chers et les plus utilisés contre les parasites responsables du paludisme humain contribuent largement à l'actuelle résurgence de cette endémie (Greenwood & Mutabingwa, 2002). La mortalité a doublé en Afrique au cours des 25 dernières années et le paludisme est réapparu dans des zones où il était maîtrisé et même éradiqué (Trape *et al.*, 2002). Par ailleurs, quelques rares exemples d'éradication des

vecteurs existent : *An. gambiae* a été éradiqué au Brésil après une introduction accidentelle qui fut à l'origine d'une épidémie de paludisme (Soper, 1943) ; en Sardaigne le vecteur endémique *Anopheles labranchiae* Falleroni a été quasiment éliminé, faisant ainsi chuter le nombre de cas de paludisme (Logan, 1953). Cependant, les nombreux programmes d'éradication des moustiques lancés depuis les années 1950 ont le plus souvent échoué en Afrique sub-saharienne en raison d'une transmission stable, de la complexité des cycles de transmission et d'une connaissance imparfaite de la biologie, de l'écologie et de la systématique des vecteurs. De plus, l'apparition de phénomènes de résistance aux insecticides a entravé de nombreux programmes de lutte chimique (Gwadz, 1996). Actuellement, la stratégie de lutte antivectorielle s'attache plutôt à limiter l'accès du vecteur à l'hôte par utilisation de moustiquaires imprégnées et certaines études montrent une baisse significative de la mortalité due au paludisme grâce à cette technique (d'Alessandro *et al.*, 1995; Greenwood, 1997).

Aujourd'hui, après le séquençage complet du génome d'*An. gambiae* (Holt *et al.*, 2002), une stratégie de lutte génétique est envisagée. Elle consiste en une modification génétique de l'aptitude des populations vectrices à permettre le développement des parasites (Collins & Besansky, 1994; James *et al.*, 1999; Morel, 2002). Pour être efficace, une telle approche nécessiterait, une fois les gènes d'intérêt identifiés, leur transgénèse et leur expression maîtrisées, d'une part que la modification ou l'introduction de ces gènes ne diminue pas la valeur adaptative des populations rendues réfractaires et d'autre part que les gènes d'intérêt diffusent dans les différentes populations naturelles (Collins *et al.*, 1994).

Toutes les stratégies de contrôle des vecteurs, par utilisation d'insecticides ou par moustiques génétiquement modifiés, nécessitent donc de prendre en compte les hétérogénéités du système vectoriel. Il est aujourd'hui largement admis qu'une stratégie de lutte antivectorielle ne sera efficace à long terme sur le taux de mortalité palustre qu'à la condition d'une connaissance approfondie des cycles de transmission, de la biologie et de l'écologie des vecteurs. La caractérisation des populations de vecteurs en terme d'unités reproductives est donc une étape fondamentale au développement de stratégies de contrôle vectoriel. En effet, elle peut mettre en évidence des populations dont la biologie et le rôle vecteur sont différents. La compréhension des flux de gènes dans les populations naturelles est également déterminante pour définir comment des gènes introduits pour limiter la susceptibilité au parasite ou des gènes de résistance aux insecticides vont se répandre dans les populations naturelles.

Dans cette optique, nous avons entrepris une étude sur l'identification, la biologie et la génétique des populations d'*An. funestus sensu stricto* (Illustration 1), espèce longtemps négligée par rapport aux membres du complexe *An. gambiae*, et ce malgré son rôle majeur dans la transmission du paludisme.

Au cours de l'introduction, nous allons dans un premier temps exposer l'état des connaissances sur le groupe *Funestus*, les différentes espèces qui le composent et leur rôle dans la transmission (Chapitre 1). Nous présenterons ensuite les outils techniques et les modèles mathématiques utilisés pour l'étude de la variabilité génétique (Chapitre 2). Enfin, nous terminerons par une présentation des données disponibles sur la structure génétique des populations au sein d'*An. funestus s.s.* (Chapitre 3) afin de préciser les objectifs de nos travaux, qui seront présentés dans les parties I à III.

Introduction bibliographique

CHAPITRE 1 : LE GROUPE FUNESTUS

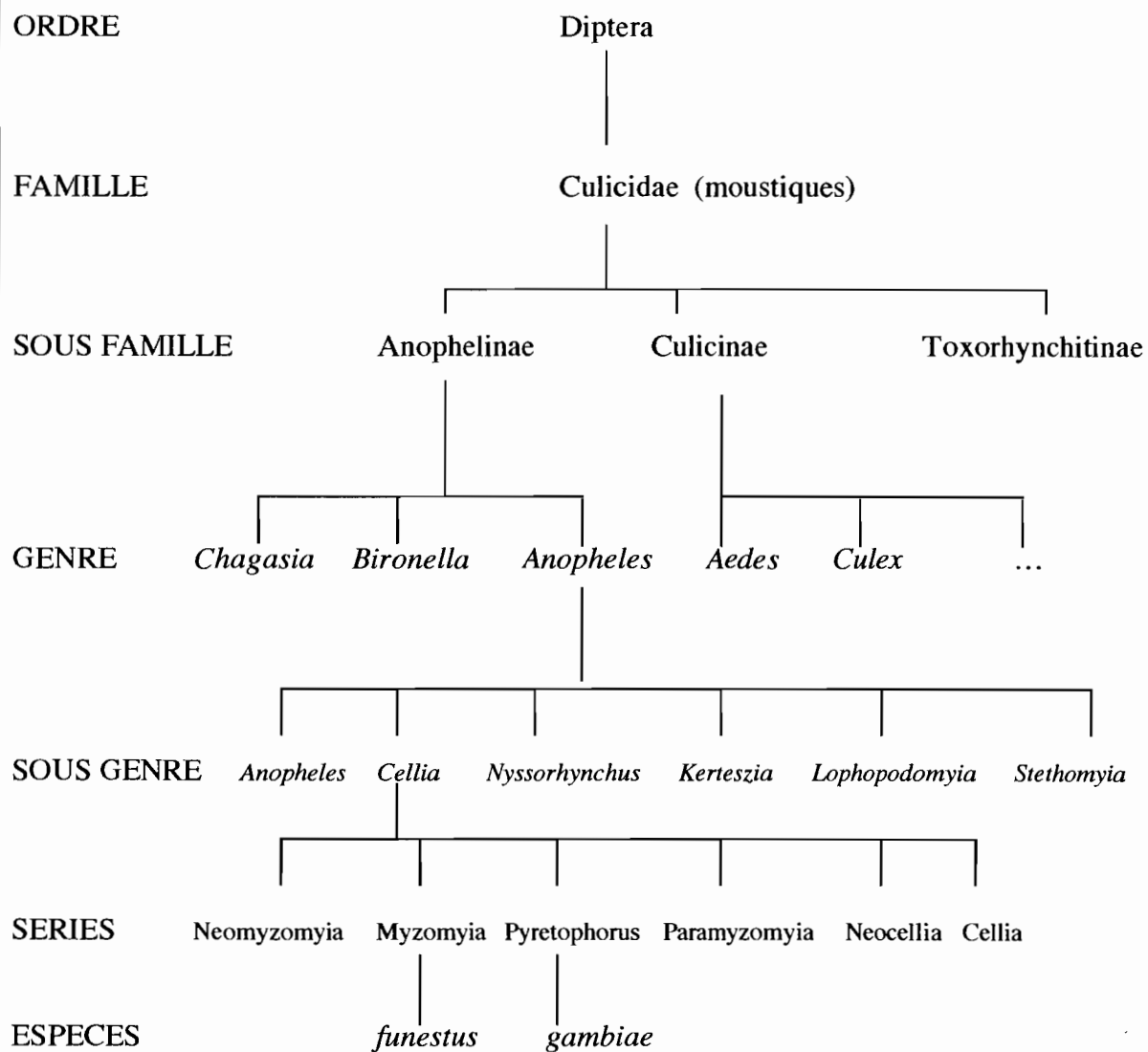
1.1. Classification :

Le groupe *Funestus* appartient, comme tous les vecteurs du paludisme, au genre *Anopheles*, membre de la famille des Culicidae qui regroupe l'ensemble des insectes diptères appelés moustiques (Encadré 1). Le genre *Anopheles* compte dans le monde plus de 400 espèces dont une soixantaine est capable de transmettre les *Plasmodium* humains et une vingtaine est considérée comme vecteur majeur du paludisme. En 1994, Harbach a présenté une classification des anophèles, avec 6 sous-genres (définis selon des critères morphologiques), dont les plus importants, *Anopheles*, *Cellia* et *Nyssorhynchus*, sont subdivisés en différentes catégories taxonomiques informelles : sections, séries, sous-séries, groupes, sous-groupes et complexes, selon des critères morphologiques et de répartition géographique (la notion de groupe et de complexe d'espèces est discutée dans l'encadré 2). *An. funestus* se situe dans le sous-genre *Cellia* et la série *Myzomyia*. Le célèbre *An. gambiae* se situe dans le même sous genre, mais dans la série *Pyretophorus* (Harbach, 1994).

L'intérêt de l'étude du groupe *Funestus* est principalement lié à l'une des espèces qu'il comprend, *An. funestus s.s.*, largement impliquée dans la transmission du paludisme. Le groupe *Funestus* est composé d'espèces morphologiquement proches mais différenciables à un stade de leur développement sur des critères morphologiques discrets. Il comporte 8 à 10 espèces : *An. funestus s.s.*, *Anopheles parensis* Gillies, *Anopheles aruni* Solti, *Anopheles vaneedeni* Gillies & Coetzee, *Anopheles rivulorum* Leeson, *Anopheles brucei* Service, *Anopheles confusus* Evans and Leeson, *Anopheles fuscivenosus* Leeson, et éventuellement *An. lesoni* Evans et *An. fluviatilis* James (Encadré 3).

Encadré 1 : Classification des anophèles :

(Knight & Stone, 1977; Gillies & Coetzee, 1987; Harbach, 1994)

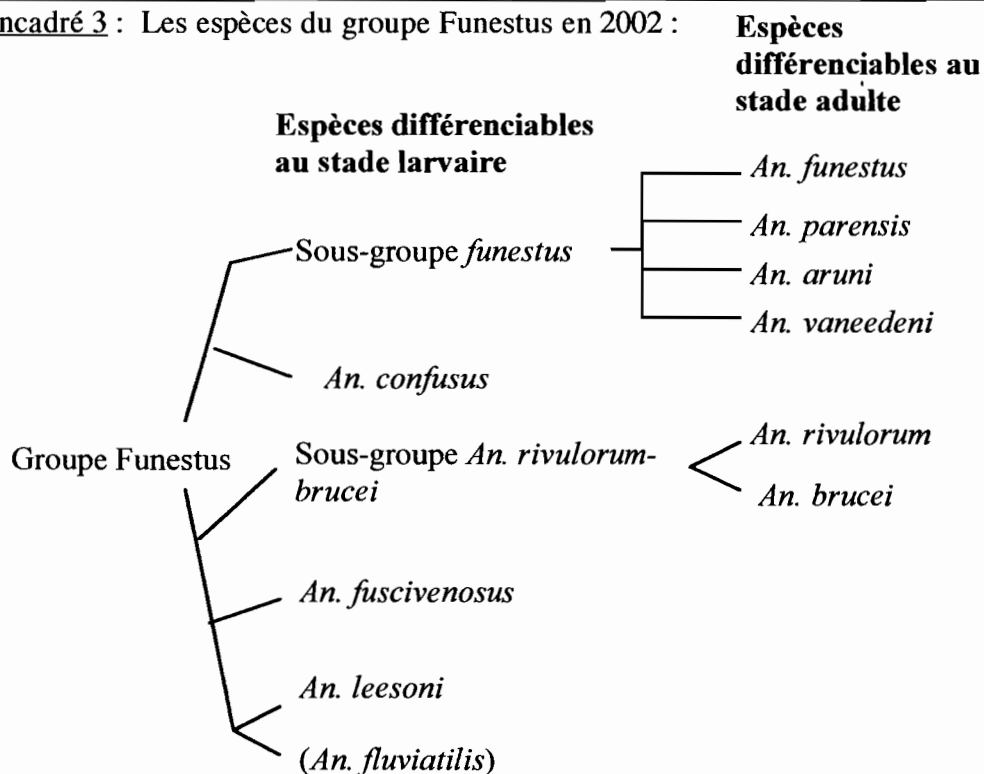


La classification de *An. lesoni* et *An. fluviatilis* n'est pas clairement établie. La même année, en 1968, sur des critères morphologiques, Reid (1968) classe *An. lesoni* et *An. fluviatilis* dans le groupe Minimus alors que Gillies et De Meillon (1968) les classent dans le groupe Funestus. Plus tard, l'analyse des arrangements chromosomiques montre plus de similitudes de *An. lesoni* et *An. fluviatilis* avec les espèces asiatiques qu'avec les espèces africaines du groupe Funestus. Green (1982) et Pape (1992) les classent donc dans le groupe asiatique Minimus. Cependant, Harrison (1980) souligne que le groupe Funestus et le groupe Minimus contiennent des espèces si proches qu'ils sont considérés comme distincts principalement à cause de leur répartition géographique et du fait que très peu d'études s'intéressent simultanément aux anophèles africains et asiatiques. Les classifications les plus récentes sont encore contradictoires avec Gillies et Coetzee (1987) qui considèrent *An. lesoni* et *An. fluviatilis* comme des membres du groupe Funestus, alors qu'Harbach (1994) les classe dans le groupe Minimus. En pratique, il se trouve que l'ensemble des publications sur le groupe Funestus inclut *An. lesoni* en raison de sa répartition sur l'ensemble de l'Afrique subsaharienne. *An. fluviatilis* est plus souvent ignoré, en raison de sa distribution plus localisée et à la limite de l'Afrique et l'Asie (Arabie Saoudite, Yémen) et cette espèce est donc incluse par défaut dans le groupe Minimus.

Encadré 2 : Notion de groupe d'espèces et de complexe d'espèces :

La notion originale de l'espèce, donnée par Cuvier au début du XIX siècle était « Une collection de tous les corps organiques nés les uns des autres ou de parents communs et de ceux qui leur ressemblent ». La notion d'interfécondité était déjà présente, mais l'identification de l'espèce était basée sur la morphologie. De nos jours, on considère la définition de l'espèce au sens biologique donné par Mayr (1942) : « une espèce est un groupe de populations naturelles réellement ou potentiellement interfécondes, isolées du point de vue reproductif des autres groupes équivalents ». Des espèces peuvent donc être identifiées au-delà des critères morphologiques, grâce à l'étude de la biologie, des chromosomes et de l'ADN. Il a été ainsi montré, en l'occurrence pour *An. gambiae* et *An. maculipennis*, que plusieurs espèces pouvaient être rattachées à la même forme morphologique. C'est ce qu'on appelle un **complexe d'espèces** (Reid, 1968; Reid & Knight, 1961).

La notion de **groupe d'espèces** réfère à des espèces très proches morphologiquement mais qui présentent de petites différences à un stade au moins de leur développement (Harbach, 1994). *An. funestus* constitue donc un groupe d'espèces. Les nomenclatures « groupe *An. funestus* » et « groupe Funestus » sont indifféremment utilisées dans la littérature.

Encadré 3 : Les espèces du groupe Funestus en 2002 :

1.2. Répartition, biologie et rôle vecteur :

Les membres du groupe *Funestus*, possèdent les caractères biologiques communs à l'ensemble des espèces de ce genre *Anopheles* (Encadré 4). Cependant chaque espèce possède des caractéristiques comportementales et écologiques qui lui sont propres. Les espèces sont plus ou moins liées à l'homme aux niveaux écologique et comportemental, ce qui a des conséquences en termes de transmission palustre.

An. funestus s.s. est l'espèce la plus importante du groupe *Funestus* en tant qu'espèce vectrice.

- **Sa distribution** est très large, on trouve en effet *An. funestus* dans toute l'Afrique subsaharienne : au Nord on l'a signalé jusqu'au fleuve Niger, dans la région de Tombouctou au Mali et à l'Est en Ethiopie, à Madagascar et dans les îles Comores. L'espèce peut également vivre à des altitudes élevées, elle a été trouvée à plus de 2000 m d'altitude en Ethiopie (Gillies & De Meillon, 1968).
- **Le gîte larvaire** caractéristique d'*An. funestus* est une étendue d'eau claire assez large, permanente ou semi-permanente avec une végétation émergente haute de quelques dizaines de centimètres et ombrageant la surface de l'eau (Evans, 1938). Il peut s'agir de diverses retenues d'eau, bordures de lacs ou rivières à faible débit, canaux d'irrigation de rizières et parfois les rizières elles-mêmes (Illustration 2).

Les larves préfèrent les gîtes ombragés et ne peuvent survivre, comme *An. gambiae*, dans des gîtes complètement exposés à la lumière solaire. La salinité de l'eau doit être faible, le plus souvent inférieure à 0.3 % de NaCl. Les températures extrêmes testées en laboratoire sont de 17°C et 39°C (Jepson *et al.*, 1947). Un autre facteur limitant est la nature des pluies, les larves d'*An. funestus* supportent en effet mal les pluies violentes qui peuvent totalement inhiber leur développement (De Meillon, 1936).

Les larves d'*An. funestus* sont connues pour être difficilement trouvées et le sont toujours à une faible densité. Ceci peut être dû à leur tendance à rester longtemps immergées par rapport aux autres espèces anophéliennes (Gillies & De Meillon, 1968).

Encadré 4 : Biologie des anophèles :

(Gilles & Warrell, 1980; Rodhain & Perez, 1985)

Le cycle de vie des anophèles est ponctué de métamorphoses complètes permettant le passage d'un stade de développement à l'autre : œuf, larve, nymphe et imago.

Les trois premiers stades sont aquatiques et le type du gîte aquatique constitue une caractéristique essentielle de la biologie de chaque espèce (mouvement de l'eau, salinité, ensoleillement, taille, caractère permanent ou temporaire, végétation...). Les 200 à 300 œufs pondus par une femelle, munis de flotteurs latéraux, sont déposés isolément à la surface de l'eau. Les œufs éclosent généralement dans les 2 ou 3 jours qui suivent la ponte, ils sont sensibles à la dessiccation et ne peuvent survivre que quelques jours.

Les **larves**, sans siphon, vivent surtout à la surface de l'eau et les brosses buccales drainent vers la bouche les particules alimentaires. L'état larvaire se divise en 4 stades séparés par des mues. Au total, le développement larvaire dure de 8 à 30 jours selon l'espèce mais aussi les conditions environnementales.

A l'issue du quatrième stade larvaire, une mue transforme l'insecte en **nymphe**. Le stade nymphal, d'une durée en général inférieure à 2 jours, est le stade de transition de l'état aquatique à l'état aérien. L'insecte subit donc une transformation très importante qui aboutit à l'émergence de l'**adulte**.

La fécondation a lieu dans les heures ou les jours qui suivent l'émergence des adultes, les mâles forment des essaims dans lesquels les femelles sont fécondées le plus souvent une seule fois. Les spermatozoïdes sont stockés dans une spermathèque et féconderont les ovocytes lors de leur passage dans l'oviducte. Chez les adultes, les mâles et les femelles présentent des biologies très différentes : les mâles se nourrissent de jus sucrés, ont une durée de vie courte et une capacité de dispersion limitée. Les femelles, qui ont une durée de vie adulte pouvant atteindre un mois, sont hématophages : une fois fécondées, elles cherchent, durant la nuit, à se nourrir sur un hôte vertébré en fonction de leurs préférences trophiques. Le repas de sang conditionne la maturation des ovocytes jusqu'à la ponte. La succession des événements, recherche de l'hôte, prise du repas sanguin, digestion du sang et développement concomitant des ovocytes jusqu'à la ponte définit le cycle gonotrophique. La durée de ce cycle est relativement constante pour une espèce donnée et est de 2 ou 3 jours pour les vecteurs africains.

- **Le cycle de vie** d'*An. funestus* est assez long avec un temps de développement de l'œuf à l'adulte d'environ 21 jours. Le temps de génération est de 3 semaines minimum et peut atteindre plus d'un mois (Gillies & De Meillon, 1968).
- **La densité** de l'espèce est le plus souvent variable au cours de l'année. Typiquement le pic d'abondance est atteint en début de saison sèche. En savane où la pluie est limitée à une seule période dans l'année, le pic est unique et marqué (Cavalié & Mouchet, 1961; Dia *et al.*, 2003; Hamon, 1963; Hamon *et al.*, 1956). En région équatoriale, où deux saisons des pluies ont lieu, la variation de densité d'*An. funestus* au cours de l'année existe mais est moins marquée (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002).
- **La capacité de dispersion** des adultes est mal connue mais les estimations par lâchers de moustiques marqués indiquent des distances plutôt élevées pour des anophèles : de 3 à 7 km (Gillies & De Meillon, 1968). Cependant, la nature des gîtes larvaires, le plus souvent dispersés, et la lente recolonisation de zones traitées par insecticides après l'arrêt des campagnes de lutte (Fontenille & Rakotoarivony, 1988) suggèrent que *An. funestus* peut être subdivisé en populations discrètes (Molineaux & Gramiccia, 1980).
- **Le comportement trophique** des femelles est très étroitement lié à l'homme. C'est en effet l'hôte privilégié, même en présence d'hôtes alternatifs en abondance, comme des troupeaux de bovins. Le taux d'anthropophilie est le plus souvent supérieur à 90% (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Dia *et al.*, 2003; Gillies & De Meillon, 1968; Lochouart *et al.*, 1998; Mbogo *et al.*, 1993). Le repas sanguin est préférentiellement pris à l'intérieur des habitations (caractère endophage), durant la seconde partie de la nuit, et surtout au cours de l'heure précédant le lever du soleil (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Smith, 1955).
- Parallèlement à son comportement anthropophile, *An. funestus* montre une adaptation très étroite à l'**habitat humain** qui est son lieu de repos privilégié après le repas sanguin. Ce caractère endophile rend l'espèce très vulnérable en cas d'aspersion d'insecticides dans les habitations. Cependant, des cas de résistance aux insecticides ont été signalés : au Bénin, au Cameroun, au Ghana, au Kenya, au Mali



Lac artificiel,
Tibati, Cameroun



Retenue d'eau créée par une route,
Bankim, Cameroun



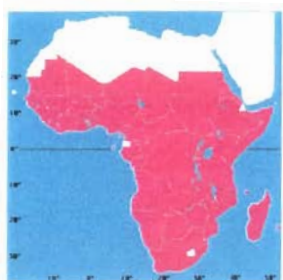
Canal d'irrigation de rizière,
Lagdo, Cameroun

Illustration 2 : Exemples de gîtes larvaires d'*An. funestus* s.s.

et au Nigéria, une résistance partielle à la dieldrine a été reportée (Brown, 1986) ; au Mali des spécimens ont été trouvés résistants au DDT, au malathion et au fenitrothion (Toure, 1982), et en Afrique du Sud et au Mozambique aux pyréthrinoïdes (Brooke *et al.*, 2001; Hargreaves *et al.*, 2000). La résistance aux pyréthrinoïdes serait liée à une augmentation de l'activité des fonctions oxydases et suggérerait une résistance croisée avec les insecticides de la famille des carbamates (Brooke *et al.*, 2001).

- *An. funestus* est une des principales espèces vectrices du paludisme en Afrique avec les espèces jumelles *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Son rôle dans la transmission varie selon les régions et les saisons, elle peut avoir parfois un rôle secondaire (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Fontenille *et al.*, 1997b), mais a souvent un rôle majeur (Charlwood *et al.*, 1998; Coene, 1993; Elissa *et al.*, 1999; Fontenille *et al.*, 1997a; Mendis *et al.*, 2000; Shililu *et al.*, 1998; Temu *et al.*, 1998). Dans certaines régions, du fait de son pic d'abondance au début de la saison sèche, elle prend le relais de la transmission après *An. gambiae* et prolonge ou même stabilise la transmission palustre au cours de l'année (Dia *et al.*, 2003; Elissa *et al.*, 1999; Fontenille *et al.*, 1997a). Le pourcentage de moustiques infectants testés par dissection de glandes salivaires ou par détection de la CSP (CircumSporozoïte Protein) par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est variable, mais il se situe souvent entre 3 et 5% (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Dia *et al.*, 2003; Fontenille *et al.*, 1997a; Gillies & De Meillon, 1968; Lochouarn *et al.*, 1998), localement il peut être supérieur au taux d'infectivité d'*An. gambiae* (Charlwood *et al.*, 1998; Elissa *et al.*, 1999; Fontenille *et al.*, 1997a). La plupart des infections sont dues à *P. falciparum*, mais *An. funestus* peut également transmettre *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* (Fontenille *et al.*, 1997a; Lochouarn *et al.*, 1998; Severini *et al.*, 1990a, 1990b). *An. funestus* est également impliqué dans la transmission de *Wuchereria bancrofti*, agent de la filariose lymphatique, avec des taux d'infections dans la tête et le proboscis de l'ordre de 1% (Kartman *et al.*, 1947; Krafusur & Garrett-Jones, 1977) et son rôle prépondérant a été démontré lors de l'épidémie de fièvre O nyong-nyong en Ouganda en 1959 (Haddow *et al.*, 1960).

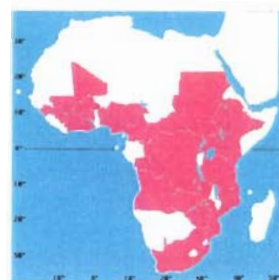
An. funestus



An. rivulorum



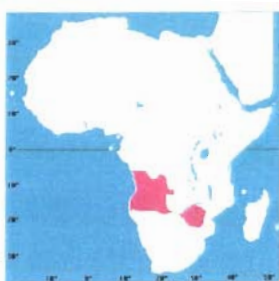
An. lesoni



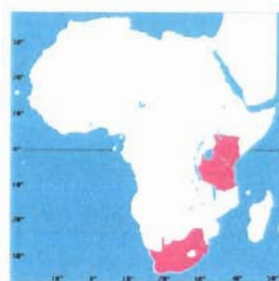
An. confusus



An. fuscivenosus



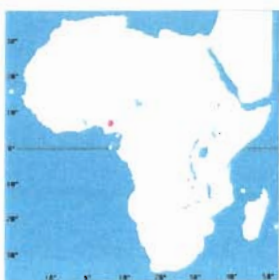
An. parensis



An. vaneedeni



An. brucei



An. aruni



Illustration 3 : Répartition géographique des espèces du groupe Funestus, d'après Hervy *et al.* (1998), fond de carte de Geoatlas®

Les autres espèces du groupe *Funestus* sont d'une importance bien moindre en termes d'entomologie médicale, en raison de leur comportement beaucoup moins lié à l'homme par rapport à *An. funestus s.s.*. Ce sont en effet des espèces qui se nourrissent préférentiellement sur des animaux et sont exophiles. Pour *An. rivulorum* seulement, un rôle vecteur secondaire dans la transmission du paludisme a été montré (Wilkes *et al.*, 1996). *An. vaneedeni* a été expérimentalement infecté en laboratoire (De Meillon *et al.*, 1977), mais son implication dans la transmission du paludisme en conditions naturelles n'a jamais été montrée. Les distributions géographiques des différentes espèces du groupe sont représentées par l'illustration 3.

1.3. Identification des membres du groupe *Funestus* :

Les premiers critères d'identification des espèces du groupe *Funestus* étaient morphologiques. *An. confusus*, *An. fuscivenosus*, *An. lesoni*, *An. fluviatilis*, le sous-groupe *An. rivulorum-brucei* et le sous-groupe *An. funestus* sont différenciables au stade larvaire alors que les membres des sous-groupes : *An. funestus s.s.*, *An. parensis*, *An. aruni*, *An. vaneedeni* d'une part, *An. rivulorum* et *An. brucei* d'autre part sont distinguables au stade imaginal (Encadré 3). Les critères morphologiques permettant d'identifier ces espèces sont discrets et parfois difficiles à observer, d'autant plus qu'ils n'existent qu'à un stade de développement du moustique empêchant ainsi une identification simple de tous les individus collectés.

Par la suite, de nouvelles techniques ont été utilisées pour identifier les membres du groupe *Funestus*. En 1982, une étude de cytogénétique (la technique est présentée dans l'encadré 5) montre que *An. funestus*, *An. rivulorum*, *An. lesoni*, *An. parensis* et *An. confusus* possèdent des inversions chromosomiques fixées caractéristiques de leur espèce permettant donc de les identifier (Green, 1982). *An. vaneedeni* possède une inversion qui lui est spécifique mais qui n'est pas fixée, les spécimens de cette espèce ne sont donc pas toujours identifiables par la technique cytogénétique. Cette technique présente aussi d'autres inconvénients : en effet, comme les chromosomes polytènes se trouvent chez les femelles semi-gravides, tous les spécimens ne peuvent être identifiés ; de plus la lecture des inversions chromosomiques demande une grande expertise et est très fastidieuse. Plus récemment, des techniques moléculaires ont été développées pour tenter de simplifier l'identification des membres du groupe *Funestus*.

Encadré 5 : Identification d'espèces par cytogénétique :

Dans les cellules nourricières des ovaires de femelles semi-gravidés des anophèles, se trouvent des chromosomes géants issus de mitoses sans division cellulaire. Dans le complexe *An. gambiae*, de tels chromosomes peuvent également être obtenus à partir des glandes salivaires de larves de stade IV. Ces chromosomes dits « polytènes » présentent une succession de bandes sombres et claires (Illustration 4). Dans certaines populations ou espèces, le profil des bandes chromosomiques présente des inversions de fragments de bras chromosomiques. Ces inversions, quand elles sont fixées dans une espèce, peuvent servir de marqueur de l'espèce (Green, 1970, 1971, 1972).



Illustration 4 : Chromosome 2 d'*An. funestus* (Photographie d'Ibrahima Dia)

Encadré 6 : Identification d'espèces par SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) :

La technique est basée sur le comportement électrophorétique de fragments d'ADN simples brins en gel d'acrylamide non dénaturant. Selon la séquence de l'ADN simple brin, des structures secondaires peuvent se former et donner une conformation caractéristique au fragment (Orita *et al.*, 1989). Une différence de séquence, même minime comme une mutation ponctuelle, peut engendrer une différence de conformation qui va entraîner une différence de migration lors de l'électrophorèse. Les profils obtenus peuvent ainsi être caractéristiques d'espèces.

Cette technique très simple sur le principe comporte cependant des inconvénients d'un point de vue pratique. De très faibles variations des conditions d'électrophorèse peuvent rendre la migration peu reproductible et toutes les mutations n'engendrent pas de différence de conformation, elles ne sont donc pas toutes détectables.

Koekemoer *et al.* (1999) ont mis au point un test SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) (technique présentée dans l'encadré 6) capable de distinguer *An. funestus*, *An. rivulorum*, *An. vaneedeni* et *An. lesoni*. Cette technique basée sur la variabilité interspécifique de la séquence D3 de l'ADN ribosomal ne permet pas de différencier *An. vaneedeni* et *An. parensis* (Koekemoer *et al.*, 1999).

Enfin, depuis 2002, un test par PCR multiplexe permet l'identification des 5 espèces du groupe *Funestus* les plus fréquemment trouvées (Koekemoer *et al.*, 2002) : *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. rivulorum*, *An. lesoni* et *An. parensis* (technique détaillée dans l'encadré 7). Ce test, simple et rapide, permet l'identification de tous les spécimens, quel que soit leur stade de développement. Il est basé sur les variations nucléotidiques inter-spécifiques de la région ITS2 (Internal non-coding Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal. L'ADN ribosomal, est composé d'unités répétées en tandem, chaque unité comporte la séquence des gènes codant pour les sous-unités 18S, 5,8S et 28S du ribosome. Ces séquences sont séparées de régions non codantes, les ITS1 et ITS2. Les unités répétées sont séparées des séquences IGS (InterGenic Spacer), non transcrites. Généralement, au sein d'une même espèce, les différentes répétitions de l'ADN ribosomal sont homogénéisées par un phénomène d'évolution concertée. Les régions codantes sont très conservées d'une espèce à l'autre, mais les « spacer » sont très variables même entre espèces proches. Les séquences variables peuvent être amplifiées grâce à des amorces hybridant dans les régions conservées, et qui peuvent être déterminées sans aucune information préalable sur les séquences (Figure 1).

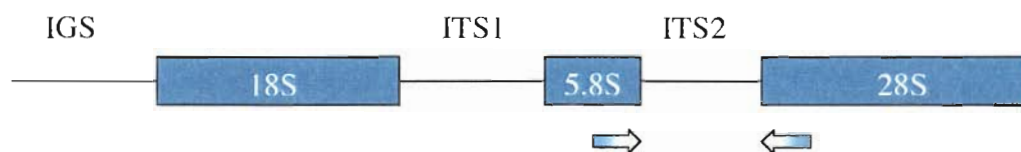


Figure 1 : Schéma de la structure de l'ADN ribosomal. Les blocs bleus représentent les régions codantes conservées sur lesquelles s'hybrident les amorces qui amplifient les régions non codantes variables.

Encadré 7 : PCR multiplexe spécifique d'espèces du groupe Funestus :

La technique est basée sur des différences nucléotidiques inter-espèces. Dans le cas de la PCR d'identification des espèces du groupe Funestus (Koekemoer *et al.*, 2002), la séquence utilisée est l'Internal non-coding Transcribed Spacer 2 (ITS2) de l'ADN ribosomal. Une amorce « sens » commune à toutes les espèces est choisie dans une région conservée et l'élongation « antisens » est assurée grâce à des amorces capables de s'hybrider sur la séquence de manière spécifique. Toutes les amorces peuvent être mélangées au cours de l'amplification PCR et seule l'amorce antisens spécifique au spécimen testé pourra assurer l'amplification. Pour chaque espèce, le fragment amplifié a une taille caractéristique et permet donc son identification (Figure 2).

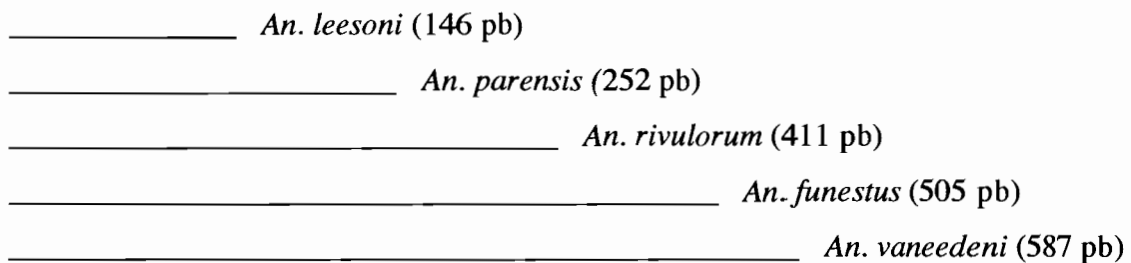
Fragment ITS2**Fragments amplifiés par PCR :**

Figure 2 : Schéma d'amplification des fragments PCR diagnostics des espèces du groupe Funestus.

Les séquences de l'ADN ribosomal sont donc devenues un outil largement utilisé pour développer des tests diagnostics d'espèces (Collins & Paskewitz, 1996) ainsi que pour effectuer des études de phylogénie. Des PCR diagnostiques basées sur les variations de séquences de l'ADN ribosomal sont par exemple disponibles pour différents complexes d'anophèles (Beebe & Saul, 1995; Cornel *et al.*, 1996; Kengne *et al.*, 2003; Proft *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1993). Cependant pour le groupe *Funestus*, le test a été mis au point à partir de séquences ITS2 de spécimens collectés en Afrique orientale et australe. Pour les espèces dont les aires de répartition sont plus larges, comme *An. funestus*, *An. rivulorum* et *An. lesoni*, il est nécessaire de valider le test PCR sur des spécimens provenant de différentes régions africaines. Ceci est particulièrement important pour *An. rivulorum*. En effet, Hackett *et al.* ont montré un haut niveau de divergence génétique entre les *An. rivulorum* d'Afrique de l'Est et Afrique de l'Ouest, qui suggère l'existence de deux espèces (Hackett *et al.*, 2000).

1.4. Identification des espèces et étude de leur biologie pour la lutte :

Reconnaître les espèces dans un complexe d'espèces d'anophèles n'est pas uniquement un exercice académique de taxonomiste : de nombreux travaux ont déjà montré que deux espèces proches ou identiques morphologiquement pouvaient différer grandement en termes de capacité vectorielle et de biologie. La reconnaissance des espèces est fondamentale pour mesurer le rôle joué par chaque espèce dans la transmission, en particulier en zone de sympatrie et pour lutter contre les bonnes cibles lors de campagnes de lutte antivectorielle. Certains exemples mettent clairement en évidence la nécessité de l'identification correcte des espèces : suite à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides dans la région du Nord Transvaal, en Afrique du Sud, des adultes identifiés dans un premier temps comme étant *An. funestus* étaient retrouvés dans les habitations. Ceci laissait supposer un échec de la lutte antivectorielle, mais après un examen attentif des adultes, il a été déterminé qu'il s'agissait d'*An. vaneedeni*, espèce non vectrice ; l'utilisation d'insecticides alternatifs n'était donc pas nécessaire (De Meillon *et al.*, 1977). Plus récemment, il a été montré que les spécimens du groupe *Funestus* trouvés dans les habitations dans une région du Kenya sont presque exclusivement des *An. parensis*, non vecteurs (Kamau *et al.*, 2003a). Les stratégies de lutte antivectorielle doivent donc tenir compte de telles situations pour ne pas lutter inutilement contre les mauvaises cibles et favoriser le phénomène de résistance aux insecticides en les utilisant de manière inadéquate.

CHAPITRE 2 : OUTILS D'ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS

2.1. Génétique des populations et entomologie :

La connaissance de la structure génétique des populations de vecteurs peut aider à comprendre l'épidémiologie d'une maladie à transmission vectorielle. En effet, des populations génétiquement isolées dont la biologie et la capacité vectorielle seraient différentes peuvent exister et leur mise en évidence serait une avancée majeure dans la compréhension de la transmission de la maladie. Les flux de gènes entre populations peuvent faciliter l'expansion d'un gène d'intérêt (gène responsable du caractère réfractaire à l'infection par le parasite par exemple) ou d'un gène de résistance à un insecticide et leur analyse devient nécessaire pour assurer le succès de campagnes de lutte antivectorielle et prédire les risques épidémiologiques.

De telles problématiques peuvent être abordées à l'aide de la génétique des populations. Cet outil permet de connaître la variabilité génétique dans et entre populations et d'estimer les forces qui régissent sa modification. Les observations issues des populations naturelles seront, pour cela, confrontées aux modèles mathématiques théoriques et les paramètres caractéristiques de la structuration des populations pourront être mesurés.

2.2. Modèles théoriques (Hartl, 1994) :

2.2.1. Le modèle de Hardy-Weinberg :

- Définition :

Le modèle de Hardy-Weinberg repose sur plusieurs hypothèses :

- le mode de reproduction est panmictique : la probabilité qu'un individu se croise avec un autre individu d'un génotype donné est égale à la fréquence de ce génotype dans la population,
- l'organisme considéré est diploïde,
- la reproduction est sexuée,

- les générations sont non chevauchantes,
- la taille de la population est très grande,
- on peut ignorer les mutations,
- la population est fermée (ni immigration, ni émigration),
- la sélection naturelle n'a pas d'effet sur les allèles considérés.

Sous ces hypothèses, le modèle de Hardy-Weinberg permet de calculer les fréquences génotypiques à partir des fréquences alléliques. La loi énonce en effet que dans des conditions stables, les fréquences des allèles à un locus donné restent constantes, de la même manière que les fréquences génotypiques qui y sont liées.

Si l'on considère un locus à deux allèles A et a de fréquences p et q respectives, la loi de ségrégation de Mendel établit que les gamètes vont porter l'allèle A avec une probabilité p et l'allèle a avec une probabilité q.

La constitution génotypique de la population est déterminée par la constitution allélique (Tableau 1).

		Gamètes femelles	
		A (p)	a (q)
Gamètes mâles	A (p)	AA (p^2)	Aa (pq)
	a (q)	aA (qp)	aa (q^2)

Tableau 1 : Génotypes et fréquences associées (entre parenthèses) pour des croisements au hasard dans le cas d'un locus à deux allèles.

Les fréquences génotypiques pour les AA, Aa et aa sont donc respectivement : p^2 , $2pq$ et q^2 .

Si cette constitution génotypique n'est pas modifiée au cours des générations, la population est dite à l'**équilibre de Hardy-Weinberg**.

- Les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg :

La relation entre fréquence allélique et fréquence génotypique décrite par la loi de Hardy-Weinberg est vraie quand il y a panmixie. Les phénomènes de dérive, mutation,

migration et sélection peuvent modifier la fréquence allélique mais dans ce cas les fréquences génotypiques seront modifiées en conséquence dès la génération suivante.

Les déviations à l'équilibre de Hardy-Weinberg peuvent donc être dues soit au **système de reproduction** (autofécondation, consanguinité, homogamie, autogamie...) soit à l'**effet Wahlund** (rassemblement de populations différenciées). L'effet Wahlund peut provenir de la difficulté même de définir l'entité qu'est la population. En effet, si on définit une population comme la plus grande entité où les croisements se font au hasard entre individus, il n'est pas évident de pouvoir la repérer sur le terrain, et donc d'être sûr d'échantillonner une seule population. Si l'échantillon considéré comprend plusieurs sous-populations, éventuellement panmictiques, dans lesquelles les fréquences alléliques sont différentes, des déficits d'hétérozygotes peuvent apparaître.

2.2.2. Liaison et déséquilibre de liaison :

- Définition :

Le déséquilibre de liaison est l'association non aléatoire d'allèles à différents loci. Si les allèles A1 et A2 de fréquence p_1 et p_2 respectivement d'un locus A (avec $p_1 + p_2 = 1$) sont associés de façon aléatoire avec les allèles B1 et B2 de fréquences q_1 et q_2 d'un locus B (avec $q_1 + q_2 = 1$), les associations gamétiques attendues vont être telles que la fréquence d'un gamète portant une combinaison particulière d'allèles est égale au produit des fréquences de ces allèles (Tableau 2).

		Allèles au locus A	
		A1 (p_1)	A2 (p_2)
Allèles au locus B	B1 (q_1)	A1B1 (p_1q_1)	A2B1 (p_2q_1)
	B2 (q_2)	A1B2 (p_1q_2)	A2B2 (p_2q_2)

Tableau 2 : Association gamétique entre deux allèles de deux loci différents (fréquences entre parenthèses), montrant les fréquences gamétiques attendues quand les allèles sont en équilibre de liaison.

Si les allèles des loci ne s'associent pas au hasard, c'est à dire que certaines associations d'allèles sont sur ou sous-représentées, les loci sont dits en **déséquilibre de liaison**.

- Les causes du déséquilibre de liaison :

Les causes d'un déséquilibre de liaison peuvent être multiples :

- Le déséquilibre de liaison peut être dû à la **dérive** qui peut créer un excès de combinaisons entre loci par échantillonnage aléatoire des gamètes dans une population finie (Hill & Robertson, 1968; Ohta & Kimura, 1969; Sved, 1968).
- Concernant des loci non neutres, une **sélection épistatique** peut favoriser ou défavoriser certaines associations d'allèles. L'épistasie est définie comme les interactions entre allèles à des loci différents : la valeur sélective d'un allèle à un locus dépend des allèles présents aux autres loci (Kimura, 1956; Lewontin & Kojima, 1960).
- Si un allèle neutre est lié, ou en déséquilibre de liaison, avec une mutation favorable, la sélection de cette mutation va augmenter la fréquence de l'allèle neutre, c'est le **phénomène d'« autostop »** (hitchhiking). Deux loci neutres peuvent être liés entre eux s'ils sont chacun liés au même gène sélectionné (Asmussen, 1986; Guerin *et al.*, 1979; Thomson, 1977).
- Enfin, un **mélange de deux populations** qui présentent des fréquences alléliques différentes peut créer un déséquilibre de liaison. Si les deux populations se reproduisent de manière aléatoire, le déséquilibre de liaison sera transitoire (Nei & Li, 1973).

Le maintien du déséquilibre de liaison peut être dû à un **mode de reproduction** particulier : l'exemple extrême est l'autofécondation qui limite fortement les recombinaisons puisque les hétérozygotes sont rares, mais l'homogamie (union entre individus qui se ressemblent) peut également contribuer à maintenir un déséquilibre de liaison.

La cause d'un maintien d'un déséquilibre la plus classique est la **liaison physique** des loci. En effet, la distance entre loci détermine le taux de recombinaison entre loci. Des loci très proches auront donc un taux de recombinaison entre eux très réduit, les types gamétiques dits « parentaux » seront donc plus fréquents que les gamètes issus de recombinaisons entre loci et dits « recombinants ». Les déséquilibres de liaison seront donc d'autant plus maintenus que les loci sont physiquement proches.

2.2.3. Modèles de structuration des populations :

L'évaluation d'une structure de population repose sur des modèles démographiques qui proposent des modalités d'échanges génétiques. Ces modèles sont divers et correspondent théoriquement à différentes situations naturelles. On distingue les modèles où les populations sont subdivisées en sous-unités discrètes et ceux présentant une structure continue.

Concernant *An. funestus*, l'espèce qui nous intéresse dans cette étude, les connaissances sur sa biologie montrent une répartition de l'espèce en populations géographiques discrètes au niveau des gîtes larvaires. Les principaux modèles démographiques correspondant à une telle répartition sont le modèle en îles, le « stepping-stone model » et le modèle en métapopulations (Encadré 8).

Les déplacements d'*An. funestus* étant limités à quelques kilomètres (Gillies & De Meillon, 1968), il semble que les migrations d'une sous-population à l'autre se fassent plutôt de proche en proche, correspondant ainsi au stepping-stone model dans un espace à deux dimensions. Le modèle de métapopulations ignore la dynamique interne de chaque sous-population mais par contre rend compte de phénomènes d'extinction et recolonisation. Il peut ainsi refléter le cas de campagnes de lutte antivectorielle qui peuvent provoquer l'extinction de populations locales et le cas de recolonisations qui peuvent avoir lieu après la fin des traitements insecticides. Aucun modèle ne peut donc refléter parfaitement la biologie de populations naturelles mais ils peuvent s'en approcher et permettre une bonne évaluation de la structure des populations. Les outils mathématiques de mesure de la répartition de la variabilité génétique, qui vont être décrits à présent, reposent sur ces modèles démographiques.

Encadré 8 : Modèles démographiques de populations subdivisées

- Les modèles en îles : (Wright, 1931)

Dans ce modèle, les individus, diploïdes, sont répartis en une infinité de sous-populations, ou îles, de taille finie, de N individus. Les îles sont soumises à la dérive génétique, cependant la variabilité génétique peut être maintenue par des migrations. Les migrants peuvent provenir de chaque île et immigrer dans chacune des autres îles.

- Les « stepping-stone models » : (Kimura, 1953)

Ces modèles reposent sur les mêmes caractéristiques que les modèles en îles mais font référence à un système géographique structuré à l'intérieur duquel les sous-populations ne peuvent échanger des migrants qu'avec leurs sous-populations voisines les plus proches et de façon réciproque. Des variantes aux « stepping stone models » reflètent des répartitions des sous-populations dans une, deux ou trois dimensions.

- Les métapopulations : (Levins, 1969)

Le terme de métapopulation a été défini comme « une population de populations », chacune d'entre elles ayant une espérance de vie limitée et étant soumise à une balance stochastique entre processus d'extinction et de recolonisation. Les sites laissés vacants suite à une extinction vont être recolonisés ou non, en fonction du taux de colonisation qui est variable et dépend de la fraction de sites occupés. Dans ce modèle, la dynamique interne des sous-populations est ignorée, seuls les événements de colonisation ou d'extinction sont pris en compte.

2.3. Estimation indirecte de la structuration des populations (Hartl, 1994) :

L'estimation de la structure des populations peut dans certains cas être abordée par la méthode directe qui consiste à estimer les flux de gènes par l'observation des flux migratoires et la mesure de la dispersion des individus. La méthode directe nécessite de capturer, marquer, lâcher et recapturer des individus. Elle a été appliquée aux anophèles d'Afrique dans quelques cas (Costantini *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2001; Toure *et al.*, 1998a). Cependant, cette méthode, très lourde techniquement, présente des biais car les faibles probabilités de recaptures ne sont pas représentatives du nombre de migrants et l'estimation du flux de gènes n'est pas représentative du succès reproductif des migrants.

La structure des populations est de nos jours plus facilement abordée grâce aux techniques de biologie moléculaire permettant l'accès au polymorphisme génétique. Ces méthodes indirectes permettent d'estimer les flux de gènes à partir d'observations sur la répartition de la variabilité génétique.

Pour cela, des outils mathématiques basés sur les rapports d'hétérozygoties observées et attendues sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été établis (Wright, 1965). Pour mesurer le déficit d'hétérozygotes caractéristique des populations structurées, il est nécessaire de tenir compte de plusieurs niveaux d'appréciation : l'hétérozygotie observée en moyenne chez les individus dans l'ensemble des sous-populations (H_i), l'hétérozygotie théorique dans une sous-population équivalente à la panmixie (H_s) et l'hétérozygotie théorique dans la population totale en panmixie, c'est-à-dire si toutes les sous-populations étaient regroupées et à l'équilibre de Hardy-Weinberg (H_t).

De ces trois niveaux de structuration, on pourra déduire trois indices, les F -statistiques de Wright (1965), pour décrire la répartition de la variabilité génétique entre et dans les populations :

- **Le F_{is}** : $F_{is} = (H_s - H_i) / H_s$ où F_{is} est égal à 0 si les sous-populations sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg, $F_{is} > 0$ s'il y a déficit d'hétérozygotes et $F_{is} < 0$ si les sous-populations présentent un excès d'hétérozygotes .
- **Le F_{st}** : $F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$. $F_{st} = 0$ si les sous-populations sont à l'équilibre alors que $F_{st} > 0$ lorsqu'il existe une diminution des hétérozygotes sous l'effet Wahlund.

- **Le *F_{it}*** : $F_{it} = (H_t - H_i) / H_t$ qui mesure la diminution de l'hétérozygotie des individus par rapport à la population totale théorique.

Ces trois paramètres sont reliés par la relation : $1 - F_{it} = (1 - F_{is})(1 - F_{st})$.

D'autres méthodes que les estimateurs de Wright existent pour estimer les flux de gènes, comme la méthode du **maximum de vraisemblance**, utilisée dans quelques études de génétique des populations (Barton *et al.*, 1983; Wehrhahn & Powell, 1987) et la méthode des **allèles rares** (Slatkin, 1985). Cependant Slatkin et Barton (1989) ont montré que l'estimateur *F_{st}* était le plus adéquat dans la plupart des cas. En effet, la méthode du maximum de vraisemblance est très sensible au nombre de populations échantillonnées et a tendance à surestimer le flux de gènes entre populations. Les méthodes du *F_{st}* et des allèles rares sont équivalentes dans le cas de données ne présentant aucune ambiguïté d'identification des allèles. Dans le cas de lecture d'allèles différenciés par leur migration électrophorétique, les ambiguïtés de lecture peuvent avoir une lourde influence sur l'estimation des allèles rares et l'utilisation des *F_{st}* est alors recommandée. Enfin, bien que les estimateurs de Wright aient été prévus dans le cadre d'un modèle en îles, Slatkin et Barton (1989) ont également montré qu'ils pouvaient le plus souvent s'étendre aux autres modèles.

2.4. Outils moléculaires, le choix des microsatellites :

Les méthodes indirectes d'évaluation de la structure des populations nécessitent l'accès à la variabilité génétique des populations. Les moyens d'accéder à cette variabilité génétique se sont multipliés avec l'avancée déterminante de la biologie moléculaire. Les marqueurs moléculaires les plus adaptés à une étude génétique des populations doivent répondre à plusieurs critères : ils doivent avoir une **transmission mendélienne**, être **codominants**, **polymorphes** et **neutres**.

Les microsatellites, bien que longtemps considérés comme des séquences de peu d'intérêt voire gênantes lors de séquençages, sont aujourd'hui des marqueurs moléculaires de choix, utilisés dans plusieurs domaines comme la cartographie du génome (Bell & Ecker, 1994; Dib *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996), la détection de maladies humaines (Sutherland & Richards, 1995), la médecine légale (Jin & Chakraborty, 1995) et, présentant les qualités requises, en génétique des populations (Bossart & Pashley Prowell, 1998).

Les connaissances sur les microsatellites sont largement présentées par Jarne et Lagoda (1996) et Goldstein et Schlötterer (1999).

2.4.1. Définition :

Un microsatellite est un court fragment d'ADN composé de séquences répétées en tandem d'un motif de 1 à 6 bases (Hancock, 1999). Les microsatellites ont été détectés dans les génomes de tous les organismes analysés et ils sont trouvés à une fréquence supérieure à celle attendue d'après la composition en bases (Behe, 1987, 1995; Valle, 1993). Trois familles de microsatellites ont été définies selon la pureté du motif répété (Weber, 1990). Le motif peut être **pur** (par exemple, (CA) n avec $n > 5$), **composé** (par exemple, (CA) n (GA) m avec n et $m > 3$), ou **interrompu** (par exemple, (CA) n X (GA) m avec n et $m > 3$).

2.4.2. Séquence et distribution génomique :

Les microsatellites sont nombreux dans le génome. Tous motifs confondus, on peut en trouver un pour 8 à 60 kb selon les espèces (40 kb pour *Drosophila melanogaster*) (Schug *et al.*, 1998) mais leur distribution dépend beaucoup de la nature de l'unité répétée :

- Les microsatellites **dinucléotidiques** sont fréquents, avec une densité variable selon les espèces. Leur répartition sur le génome est assez homogène (Dib *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1996). Chez les anophèles, les microsatellites semblent abondants (Lanzaro *et al.*, 1995; Rongnoparut *et al.*, 1996; Sinkins *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 1997) mais ils sont particulièrement rares chez le vecteur de la fièvre jaune *Aedes aegypti* (Fagerberg *et al.*, 2001). Chez *D. melanogaster*, organisme modèle en génétique, les dinucléotides sont les motifs répétés les plus fréquents (Schug *et al.*, 1998). Dans le règne animal, le nombre de répétitions est généralement inférieur à 30 (Di Rienzo *et al.*, 1994; Estoup *et al.*, 1995b; Queller *et al.*, 1993) et le motif « CA » est le plus fréquent (Field & Wills, 1998; Nadir *et al.*, 1996).
- Les **trinucléotides**, largement étudiés en raison de leur relation avec certaines maladies humaines, se situent souvent dans des exons où ils ne perturbent pas le cadre de lecture (Jurka & Pethiyagoda, 1995). En raison de leur éventuelle position dans des régions codantes, la neutralité de ces loci est incertaine et ils ne sont donc pas utilisés préférentiellement en génétique des populations.

- Les **tétranucléotides** ne sont pas uniformément répartis sur le génome, ils se regroupent souvent au niveau des centromères (Arens *et al.*, 1995; Nanda *et al.*, 1990). Ils sont rarement purs, sont très polymorphes et longs.

De par leurs caractéristiques, ce sont donc les microsatellites dinucléotidiques qui sont le plus utilisés en génétique des populations.

2.4.3. Accès au polymorphisme :

Un allèle à un locus donné est identifié, relativement à un contrôle de taille connue, après amplification par PCR grâce à des amorces spécifiques dans les régions flanquantes puis migration électrophorétique. C'est donc par leur taille (et non directement la séquence) que les allèles sont caractérisés. On suppose donc que les différences de taille entre allèles sont liées à des variations du nombre de répétitions du microsatellite (Figure 3).

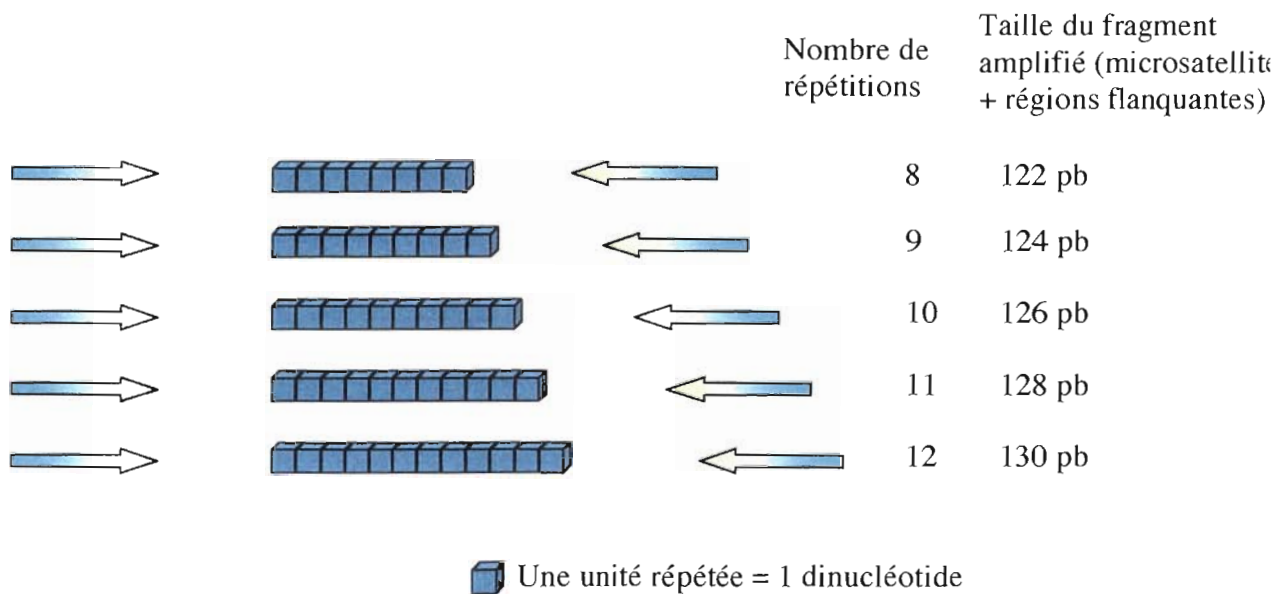


Figure 3 : Amplification d'allèles microsatellites. La longueur du fragment amplifié est supposée représenter le nombre de répétitions de l'unité répétée.

2.4.4. Taux et mécanismes de mutation :

Le taux de mutation au niveau des microsatellites est largement supérieur à celui observé sur les autres parties du génome avec environ 10^{-2} événement de mutation par locus et

par réplication chez *Escherichia coli* (Levinson & Gutman, 1987a) et 6×10^{-6} chez *D. melanogaster* (Schug *et al.*, 1997).

Deux types d'événements peuvent expliquer de tels taux de mutation : le premier implique des « erreurs » (« SSM » pour Slipped Strand Mismatching) de l'ADN polymérase au cours de la réplication par décalage entre la matrice et le brin dupliqué (Levinson & Gutman, 1987b), le second implique des recombinaisons inégales (« UCO » pour Unequal Crossing-Over) entre les molécules d'ADN au cours de la méiose (Smith *et al.*, 1976).

2.4.5. Modèles de mutation (Estoup & Cornuet, 1999) :

Deux modèles de mutation ont été initialement introduits en génétique des populations : le modèle à nombre infini d'allèles, IAM pour Infinite Allele Model, (Kimura & Crow, 1964) et le modèle de mutation pas à pas, SMM pour Stepwise Mutation Model, (Kimura & Ohta, 1978). Dans le premier modèle, la mutation va générer un allèle différent de ceux présents dans la population, le nouvel allèle peut avoir n'importe quelle taille. Dans le second modèle, une mutation diminue ou augmente, avec la même probabilité, le nombre de répétitions d'une unité.

Ces deux modèles ont l'avantage d'être simples mais l'inconvénient qui en découle est qu'ils ne reflètent pas exactement les modalités évolutives des marqueurs microsatellites. D'autres modèles tentent donc de s'en approcher : (i) le modèle à k-allèles, KAM pour k Allele Model (Crow & Kimura, 1970), suppose l'existence de k allèles possibles. Chaque allèle a la probabilité de muter $[\mu/(k-1)]$ vers l'ensemble des autres états alléliques ; (ii) le modèle à deux phases, TPM pour Two Phase Model (Di Rienzo *et al.*, 1994), se réfère au SMM mais suppose que les mutations peuvent introduire le gain ou la perte de X répétitions.

Les analyses de données de populations naturelles n'ont pas tranché entre ces différents modèles (Di Rienzo *et al.*, 1994; Estoup *et al.*, 1995b). Il semble que les modalités de mutations sont variables entre espèces mais aussi d'un locus à l'autre dans une même espèce.

2.4.6. Analyse de la variabilité :

Afin d'adapter les paramètres d'analyse de données aux modèles de mutation des microsatellites, Slatkin a développé le paramètre *Rst* (Slatkin, 1995), qui répond au modèle du SMM, alors que le *Fst*, lui, suppose le modèle IAM.

Le SMM semblant intuitivement plus proche des modalités de mutation des microsatellites, les *Rst* ont été largement utilisés dans un premier temps. Cependant il a été montré par la suite que si les *Fst* sont peu sensibles aux écarts aux modèles supposés, les *Rst*, eux, y sont très sensibles (Gaggiotti *et al.*, 1999). Gaggiotti montre que l'utilisation des *Rst* est recommandable dans des conditions particulières (échantillon > 50 individus, nombre de loci > 20) mais que dans les autres cas les *Fst* sont préférables.

2.4.7. Problèmes liés à l'utilisation des microsatellites :

Bien que possédant les caractéristiques requises pour une utilisation en génétique des populations, les microsatellites comme tout marqueur, présentent quelques inconvénients. L'homoplasie et l'existence d'allèles nuls en sont les principaux et ils peuvent dans certains cas induire des erreurs d'estimation des paramètres décrivant la structure des populations.

- L'homoplasie (Estoup & Cornuet, 1999)

L'homoplasie désigne à l'origine le fait qu'un même caractère donné présent dans deux espèces, populations ou individus ne provienne pas du même caractère chez un ancêtre commun. Transposé au niveau du gène, on peut dire que deux gènes sont homoplasiques quand ils sont identiques par état mais non identiques par descendance.

Les allèles microsatellites étant révélés par variation de taille des fragments amplifiés par PCR, deux produits PCR peuvent avoir la même longueur sans provenir du même gène ancestral (deux allèles de tailles différentes peuvent muter et devenir identiques par la taille), et ainsi être homoplasiques.

Le fait que le nombre d'allèles possibles ne soit pas infini est en lien direct avec l'homoplasie, le modèle IAM ne considère donc pas l'homoplasie. Bien que ce modèle ne puisse pas être rejeté systématiquement (Estoup *et al.*, 1995a), les autres modèles de mutation (SMM, TPM et KAM) reflètent, eux, le phénomène de l'homoplasie. L'homoplasie dépend alors du taux de mutation du locus et du temps de divergence entre les populations.

Une autre caractéristique des microsatellites favorise l'homoplasie, il s'agit d'une contrainte sélective sur la taille des microsatellites, qui, au-delà d'un certain nombre de répétitions favorise la diminution de la taille plutôt que son augmentation et limite ainsi le nombre d'allèles possibles pour le locus (Feldman *et al.*, 1997; Nauta & Weissing, 1996).

Les phénomènes d'homoplasie ont été mis en évidence dans des populations naturelles par le séquençage d'allèles de loci microsatellites interrompus (Angers & Bernatchez, 1997; Estoup *et al.*, 1995b; Viard *et al.*, 1998) ou composés (Garza & Freimer, 1996; Viard *et al.*, 1998). Les interruptions, ou les différences de composition en répétitions, introduisent un niveau supérieur de polymorphisme et des allèles de même taille peuvent être différenciés par séquençage. L'homoplasie peut également être due à des mutations au niveau des régions flanquantes du microsatellite qui peuvent par exemple masquer une différence de taille du microsatellite lui-même (Blanquer-Maumont & Crouau-Roy, 1995; Garza & Freimer, 1996; Grimaldi & Crouau-Roy, 1997).

Pour conclure, l'homoplasie sous-estime la divergence entre les populations puisque des allèles identiques par état sont considérés comme identiques par descendance alors qu'ils ne le sont pas.

- Les allèles nuls

Les allèles nuls sont des allèles non amplifiés, et donc non détectables, en raison de mutations au niveau du site d'appariement d'une ou des deux amorces (Callen *et al.*, 1993; Lehmann *et al.*, 1996). En présence d'un allèle nul, les individus hétérozygotes vont apparaître comme homozygotes pour l'allèle amplifié. Il en résulte un apparent excès d'homozygotes pour ce locus. La mise en évidence d'allèles nuls de manière simple se fait en testant le déficit d'hétérozygotes sur plusieurs populations *a priori* chacune panmictique. Le déficit d'hétérozygotes systématique, ainsi que la présence d'individus pour lesquels aucune amplification n'a lieu (homozygotes pour l'allèle nul) informe de la probable existence d'allèles nuls pour ce loci. Le marqueur est alors rejeté pour l'analyse de génétique des populations ou de nouvelles amorces sont définies.

Malgré ces inconvénients, les microsatellites demeurent les marqueurs de choix pour des études de génétique des populations. Nous utiliserons de tels marqueurs pour étudier la structure génétique des populations d'*An. funestus*.

CHAPITRE 3 : POLYMORPHISME D'*ANOPHELES FUNESTUS* S.S., SUSPICION DE SPECIATION

Le polymorphisme génétique d'*An. funestus* a surtout été étudié au niveau des chromosomes polytènes. Les inversions chromosomiques paracentriques peuvent mettre en évidence des structurations de populations et éventuellement constituer des marqueurs d'espèces, comme il a été vu dans la première partie de l'introduction (Encadré 5). Cependant, l'expérience acquise sur ces marqueurs a montré qu'il ne s'agit pas de marqueurs neutres et qu'ils peuvent subir des pressions de sélection importantes. C'est pourquoi avant d'exposer les données disponibles chez *An. funestus*, nous reviendrons sur l'historique du démantèlement des espèces dans *An. gambiae* s.s. qui a dans un premier temps distingué des formes chromosomiques avant d'identifier des formes moléculaires en voie de spéciation. Les liens entre inversions chromosomiques, adaptation à l'environnement et spéciation seront également abordés afin de poser la problématique concernant *An. funestus*.

3.1. Formes chromosomiques et formes moléculaires chez *An. gambiae* s.s. :

Les recherches sur la structuration au sein d'*An. gambiae* s.s. sont intenses depuis plus de 30 ans et cette espèce constitue donc un modèle très informatif pour les autres espèces anophéliennes.

Chez *An. gambiae*, en Afrique de l'Ouest, des arrangements chromosomiques se sont révélés très polymorphes, particulièrement sur les deux bras du chromosome 2 (bras 2R et 2L). Les déficits voire l'absence d'hétérokaryotypes pour certaines inversions ainsi que les associations de ces inversions à certaines conditions écotypiques ont conduit à distinguer 5 formes chromosomiques ou cytotypes (Coluzzi *et al.*, 1985). Ces cytotypes : Bamako, Savanna, Mopti, Forest et Bissau, sont caractérisés par des arrangements chromosomiques et/ou inversions chromosomiques typiques parfois fixés. L'inversion 2Rd est caractéristique de la forme Bissau qui se trouve en région côtière et l'arrangement standard sur les bras 2R et 2L caractérise la forme Forest qui semble plus adaptée aux forêts tropicales. Les 3 formes Bamako, Savanna et Mopti portent fréquemment l'inversion 2La et sont polymorphes pour le bras 2R. Les associations entre inversions j, b, c et u du bras 2R permettent alors le plus souvent de distinguer ces 3 cytotypes (Coluzzi *et al.*, 1985). Le cytotype Savanna, adapté à

des régions arides, a une large aire de répartition et se retrouve tout le long de la ceinture de savanes sahéliennes et soudaniennes. Les formes Bamako et Mopti sont souvent en sympatrie avec Savanna mais sont beaucoup plus localisées (Coluzzi *et al.*, 1985; Toure *et al.*, 1998b).

La distribution spatiale et temporelle en fonction de facteurs environnementaux appuie les théories préalables de Coluzzi (Coluzzi, 1982; Coluzzi *et al.*, 1979) sur le rôle adaptatif des inversions chromosomiques à un environnement particulier par protection d'associations de gènes coadaptés vis-à-vis des recombinaisons.

Avant que l'on ne dispose des données moléculaires, dans les zones de sympatrie, les formes Bamako, Savanna et Mopti étaient supposées reproductivement isolées du fait des déficits d'hétérokaryotypes (Toure *et al.*, 1984, 1987, 1994, 1998b). Cependant, des éléments montraient déjà que l'isolement reproductif, s'il existait, ne pouvait être dû qu'à une barrière précopulatoire comportementale (Coluzzi *et al.*, 1985). En effet, exceptés les hybrides Mopti-Bamako, toutes les combinaisons d'hybrides entre cytotypes ont été trouvées (Coluzzi *et al.*, 1985; Lanzaro *et al.*, 1998; Robert *et al.*, 1989). De plus, les expériences de fécondation entre formes chromosomiques en insectarium ont donné des descendances viables et fertiles (Di Deco *et al.*, 1980; Favia *et al.*, 1997; Persiani *et al.*, 1984).

Le trouble a été jeté sur la structuration des populations d'*An. gambiae* en cytotypes lorsqu'un marqueur moléculaire basé sur un test PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), permettant d'identifier facilement les différents cytotypes, a été mis au point (Favia *et al.*, 1997).

Ce marqueur moléculaire, basé sur des variations de séquences de l'IGS de l'ADN ribosomal, est capable de distinguer Mopti d'une part (forme moléculaire M) de Savanna et Bamako d'autre part (forme moléculaire S) au Mali et au Burkina Faso et il confirme donc l'isolement de la forme Mopti vis-à-vis de Savanna et Bamako dans cette région d'Afrique de l'Ouest. Cependant, en dehors du Burkina Faso et du Mali, les formes moléculaires et chromosomiques ne sont pas toujours en concordance : si le cytotype Bamako appartient toujours à la forme moléculaire S et les cytotypes Mopti et Bissau à la forme moléculaire M, les cytotypes Savanna et Forest peuvent appartenir à l'une ou l'autre des formes moléculaires (Figure 4). L'association de M et S avec les formes Mopti et Savanna respectivement, au Burkina Faso et au Mali semble être plus l'exception que la règle (della Torre *et al.*, 2001).

Les inversions chromosomiques seraient donc bien le site de déterminants génétiques pour l'adaptation écotypique mais ne seraient pas à l'origine d'un phénomène

d'accouplements préférentiels entre cytotypes. Par contre, les inversions chromosomiques auraient pu favoriser des adaptations à des environnements différents dans la région du Burkina Faso et du Mali. Ces adaptations pourraient être à l'origine de la spéciation entre M et S. En dehors de ces environnements particuliers, les formes moléculaires auraient conservé leur isolement reproductif même lorsqu'elle présentent les mêmes karyotypes, les formes chromosomiques et moléculaires ne sont alors plus en concordance (della Torre *et al.*, 2001).

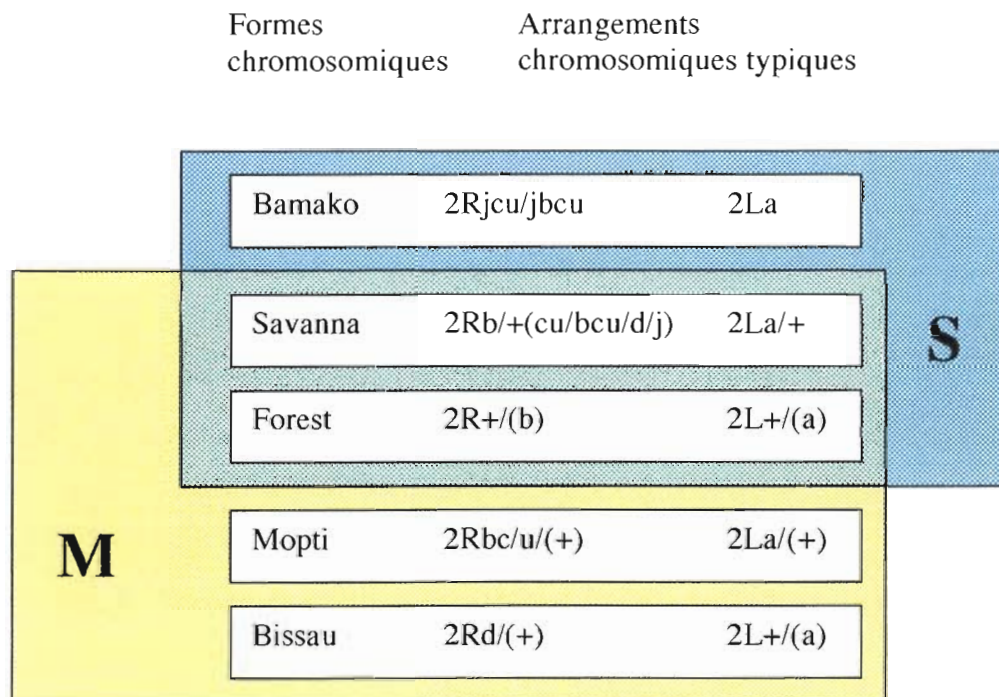


Figure 4 : Relation entre formes chromosomiques (Bamako, Savanna, Forest, Mopti et Bissau) et formes moléculaires (M et S) d'*An. gambiae* (della Torre *et al.*, 2001).

Les arguments en faveur d'une spéciation entre M et S sont forts : (i) seuls quelques très rares hybrides M X S ont été trouvés et il n'a pas été confirmé qu'il ne s'agissait pas de simples contaminations entre échantillons aux cours des expérimentations (della Torre *et al.*, 2001; Wondji *et al.*, 2002), (ii) la distribution de la résistance aux insecticides *kdr* (*knock-down resistance*), fréquente chez S et quasi-absente chez M, montre la barrière de flux de gènes entre les deux formes moléculaires (Chandre *et al.*, 1999) et (iii) les fréquences alléliques et génotypiques de microsatellites révèlent la limitation des flux de gènes entre les deux formes sur l'ensemble du génome au Cameroun et au Mali (Taylor *et al.*, 2001; Wondji *et al.*, 2002). La spéciation ne serait cependant pas complète puisque la barrière pré-copulatoire n'est pas totale (Tripet *et al.*, 2003) et que l'introgression entre M et S a été montrée par le passage de la résistance *kdr* de S à M (Weill *et al.*, 2000). Aujourd'hui, on considère que « le verre est à moitié plein ou à moitié vide » concernant la spéciation entre M et S : la spéciation serait en cours, avec un ancêtre commun très récent et un flux de gènes faible mais persistant qui homogénéiserait les régions du génome non directement impliquées dans la spéciation (della Torre *et al.*, 2002).

Récemment, une étude menée au Mali sur la distribution de la résistance *kdr* entre les formes Savanna et Bamako (forme moléculaire S), montre que la mutation *kdr* est seulement associée à la forme Savanna alors qu'elle est absente dans les populations sympatriques et synchrones de cytotype Bamako. Ce résultat est la première indication moléculaire d'une barrière de flux de gènes entre les deux formes chromosomiques Savanna et Bamako et montrerait donc un nouveau processus de spéciation au sein d'*An. gambiae s.s.* (Fanello *et al.*, 2003)

3.2. Polymorphisme d'*An. funestus s.s.* :

Le polymorphisme chromosomique d'*An. funestus* a été signalé dès 1980 par Green et Hunt. Ils ont identifié la plupart des inversions chromosomiques et les ont nommées (Green & Hunt, 1980). Les chromosomes ont été dénommés comme pour *An. gambiae* « X » pour le chromosome sexuel, « 2 » et « 3 » pour les autosomes, et les bras chromosomiques des autosomes ont été désignés « L » (pour Left) ou « R » (pour Right). Les inversions ont été désignées par des lettres qui suivent le nom du bras chromosomique. Sur les spécimens analysés par Green et Hunt (1980), le bras 2R présentait 6 inversions (2Ra, 2Rb, 2Rc, 2Rd, 2Re, 2Rh), les bras 3R et 3L présentaient chacun deux inversions (3Ra, 3Rb et 3La, 3Lb) .

Disposant d'échantillons du Sud, de l'Est et de l'Ouest de l'Afrique, Green et Hunt avaient déjà remarqué des répartitions inégales des inversions selon les régions africaines, mais ils ne signalèrent aucune structuration particulière pour une localité donnée.

Ce n'est qu'en 1994, que pour la première fois a été suggéré un phénomène de spéciation au sein d'*An. funestus* (Boccolini *et al.*, 1994). Dans des villages du Burkina Faso et du Mali, de forts déficits en hétérozygotes avaient été observés pour toutes les inversions polymorphes (2Ra, 3Ra, 3Rb et 3La). Les inversions étaient en déséquilibre de liaison et différenciaient une forme chromosomique « homokaryotype standard » pour toutes les inversions et une seconde forme polymorphe. Dans ces échantillons du Burkina Faso, la forme homokaryote standard était significativement plus anthropophile, plus endophile et présentait des indices sporozoïtiques significativement plus élevés. Cette étude, bien que peu détaillée, ouvrait des perspectives très intéressantes en suggérant que *An. funestus s.s.* pouvait en fait être constitué de deux espèces de capacité vectorielle et de biologie différentes.

Des travaux complémentaires ont donc été menés (Boccolini *et al.*, 1998) et ils ont permis la description de nouvelles inversions : 2Rs et 2Rt au Burkina Faso et 2Rau et 2Rab au Mali (la figure 5 schématise les principales inversions rencontrées en Afrique de l'Ouest et centrale à ce jour). Ces deux dernières inversions sont désignées par une double lettre car elles possèdent un point de rupture commun avec l'inversion 2Ra. La mise en évidence de ces inversions, et particulièrement de 2Rs, a pris toute son importance avec les travaux de Costantini *et al.* (1999), en permettant de mieux caractériser les formes chromosomiques.

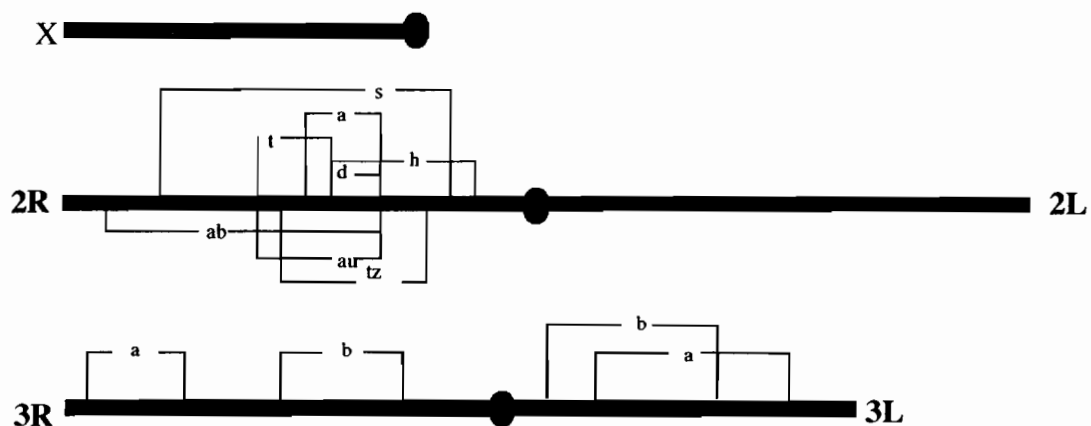


Figure 5 : Principales inversions chromosomiques connues chez *An. funestus*.

L'étude de Costantini, de grande ampleur, réalisée au Burkina Faso, a mis en relation les karyotypes de centaines de spécimens avec leurs données biologiques (saison, endo/exophilie, nature du repas de sang, infection ou non par des plasmodies). Les inversions 2Ra, 2Rs, 3Ra et 3Rb, ainsi que 3La dans une moindre mesure, ont montré des déficits en hétérokaryotypes et des déséquilibres de liaison très significatifs. De plus, le déséquilibre de liaison entre les inversions a été confirmé. Ces déséquilibres de Hardy-Weinberg et de liaison suggéraient la coexistence de deux formes chromosomiques. Une est principalement monomorphe standard avec des arrangements chromosomiques inversés à faible fréquence, caractérisée par l'inversion 2Rs, et l'autre est fixée ou presque pour 3Ra et 3Rb et polymorphe pour les autres arrangements. Pour définir ces deux formes chromosomiques, nommées « **Folonzo** » et « **Kiribina** » Costantini *et al.* (1999) ont défini un algorithme permettant d'assigner les spécimens karyotypés (Figure 6).

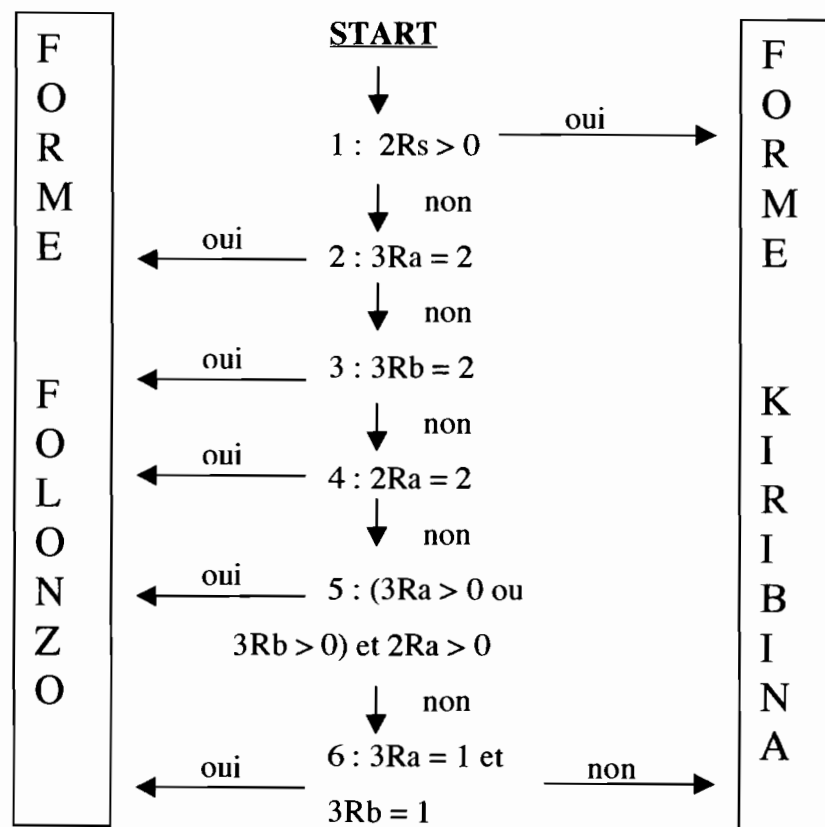


Figure 6 : Diagramme de l'algorithme employé pour assigner les spécimens d'*An. funestus* aux formes chromosomiques, selon Costantini *et al.* (1999).

Les données sur les caractéristiques biologiques des individus karyotypés ont mis en évidence que les inversions chromosomiques caractéristiques de la forme Kiribina étaient significativement sur-représentées dans certains échantillons : les échantillons (i) exophiles par rapport aux échantillons endophiles, (ii) nourris sur animaux par rapport à ceux nourris sur l'homme et (iii) non-infectés par rapport aux infectés. La forme Kiribina aurait alors un comportement un peu moins lié à l'homme que la forme Folonzo et aurait une capacité vectorielle un peu moindre.

Cette étude, avec les précédentes, démontrait donc l'existence au Burkina Faso de deux formes chromosomiques au sein d'*An. funestus*, dont la biologie et la capacité vectorielle semblaient différentes.

Au Sénégal, une situation à peu près similaire, bien qu'un peu plus complexe a été rencontrée (Dia *et al.*, 2000a; Lochouarn *et al.*, 1998). Des localités ne présentaient quasiment que des karyotypes inversés pour 3Ra et 3Rb et très polymorphes sur le bras 2R (forme typique Folonzo d'après l'algorithme de Costantini). D'autres localités ne présentaient quasiment que des homokaryotypes standard sur les bras 2R et 3R (forme Kiribina d'après l'algorithme) et enfin dans un autre type de localité se trouvaient des individus standard pour le bras 3R mais avec 2Rs quasiment fixé (forme Kiribina également). Les deux formes Kiribina n'ont pas été trouvées en sympatrie, on ne sait donc pas si elles se trouveraient à l'équilibre de Hardy-Weinberg, mais la forte structuration de l'inversion 2Rs (fixée ou absente) au sein même de la forme Kiribina suggère une subdivision dans cette forme chromosomique. Les formes Folonzo et Kiribina ont été trouvées en sympatrie et présentaient de forts déficits d'hétérozygotes. Ces structurations semblent stables au cours des saisons et des années (Dia *et al.*, 2000a; Lochouarn *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces données confortent l'idée d'une structuration chromosomique très importante pour *An. funestus*. Ces structurations du même ordre que pour *An. gambiae*, pourraient avoir été également accompagnées d'un phénomène de spéciation. Quelques rares données moléculaires existent : des séquençages des régions ITS2 de l'ADN ribosomal et cytochrome b de l'ADN mitochondrial sur des spécimens issus de localités du Sénégal et Burkina Faso où les formes chromosomiques différents ont été réalisés. Ils ne montrent pas de différenciation génétique corrélée avec les formes chromosomiques (Mukabayire *et al.*, 1999). Ces données n'excluent pas une spéciation, mais révèlent une divergence génétique faible voire inexistante entre les formes chromosomiques.

Dans les régions éloignées de l'Afrique de l'Ouest, le profil révélé par les inversions chromosomiques est différent. La plupart des inversions qui montrent la subdivision en forme chromosomique en Afrique de l'Ouest sont également polymorphes dans les régions de l'Est et du Sud de l'Afrique, mais ne montrent pas de telles structurations. Au Kenya et à Madagascar, dans chacune des localités échantillonnées les inversions 2Ra, 3Ra, 3Rb et 3La sont polymorphes, sans déséquilibre de Hardy-Weinberg ni déséquilibre de liaison (Kamau *et al.*, 2002, 2003b; Sharakhov *et al.*, 2001a; Le Goff, communication personnelle). En Angola, on trouve les inversions 2Rh, 3Rb et 3La, qui montrent une situation de panmixie (Boccoloni *et al.*, 2002). Dans ces régions, la séparation en formes chromosomiques n'est donc pas justifiée et l'algorithme proposé par Constantini *et al.* n'est pas applicable.

A travers l'Afrique, la structuration chromosomique d'*An. funestus* est donc variable. En Afrique de l'Ouest, la subdivision en formes chromosomiques pourrait refléter un isolement reproductif, et « Folonzo » et « Kiribina » seraient alors en cours de spéciation. Dans les régions Sud et Est de l'Afrique, le profil de distribution des inversions chromosomiques ne suggère pas de spéciation.

Le statut taxonomique des formes chromosomiques d'*An. funestus* est donc encore à éclaircir. Comme chez *An. gambiae* la structure des populations est complexe et la relation entre profil cytogénétique et isolement reproductif pourrait varier d'une région à l'autre de l'Afrique.

3.3. Inversions chromosomiques, adaptation à l'environnement et spéciation :

La possible relation entre l'adaptation à l'environnement et les inversions chromosomiques fût évoquée par White en 1973. Il signalait en effet que les inversions chromosomiques empêchent ou limitent, chez les hétérozygotes, les recombinaisons entre les « break points » (points de cassure qui délimitent les inversions chromosomiques). Les associations de gènes favorables à un environnement particulier seraient ainsi protégées des recombinaisons à l'intérieur des inversions. Les inversions chromosomiques pourraient alors être sélectionnées par des conditions environnementales. Cette hypothèse a été largement utilisée pour expliquer le profil de répartition des inversions chromosomiques chez *An. gambiae* (Coluzzi *et al.*, 1979) et semble confirmée dans cette espèce. La répartition des cytotypes selon des faciès écologiques a été en effet bien montrée dans cette espèce (Bryan *et*

al., 1982; Coluzzi, 1982; Coluzzi *et al.*, 1985; Touré *et al.*, 1998b). Une restriction de flux de gènes dans les inversions a été observée entre formes chromosomiques et serait due à la limitation des recombinaisons chromosomiques (Kamau *et al.*, 1998; Lanzaro *et al.*, 1998).

De manière générale, une relation directe de cause à effet entre les inversions chromosomiques et la spéciation semble être plutôt exceptionnelle et requiert des conditions particulières. Les principales connaissances sur le lien entre inversions chromosomiques et spéciation sont présentées par Spirito (1998). Les réarrangements chromosomiques peuvent être à l'origine de spéciation à cause des aberrations méiotiques qu'ils peuvent provoquer lors des recombinaisons et qui peuvent engendrer une baisse de la fertilité des hybrides (Reisenberg, 2001; Searle, 1998). Cependant, parmi les réarrangements chromosomiques (inversions paracentriques, inversions péricentriques, translocations réciproques, translocations robertsoniennes), tous n'ont pas le même effet sur la fertilité. Les translocations réciproques causent une semi-stérilité avec 50% des gamètes déséquilibrés. Les inversions ont par contre un effet relativement limité sur la réduction de fitness des hybrides (Lande, 1979; Searle, 1993). Les doubles crossing-over dans les inversions ne provoquent pas d'aberrations chromosomiques (Figure 7a). Les crossing-over simples ou triples dans les inversions donnent deux chromosomes déséquilibrés sur quatre : un dicentrique, avec deux centromères, et un acentrique, sans centromère. Le chromosome dicentrique se casse de manière aléatoire et après séparation des chromatides, 2 sur 4 sont délétères (Figure 7b).

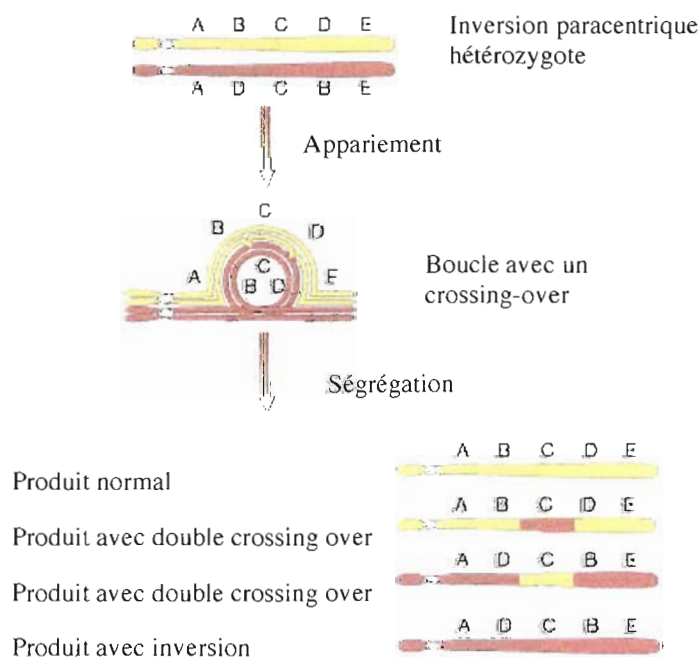


Figure 7a

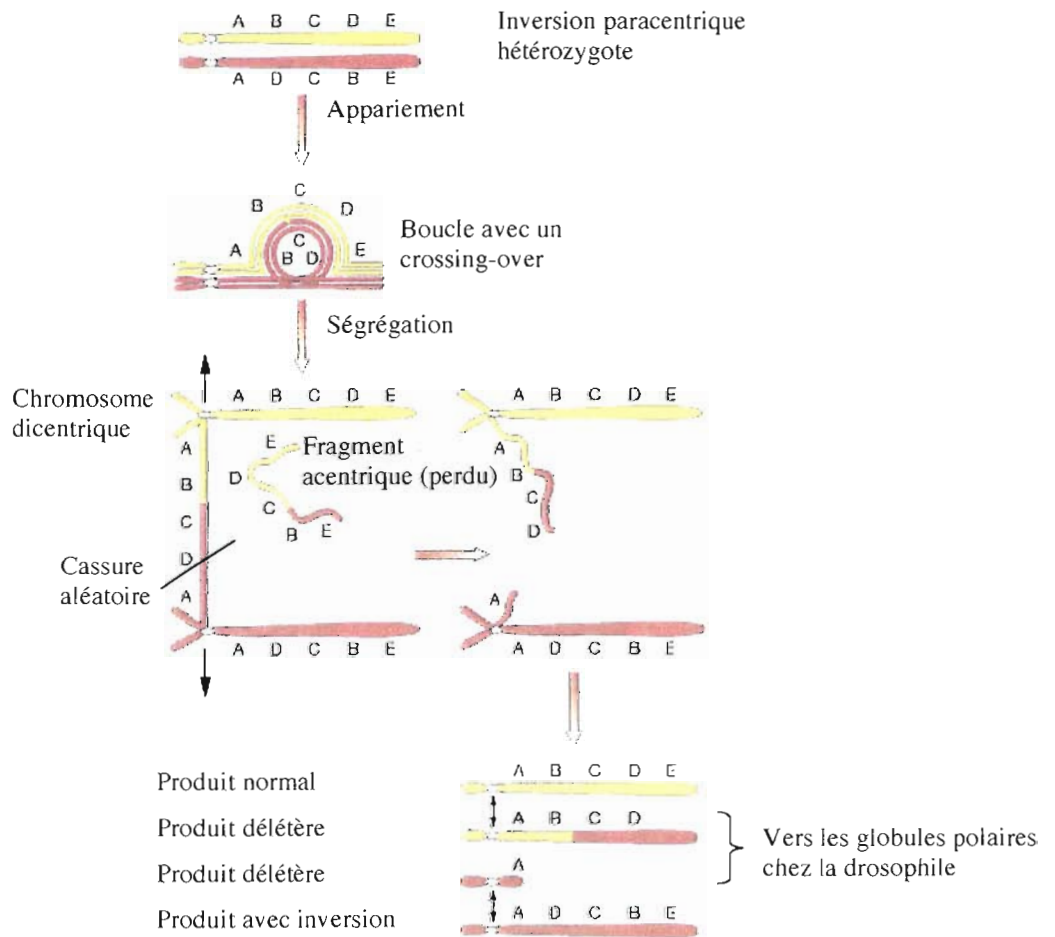


Figure 7b

Figure 7 : Recombinaisons méiotiques avec inversion paracentrique, dans le cas d'un double (7a) ou simple (7b) crossing-over dans l'inversion.

Chez les diptères les mieux connus, les drosophiles, la baisse de fertilité due aux inversions chromosomiques est quasiment nulle. En effet, les recombinaisons au cours de la méiose sont normalement rares chez les mâles, les inversions chromosomiques ne perturbent donc pas la spermatogénèse. Chez les femelles, il a été observé que les chromosomes déséquilibrés se retrouvent dans les globules polaires, cellules formées pendant l'ovogénèse qui ne se transforment pas en ovules mais dégénèrent. Les ovules se développent donc normalement (White, 1973). Des mécanismes similaires de tolérance des inversions paracentriques sont communes chez les diptères (Lande, 1979).

Il semble donc peu vraisemblable que les inversions chromosomiques paracentriques puissent être à l'origine directe d'une spéciation, en particulier chez les diptères.

Les causes écologiques de la spéciation ont par contre été bien documentées dans diverses espèces (Schluter, 1998). L'hypothèse la plus largement reconnue expliquant la spéciation provoquée par des facteurs environnementaux est la « spéciation écologique », c'est à dire qu'une sélection divergente exercée par différents environnements ou par compétition sur les ressources engendre des différences phénotypiques puis un isolement reproductif (Dobzhansky, 1951; Huxley, 1942; Mayr, 1942, 1963; Simpson, 1953). L'isolement peut être pré-zygotique ou post-zygotique.

L'isolement pré-zygotique peut s'exercer par une sélection sexuelle due à la divergence phénotypique, qui peut être par exemple la taille des individus. Il a été en effet montré en laboratoire que, pour certaines espèces proches de poissons ou d'oiseaux, les « gros » individus d'une « petite » espèce peuvent s'accoupler avec les « petits » individus de la « grosse » espèce (Nagel & Schuller, 1997; Foote & Larkin, 1988; Ratcliffe & Grant, 1983). Le phénotype de la taille engendre donc ici une sélection sexuelle. L'isolement pré-zygotique peut dans certains cas être le fait d'un phénomène de renforcement (augmentation de l'isolement reproductif pré-copulatoire entre dans une zone de contact secondaire entre deux taxa résultant d'un isolement post-zygotique) (Schluter & Price, 1993).

L'isolement post-zygotique peut être dû à des mécanismes écologiques par réduction de la valeur sélective des hybrides. Les hybrides, de phénotype intermédiaire, ont une fitness moindre dans chacun des environnements parentaux (Price & Waser, 1979; Shields, 1982; Waser, 1993). Ce type d'isolement post-zygotique est « environnement-dépendant » (Rice & Hostert, 1993), car si les hybrides trouvent un environnement intermédiaire adapté à leur phénotype, leur fitness ne sera plus affectée. Cette théorie de la réduction de la fitness des hybrides pour causes écologiques a été confirmée par des observations dans la nature : la différenciation entre causes écologiques et génétiques est validée par le fait que l'isolement post-zygotique dû à des facteurs écologiques est « environnement-dépendant » alors que les causes génétiques sont « inconditionnelles » (Rice & Hostert, 1993). Le phénomène El Niño a offert une expérimentation en milieu naturel. Deux espèces d'oiseaux des Galapagos (*Geospiza fortis* et *Geospiza fuliginosa*) de tailles différentes se croisent occasionnellement. Avant un phénomène El Niño particulièrement important en 1983, les hybrides avaient une fitness moindre par rapport aux parents en raison d'une taille intermédiaire du bec défavorable à la prise de graines. Les pluies exceptionnelles associées à El Niño en 1983 ont dramatiquement changé les conditions environnementales avec un remplacement de l'espèce

majoritaire de graines et il a été observé que les hybrides n'étaient plus alors désavantagés (Grant & Grant 1993, 1996). L'isolement reproductif est bien post-zygotique et la fitness des hybrides est bien « environnement-dépendante ». Un autre exemple de réduction de fitness des hybrides entre espèces d'oiseaux due à des difficultés de préhension des graines a été montré dans le complexe *Loxia curvirostra* (Benkman, 1993). La réduction de fitness des hybrides peut également avoir d'autres causes : elle peut être liée par exemple à un manque de tolérance à des sols particuliers pour les hybrides entre les espèces d'iris *Iris fulva* et *Iris hexagona* (Arnold & Bennett, 1993) ; ou à une désynchronisation des cycles de vie entre l'insecte hybride et les plantes hôtes dans le cas des races en cours de spéciation de *Rhagoletis pomonella* et les arbres hôtes que sont le pommier et l'aubépine (Feder, 1998; Bush, 1969, 1992). Les conditions environnementales peuvent donc être à l'origine d'une spéciation par isolement pré ou post-zygotique. Quand l'isolement est post-zygotique, il peut varier dans le temps et dans l'espace en fonction des conditions écologiques.

On a donc vu que s'il est assez peu probable que les inversions chromosomiques provoquent elles-mêmes une spéciation, elles peuvent par contre être sélectionnées par des conditions environnementales. Les conditions environnementales, elles, peuvent être à l'origine de spéciation. Il peut donc exister une corrélation entre inversions chromosomiques et spéciation mais le lien étant indirect, cette corrélation peut ne pas être systématique, c'est ce qui a d'ailleurs été observé chez *An. gambiae*.

PRESENTATION DE L'ETUDE :

L'ensemble des données et réflexions présentées au cours de cette introduction a mené à la présente étude. Au cours d'une première partie nous exposerons les améliorations apportées à l'identification des espèces du groupe *Funestus* qui ont également abouti à la caractérisation d'un nouveau membre du groupe. Les outils d'identification mis au point seront ensuite utilisés pour une étude de suivi de transmission palustre dans un village du Cameroun avec une attention particulière portée sur la distribution des différentes espèces du groupe *Funestus*. La seconde partie de l'étude porte sur le développement d'outils moléculaires donnant accès au polymorphisme génétique d'*An. funestus s.s.* par isolement de loci microsatellites et leur localisation sur le génome. Dans la troisième partie, des études de la structure génétique des populations d'*An. funestus s.s.* du Cameroun et du Sénégal seront présentées. Ces études, mettant en relation des données cytogénétiques et microsatellites, tenteront entre autres d'élucider le statut taxonomique des formes chromosomiques chez *An. funestus s.s.* en tenant compte de l'expérience acquise chez *An. gambiae*.

Matériel biologique

Pour la réalisation de cette étude, des collectes d'*Anopheles* ont été effectuées dans un pays d'Afrique centrale, le Cameroun, et un d'Afrique de l'Ouest, le Sénégal (Figure 8). Ces deux pays présentent des faciès écologiques variés.

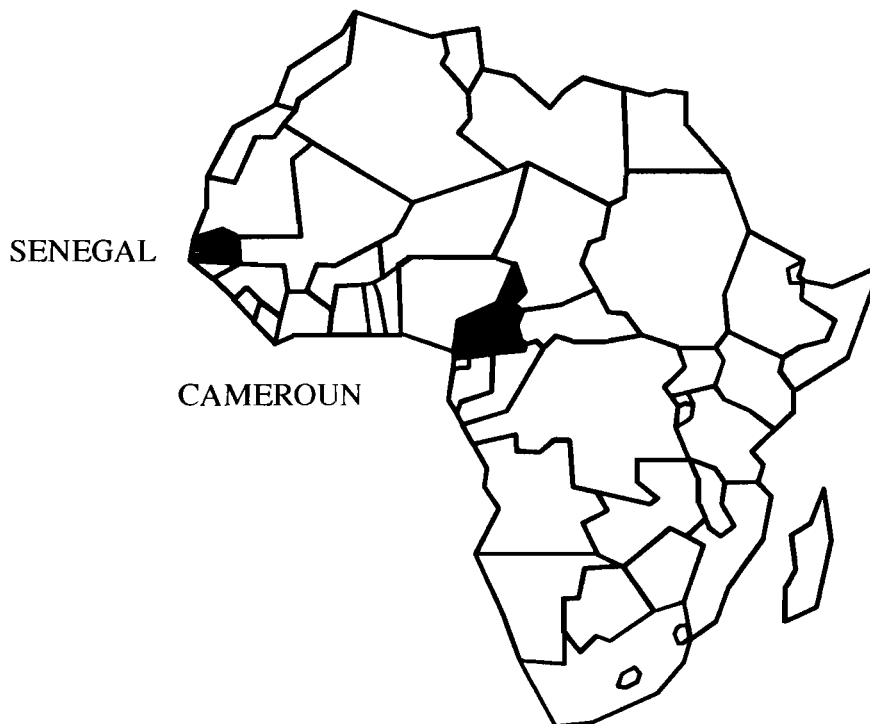


Figure 8 : Localisation géographique des pays de collecte.

1. LE CAMEROUN

1.1. Présentation générale du pays :

Le Cameroun couvre une superficie de 465 000 km², il s'étend sur 1250 km sur un axe Nord-Sud et 860 km sur un axe Est-Ouest entre les latitudes 1°40' N et 13°05' N et les longitudes 8°30' et 16°10'. En 1980, sa population était estimée à 8 500 000 habitants. Elle est très diversement répartie avec une densité de population maximale dans trois régions du pays : l'axe Douala-haut plateaux de l'Ouest, la région de Yaoundé et la région de Maroua dans le Nord (Figure 9a) (Olivry, 1986). La diversité du pays constitue une des caractéristiques du Cameroun, qui est souvent qualifié d'« Afrique en miniature ». Cette

diversité est due aux trois principaux facteurs que sont l'allongement du pays qui implique des variations climatiques, l'ouverture sur l'océan d'où une exposition au flux de mousson et le relief varié avec en particulier la barrière de l'Adamaoua (Figure 9b) séparant le Cameroun « humide » du Cameroun « sec ».

1.2. Climat :

Les unités climatiques ont été individualisées principalement en fonction des précipitations, et de la succession des saisons. Elles sont au nombre de quatre (Figure 9c et 9d) :

- Le climat équatorial de type camerounais avec mousson équatoriale (2 saisons et 0 à 3 mois « moins humides »). Les précipitations, abondantes, varient de 2000 à 10000 mm au niveau du Mont Cameroun. Dans les régions côtières, la température moyenne annuelle est de 26°C, l'amplitude annuelle de 2,8°C. Dans les régions d'altitude, la température moyenne annuelle tombe à 21°C et l'amplitude à 2,2°C.
- Le climat équatorial de type guinéen présente quatre saisons dont 2 mois « moins humides ». Les précipitations annuelles varient de 1500 à 2000 mm. La température moyenne annuelle est d'environ 25°C et l'amplitude moyenne annuelle de 2,4°C.
- Le climat soudanien ou tropical humide avec deux saisons pluvieuses et 3 à 6 mois secs. Les précipitations annuelles varient de 900 à 1500 mm. La température moyenne annuelle est de 28°C et l'amplitude de 6,4°C.
- Le climat soudano-sahélien a plus de 7 mois de sécheresse. Les précipitations annuelles varient de 400 à 900 mm. La température moyenne annuelle atteint 28°C et l'amplitude est de 7,7°C.

1.3. Végétation :

La végétation camerounaise représente un condensé de celle de l'Afrique intertropicale avec la forêt dense et humide au Sud, savanes au centre, steppes au Nord et forêts et prairies de montagne. Les zones phytogéographiques s'organisent surtout selon une répartition latitudinale et altitudinale traduisant la zonalité du climat et du régime des précipitations (Figure 9e).

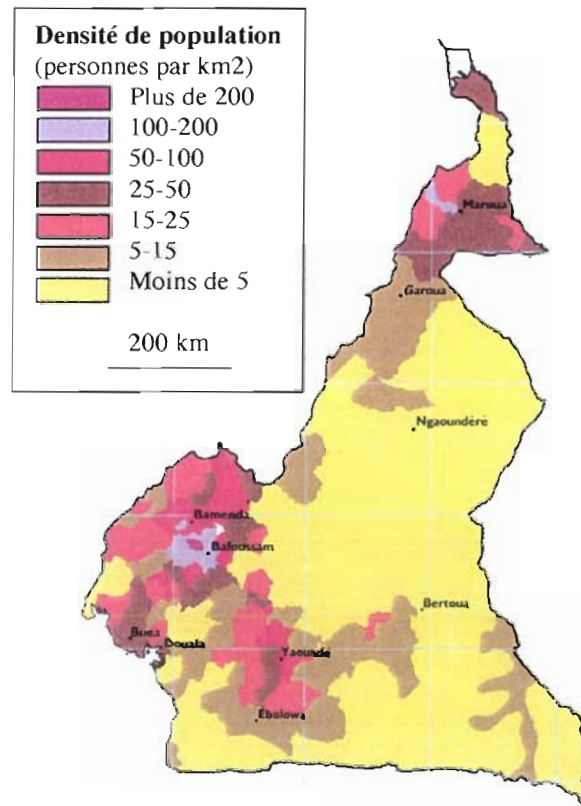


Figure 9a

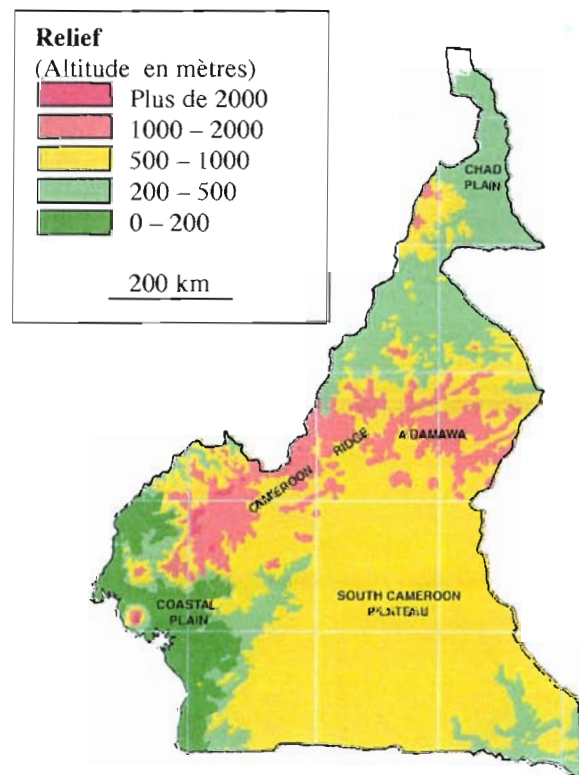


Figure 9b

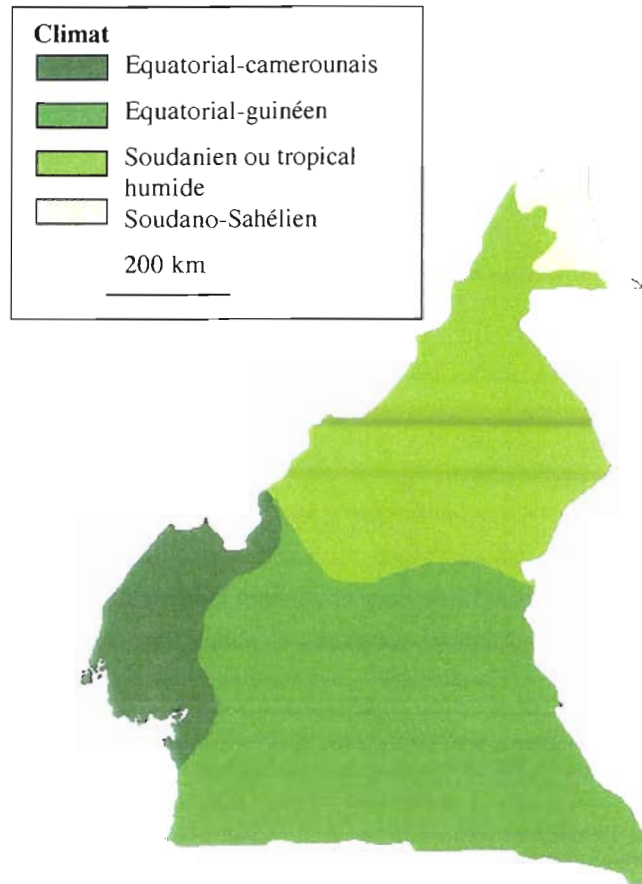


Figure 9c

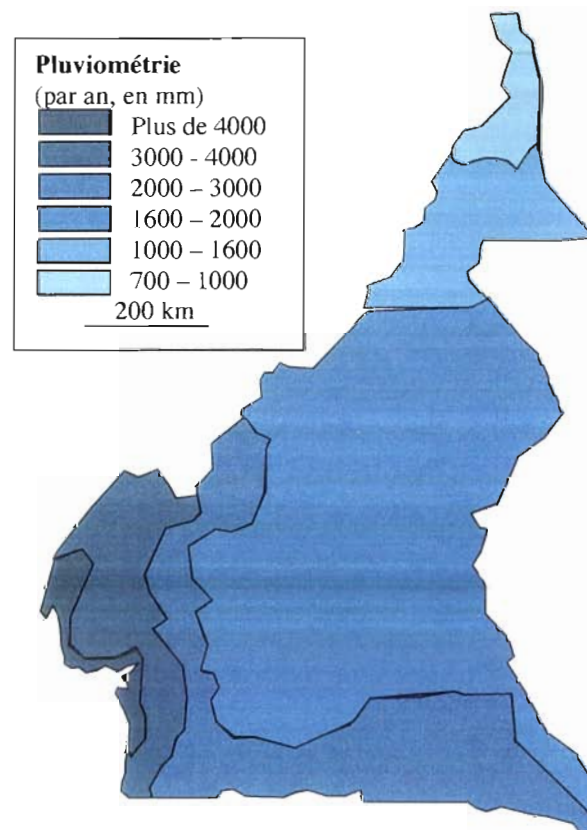


Figure 9d

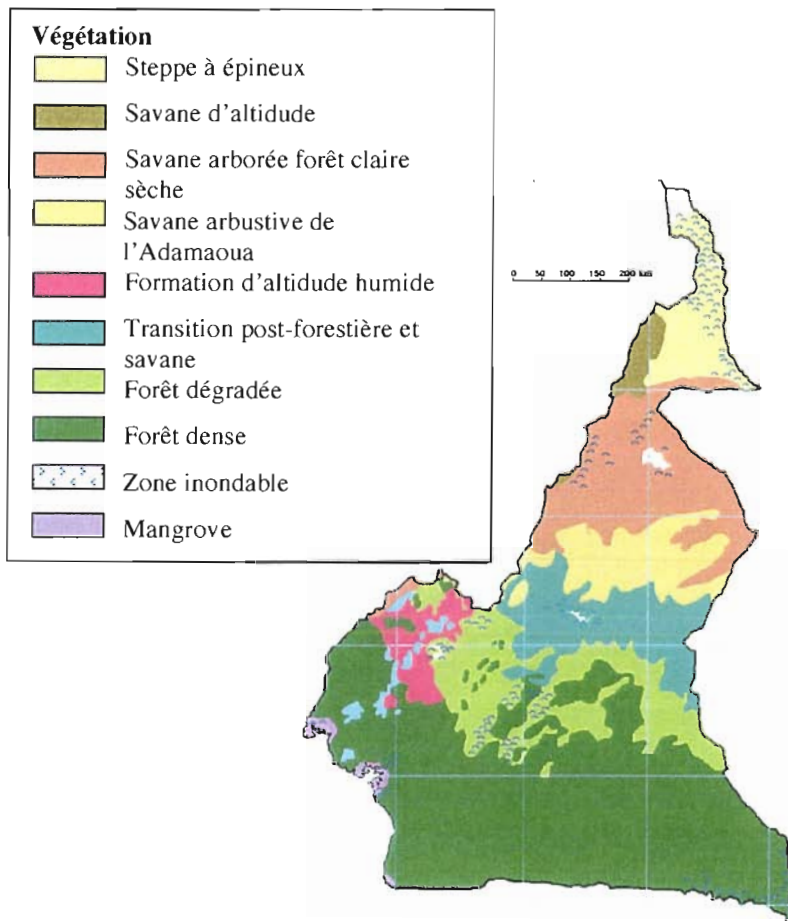


Figure 9e

Figure 9: Caractéristiques géographiques du Cameroun, répartition de la population (9a), relief (9b), climat (9c), pluviométrie (9d) et végétation (9e).

1.4. Sites de collectes :

Du Sud au Nord, les sites de captures sont les suivants (Figure 10) :

Mfou (3°41'N, 11°32'E) : Mfou est un village à environ 30 km au Sud de Yaoundé, la capitale du Cameroun, en zone de forêt dégradée. La région est urbanisée avec de nombreuses voies de communication. Le gîte larvaire est constitué d'une retenue d'eau de quelques centaines de mètres dont les bordures sont largement envahies par une végétation dressée. Un mauvais écoulement d'un petit cours d'eau dû à des constructions humaines est à l'origine de la retenue d'eau.

Mbébé (4°19'N, 11°12'E) : Le village est constitué de quelques maisons au bord de la Sanaga, un des principaux fleuves du Cameroun, en zone de forêt dense. Les larves se développent en bordures du fleuve, dans les zones où le courant est très faible et dans la végétation.

Ntui (4°26'N, 11°37'E) : Le village est en zone de forêt dégradée sur une des voies de communication liant le Sud et le Nord du pays (route du centre). Les gîtes sont constitués de retenues d'eau dues à la route qui gêne l'écoulement d'un ruisseau.

Nkoteng (4°30'N, 12°03'E) : Le village, d'environ 3000 habitants, se trouve en zone de transition savane-forêt. De grandes cultures de cannes à sucre constituent le paysage avoisinant. Les gîtes sont de petites retenues d'eau dues à l'urbanisation.

Foumban (5°47'N, 10°43'E) : Les collectes ont été réalisées à environ 30 km de la ville de Foumban dans un petit village (Kouaptamo) de quelques dizaines d'habitants à proximité du grand lac artificiel du Bamendjim. La zone est marécageuse en raison de la présence du lac et offre de multiples gîtes larvaires.

Bankim (6°20'N, 11°22'E) : Bankim est sur la voie la plus fréquentée entre le Sud et le Nord (route de l'Ouest), en zone de transition savane-forêt. La route crée les gîtes larvaires en générant des retenues d'eau (Illustration 2).

Tibati (6°28'N, 12°37'E) : Un grand lac artificiel très largement bordé de végétation dressée constitue un immense gîte larvaire dans cette petite ville de zone de transition savane-forêt (Illustration 2).

Ngaoundéré (7°19'N, 13°35'E) : Les collectes ont été réalisées dans la zone universitaire, à l'écart de cette ville en savane arbustive de l'Adamaoua. Les logements étudiants bordent un petit lac qui constitue le gîte larvaire.

La région de Poli : Dans cette zone de savane arborée, de petits cours d'eau souvent asséchés durant les mois les plus secs (décembre à avril pour les plus petits), permettent le développement larvaire.

Lagdo (9°30'N, 13°44'E) : A Lagdo se trouve un grand lac artificiel. Les cultures environnantes sont surtout des rizières et ce sont les canaux d'irrigation, bordés de végétation, qui constituent les gîtes larvaires (Illustration 2).

Maga (10°51'N, 14°57'E) : Comme à Lagdo, un lac artificiel permet l'irrigation des rizières et les canaux d'irrigation offrent des gîtes larvaires.

Les habitations dont les murs sont constitués de boues séchées sont propices au repos des moustiques adultes endophiles. Au Nord de l'Adamaoua, les habitations avec des toits en chaumes sont des gîtes de repos encore plus privilégiés, par rapport aux tôles ondulées utilisées dans la moitié Sud du pays, et plusieurs centaines d'individus peuvent parfois être collectés dans une seule chambre.

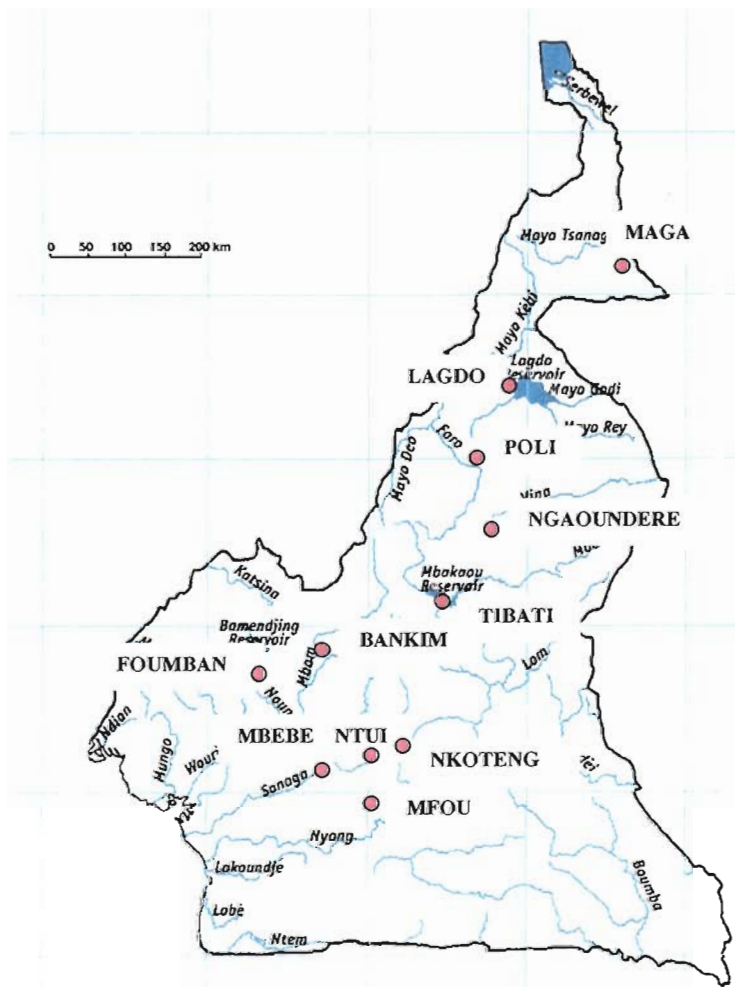


Figure 10 : Sites de capture d'*An. funestus* au Cameroun et hydrographie.

2. LE SENEGAL

2.1. Présentation générale du pays :

Le Sénégal se situe à l'avancée la plus occidentale du continent africain. Le Sénégal couvre une superficie d'environ 200 000 km². La population a été estimée à 9 800 000 d'habitants en 2001, elle est en forte croissance en particulier en zone urbaine où vit environ 40 % de la population.

Le relief est peu marqué sur la majeure partie du pays. Les sols sont sablonneux et ne dépassent pas 130 m d'altitude sauf à la frontière Sud-Est. Trois fleuves principaux traversent le pays d'Est en Ouest : le Sénégal (1700 km), la Gambie (750 km) et la Casamance (300 km).

2.2. Climat

Le pays compte quatre grandes zones climatiques qui suivent les lignes isohyètes (Figure 10) : la zone sahélienne avec une pluviométrie inférieure à 350 mm, la zone sub-sahélienne avec une pluviométrie entre 350 et 500 mm, la zone soudano-sahélienne entre 500 et 700 mm et la zone soudanienne et sub-guinéenne avec des précipitations de 700 à 1300 mm (Figure 11).

Le climat est marqué par deux saisons : une saison chaude et pluvieuse de juin à octobre et une saison sèche de novembre à mai.

2.3. Végétation

Dans la zone sahélienne et jusqu'à l'isohyète 700 mm, on trouve des savanes arbustives et boisées. Entre les isohyètes 700 mm et 1300 mm, ce sont des forêts humides et forêts sèches qui constituent le paysage (Figure 10). Dans l'extrême Sud-Ouest du pays se trouve une zone de forêt dense, mais qui a souvent été dégradée au bénéfice des cultures.

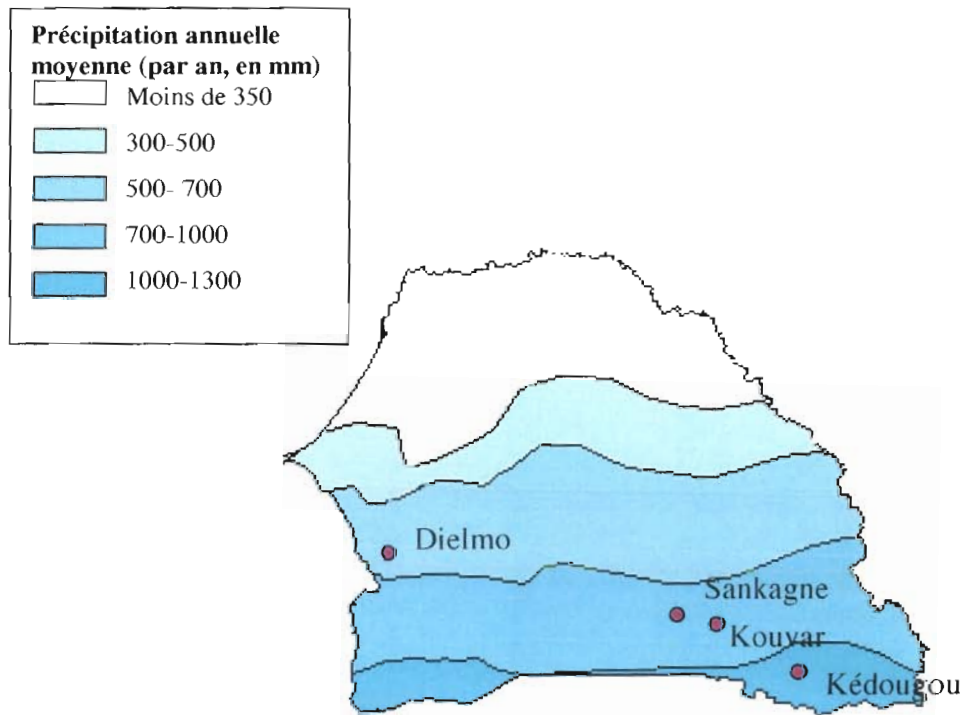


Figure 11 : Précipitations moyennes au Sénégal et localités d'échantillonnage.

2.4. Sites de collecte :

Les captures ont été effectuées le long d'une transect de l'Ouest à l'Est du Sénégal, le long du fleuve Gambie.

Dielmo (13°45'N, 16°25'W) : Le village d'environ 250 habitants est situé en savane de type sahélo-soudanien à 280 km au Sud-Est de Dakar et à 15 km au nord de la frontière gambienne. Il borde un petit cours d'eau qui assure la persistance des gîtes larvaires au cours de l'année.

Sankagne (13°24'N, 13°45'W) : Sankagne se trouve à l'Est de la Gambie, en zone soudanienne à 3 km environ du fleuve Gambie. Le village se compose d'environ 1600 habitants.

Kouvar (13°23', 13°37'W) : Kouvar se situe à quelques kilomètres à l'Est de Sankagne. Un gîte larvaire permanent permet le développement des larves.

Kédougou (12°33, 12°11'W) : Cette petite ville de l'extrême-Est du Sénégal se trouve dans une des régions les plus humides du pays, en zone soudano-guinéenne et en bordure du fleuve Gambie.

3. METHODES DE CAPTURE

La collecte des spécimens peut être faite selon plusieurs techniques qui présentent chacune des intérêts différents (Illustration 5).



Capture sur volontaire



Capture à l'aide d'un aspirateur à bouche



Capture après pulvérisation d'insecticide



Capture de larves

Illustration 5 : Méthodes de captures d'anophèles utilisées.

3.1. Capture sur volontaires :

Cette méthode permet de mesurer l'agressivité des moustiques vis-à-vis de l'homme. Les captures se déroulent de nuit de 19 H à 6 H. Les volontaires capturent, avant la piqûre, les moustiques qui se posent sur leurs jambes, à l'aide d'une lampe torche et de tubes à hémolyse. Les spécimens collectés sont référencés pour de nombreuses caractéristiques (date, village, heure de capture, maison, situation à l'intérieur ou à l'extérieur d'une habitation) ce qui permet de déterminer le taux de piqûre, les taux d'endophagie/exophagie, les cycles d'agressivité nocturnes et annuels. Chaque poste de capture est assuré par 2 collecteurs, le premier étant relayé à 1H du matin. Les volontaires sont informés de la procédure et une prophylaxie est fournie. Cette technique est la seule à ce jour permettant de quantifier le niveau de transmission palustre.

3.2. Capture par pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide :

Avec cette méthode, ce sont les spécimens au repos dans les habitations qui sont collectés. La technique consiste à étaler des draps blancs dans des chambres fermées, puis à pulvériser de l'insecticide à base de pyréthrinoïdes. De l'insecticide est pulvérisé particulièrement au niveau des issues de la pièce (fenêtres, portes, jours entre le mur et le toit) pour éviter au maximum les sorties de moustiques. Au bout d'une dizaine de minutes, les moustiques morts, tombés sur les draps, sont collectés. Seuls les anophèles, identifiables à l'œil nu de par leurs ailes tachetées, sont conservés.

Cette technique permet la collecte de nombreux spécimens et, selon l'heure de la capture, il est possible d'obtenir des femelles semi-gravidés, chez lesquelles les chromosomes polytènes seront visibles. Le sang non digéré contenu dans les estomacs des spécimens endophiles collectés peut être analysé (Beier *et al.*, 1988) afin de déterminer son origine et de déduire les préférences trophiques des différentes espèces.

3.3. Capture à l'aide d'un aspirateur à bouche :

Cette méthode permet de collecter les spécimens au repos dans les habitations et les gîtes de repos extérieurs où la nature du gîte ne permet pas de pulvérisation d'insecticide. Elle permet aussi, par rapport à l'utilisation d'insecticide, l'obtention de spécimens vivants. Les

moustiques sont repérés à l'aide d'une lampe torche et aspirés à l'aide d'un aspirateur à bouche.

3.4. Captures de larves :

Par cette méthode, on obtient des larves vivantes, qui peuvent être identifiées à ce stade et élevées jusqu'à l'émergence. Les larves sont recherchées dans des gîtes larvaires à l'aide de cuvettes avec lesquelles on prélève rapidement de l'eau de surface.

4. IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE

Les spécimens ont été identifiés morphologiquement selon les clés d'identification de Gillies et De Meillon (1968) et Gillies et Coetzee (1987), qui permettent de distinguer les groupes et complexes d'espèces d'anophèles d'Afrique. Les membres de complexes d'espèces ou de groupes d'espèces ne peuvent pas toujours être identifiés morphologiquement. Nous avons utilisé les techniques moléculaires d'identification d'espèces disponibles pour identifier les membres du groupe *Funestus* et complexe *An. gambiae*. La plupart des membres du complexe *An. gambiae* peuvent être identifiés grâce au protocole décrit par Scott *et al.* (1993) et les formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.* peuvent être déterminées par la PCR spécifique mise au point par Favia *et al.* (1997). Les principaux membres du groupe *Funestus* peuvent être identifiés par PCR selon le protocole de Koekemoer *et al.* (2002).

Première Partie :

**Identification des membres du groupe Funestus et
suivi de transmission palustre**

Article 1 :

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (2003), 69 (2), p 200-205.

**SPECIES IDENTIFICATION WITHIN THE *ANOPHELES FUNESTUS* GROUP OF
MALARIA VECTORS IN CAMEROON AND EVIDENCE OF A NEW SPECIES**

A. COHUET, F. SIMARD, J .C. TOTO, P. KENGNE, M. COETZEE & D. FONTENILLE

SPECIES IDENTIFICATION WITHIN THE *ANOPHELES FUNESTUS* GROUP OF MALARIA VECTORS IN CAMEROON AND EVIDENCE FOR A NEW SPECIES

ANNA COHUET, FREDERIC SIMARD, JEAN-CLAUDE TOTO, PIERRE KENGNE, MAUREEN COETZEE, AND DIDIER FONTENILLE

Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; Laboratoire d'Entomologie Médicale, de l'Institut de Recherche pour le Développement Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, Yaounde, Cameroon, Vector Control Reference Unit, National Institute for Communicable Diseases, Johannesburg, South Africa; Department of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, School of Pathology of the National Health Laboratory Service and the University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

Abstract. *Anopheles funestus* is a major vector of malaria in Africa. It belongs to a group of sibling species that can be identified morphologically only at certain stages of their development. A diagnostic polymerase chain reaction (PCR)-based tool made it possible to differentiate five species of the group. The assay seems to be applicable over all their distribution area for four of these species: *An. funestus*, *An. lesoni*, *An. parensis*, and *An. vaneedeni*. The fifth species, *An. rivulorum*, is the second most abundant species of the group and can be mistaken at its adult stage for the major vector of malaria *An. funestus*. Molecular and morphologic observations of specimens identified as *An. rivulorum* from Cameroon and South Africa showed that they belong to two different taxa. The species identified in Cameroon, and named here *An. rivulorum*-like, might extend to western Africa and central Africa. The species-specific PCR assay is supplemented by a primer specific to *An. rivulorum*-like and thus makes it possible to differentiate the five species of the *An. funestus* group and the newly defined taxon.

INTRODUCTION

Anopheles funestus Giles, known for its major role in the transmission of human malaria,¹ belongs to a group of nine species (*An. funestus* s.s., *Anopheles rivulorum* Leeson, *An. lesoni* Evans, *Anopheles vaneedeni* Gillies & Coetzee, *An. parensis* Gillies, *An. confusus* Evans & Leeson, *An. aruni* Sobti, *An. fuscivenosus* Leeson, and *An. brucei* Service) that are morphologically very similar and can only be distinguished at specific stages of their development.^{1,2} Their biology and vectorial capacity is highly contrasting. The mainly endophilic and anthropophilic *An. funestus* is considered a major human malaria vector in Africa. *Anopheles rivulorum* is primarily zoophilic but was found infected with *Plasmodium falciparum* in Tanzania and can transmit human malaria.³ *Anopheles vaneedeni* has been infected in the laboratory with *P. falciparum*, but its vectorial role has never been demonstrated in a natural environment.⁴ The other members of the *An. funestus* group are mainly zoophilic and do not seem to be involved in the transmission of malaria.

Anopheles funestus, *An. rivulorum*, and *An. lesoni* have a wide geographic distribution, extending throughout sub-Saharan Africa. The other members of the group are more localized or their true distribution is largely unknown: *An. parensis* and *An. confusus* are found in eastern Africa, *An. vaneedeni* in the northern areas of South Africa, *An. aruni* in Zanzibar, *An. fuscivenosus* in Zimbabwe, and *An. brucei* in Nigeria.^{1,2}

The difficulty in differentiating these species morphologically has led to the search for a simple and rapid method for identifying members of the *An. funestus* group. Cytogenetic studies distinguished six species of the group,^{5,6} but this technique is highly sex- and stage-specific and only half-gravid females or fourth instar larvae can be identified. Molecular methods have been reported, but these too have had limitations. The polymerase chain reaction–single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) assay was able to identify four members of the *An. funestus* group.⁷ A PCR-based test was then developed to distinguish *An. funestus* from *An. rivulorum*.⁸ Recently, Koekemoer and others⁹ have developed a

species-specific PCR assay able to rapidly identify five of the most commonly found members of the *An. funestus* group: *An. funestus*, *An. rivulorum*, *An. lesoni*, *An. parensis*, and *An. vaneedeni*.

This diagnostic PCR is based on interspecies variations in the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the ribosomal DNA (rDNA). However, ITS2 sequences used to develop the species-specific primers were obtained from field mosquitoes collected only in southern and eastern Africa. For species whose distribution extends far beyond the sampling zone, such as *An. funestus*, *An. rivulorum*, and *An. lesoni*, validation of the assay is highly recommended using specimens from other African areas.

Anopheles funestus specimens collected in Burkina Faso, Senegal, Kenya,¹⁰ and Madagascar⁹ exhibited highly conserved ITS2 sequences and were thus correctly identified using the PCR protocol reported by Koekemoer and others.⁹ Conversely, Hackett and others⁸ provided evidence for high amounts of sequence divergence between *An. rivulorum* specimens from western and southeastern Africa, suggesting cryptic speciation. Furthermore, to date, only *An. lesoni* specimens from southern Africa have been investigated, although this species is widespread throughout the continent.

In this paper, we present data on the *An. funestus* group from Cameroon in central Africa, in particular on species identified as *An. rivulorum* and *An. lesoni* that are commonly found in sympatry with *An. funestus* in certain parts of this country.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito sampling and morphologic identification. Collections were made in northern Cameroon in December 2001 and January 2002, and in South Africa between 1997 and 2002. Anopheline larvae were collected in the tributaries of the Benoue River where Mouchet and Gariou¹¹ reported the presence of *An. rivulorum* and *An. lesoni*.

Morphologic identification was conducted on live specimens. Larvae identified morphologically as *An. lesoni* were preserved in 70% ethanol. A sample of the larvae identified

as *An. rivulorum* were reared to adulthood in our insectarium. Emerging adults were preserved and mounted on insect pins. Before mounting, 2–3 legs of these adults were removed, preserved in 70% ethanol, and stored at -20°C .

Adult mosquitoes were collected by indoor-spraying with insecticides in houses close to the rivers where larval collections were undertaken. Members of the *An. funestus* group were isolated from other anophelines according to the morphologic identification keys of Gillies and De Meillon and Gillies and Coetzee^{1,2} and preserved in dry form in tubes with desiccant and stored at -20°C . Control specimens of *An. rivulorum*, *An. vaneedeni*, *An. parensis*, and *An. lesoni* were collected in South Africa. They were identified morphologically and by SSCP.⁷

Extraction of DNA, PCR amplification, and sequencing of DNA. Genomic DNA, extracted from the last abdominal segment of larvae or from 1–2 adult legs following a slightly modified version of the protocol of Cornel and others,¹² was resuspended in sterile water. The ITS2 and D3 regions of the rDNA were amplified from approximately 20 ng of template DNA in 50- μL reaction mixture containing 5 μL of 10 \times reaction buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France), 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM each deoxynucleotide triphosphate (Eurogentec, Herstal, Belgium), 0.5 units of *Taq* DNA polymerase (Qiagen), and 20 pmol each of forward and reverse primers.

Consensus ITS2a and ITS2b primers¹³ were used to amplify the ITS2 region. Primers D3a and D3b^{7,14} were used to amplify the variable D3 domain of the 28S rDNA subunit. The sequences of these primers are ITS2a: 5'-TGTGAACTG-CAGGACACAT-3' (forward), ITS2b: 5'-TATGCT-TAAATTCAGGGGGT3' (reverse), D3a: 5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3' (forward), and D3b: 5'-TCGGAAGGAACAGCTACTA-3' (reverse).

The PCR conditions included an initial denaturation step at 94°C for three minutes, followed by 36 cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, with a final extension step at 72°C for 10 minutes. After amplification, 5 μL of the PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ethidium bromide. Bands were revealed and photographed under ultraviolet light. After electrophoresis, the remaining PCR products were used for sequencing in both directions with the previous forward and reverse primers. Using CAP™ (InfobioGen, Evry, France), we compared the sequences of complementary strands for each sample. Multiple alignment was performed using CLUSTLAW™ and EDTLAN™ (available at <http://infobioGen.fr>). Genetic distances between haplotypes¹⁵ were computed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis 2 (MEGA2)¹⁶ software under the pairwise deletion option and using the Kimura 2-parameters¹⁷ correction to take into account multiple hits.

RESULTS

Characterization of field specimens collected in Cameroon. Five larvae were identified morphologically as *An. lesoni*. They were collected in December 2001 in three different rivers that cross the track passing through Poli at the level of the Wante, Gombo, and Dakidongo villages ($8^{\circ}28'N$, $13^{\circ}18'E$; $8^{\circ}30'N$, $13^{\circ}70'E$; and $8^{\circ}30'N$, $13^{\circ}60'E$, respectively). These brooks are non-permanent and were flowing gently at

the time of collection, at the beginning of the dry season. The larvae were found at the edges of the brooks, in dense standing vegetation. Some larvae of *An. funestus* were also found in these breeding sites. Their identification was first based on morphology, then confirmed by the species-specific PCR developed by Koekemoer and others,⁹ thus providing evidence for accuracy of this PCR assay in identifying *An. funestus* and *An. lesoni* from Cameroon.

According to Gillies and De Meillon,² *An. rivulorum* is morphologically very close to *An. brucei* at the adult stage and both species are identical at the larval stage. Approximately 30 larvae were identified morphologically as *An. rivulorum-brucei*. They were found in December 2001 and January 2002 in the Boki River, at its point of crossing with the road leading from Ngaoundere to Garoua ($8^{\circ}42'N$, $13^{\circ}33'E$). These larvae were breeding at the edge of the river where the water was flowing very gently in short but dense emerging vegetation. *Anopheles funestus* larvae were also found at the same place. Eight larvae were preserved in alcohol while others were reared to adulthood. Among them, 11 reached the adult stage including seven females and four males. The main morphologic features of these specimens were compared with reference characteristics for *An. rivulorum* and *An. brucei*. All specimens fitted the morphologic description of *An. rivulorum* given by Gillies and De Meillon,² except for the coloration of thoracic integument that was gray instead of orange-brown. Two morphologic variants were observed, similar to *An. rivulorum* with one or two pale spots on the upper branch of the fifth vein of wings. Thus, these specimens were distinct from *An. brucei*,¹⁸ and had one morphologic feature different from *An. rivulorum*.

When subjected to the PCR test of Koekemoer and others,⁹ all of these specimens showed weak and non-reproducible signals of the expected size, suggesting possible mutations in the region of primer annealing.

Analysis of the ITS2 sequences. Sequencing of the ITS2 region was carried out in 15 *An. rivulorum* specimens (5 larvae and 10 adults) and two *An. lesoni* larvae from Cameroon. Boundaries of the ITS2 region were identified through sequence comparison with previously determined anopheline 5.8S and 28S rDNA.^{12,19–23}

The ITS2 sequences were aligned with other sequences available on GeneBank: specimens morphologically identified as *An. rivulorum* from Burkina Faso, *An. rivulorum* from Kenya and South Africa (AF210725, AF180524, and AF2107724),⁸ *An. funestus* (AF062512),¹⁰ *An. lesoni* from South Africa (AY035719),⁹ *An. parensis* (AY035720),⁹ *An. vaneedeni* (AY035718),⁹ *An. minimus* A (AF230461),²⁴ and *An. moucheti* (AJ430581) (Kengne P, unpublished data).

No polymorphism was detected between both *An. lesoni* specimens from Cameroon (Figure 1). Only one single nucleotide substitution was detected by comparison with the consensus sequence for *An. lesoni* from South Africa (AY035719).⁹ This is a G to T transition in position 175, therefore located outside of the DNA region complementary to the *An. lesoni*-specific primer (Figure 1). Therefore, this point mutation did not prevent correct molecular identification of *An. lesoni* from Cameroon.

Alignment of ITS2 sequences of *An. rivulorum* specimens is shown in Figure 2. Nucleotide diversity was low ($\pi = 0.003$, $\text{SE} = 0.002$) among specimens from Cameroon ($n = 15$). The consensus sequence obtained from this alignment perfectly

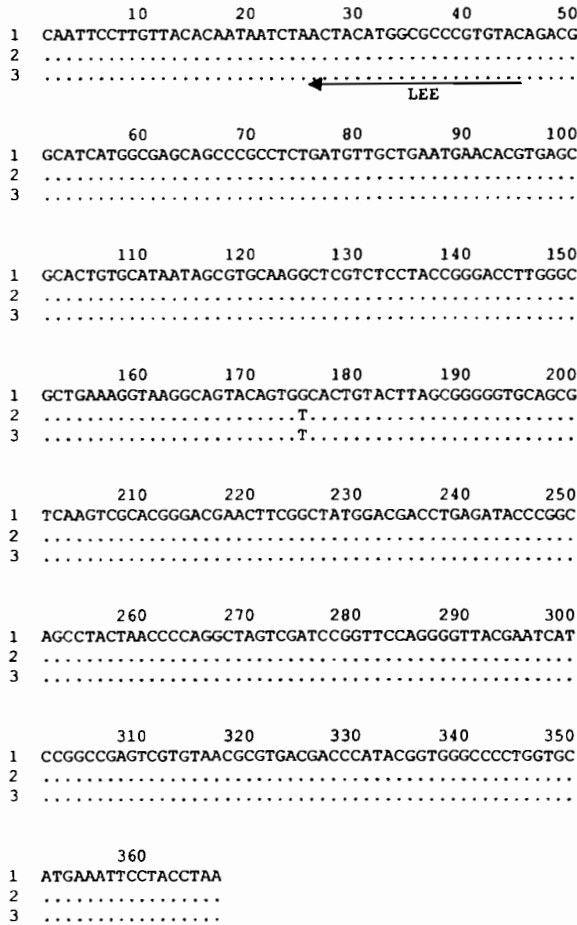


FIGURE 1. Alignment of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences of *Anopheles leesonii*. 1 = consensus sequence for South African *An. leesonii*;⁹ 2 and 3 = *An. leesonii* larvae from Cameroon. The arrow shows the position of the hybridization zone of the primer LEE (i.e., between positions 25 and 44). The size of the ITS2 region was 367 basepairs

matched the one obtained by Hackett and others⁸ with specimens from Burkina Faso.

Genetic distance between *An. rivulorum* specimens from western and central Africa (Burkina Faso–Cameroon: $d = 0$) on the one hand and the specimens from southern and eastern Africa (South Africa–Kenya: $d = 0.008$, $SE = 0.008$) on the other hand showed divergence rates were at a common level of intraspecific variability as observed in other anophelines.^{21,25} However, the average distance between consensus sequences from western–central and southern–eastern groups was 0.145 ($SE = 0.039$), a value in the range of interspecies divergence in the *An. funestus* group (Table 1) and other anophelines.^{9,12,25,26} Such level of divergence could not be attributed to geographic distance alone. Indeed, estimates of genetic distances were at least 18 times higher between Kenya and Cameroon than between Kenya and South Africa, despite comparable geographic distances between them ($\approx 3,000$ km). Therefore, these results provide support for the hypothesis of cryptic speciation within *An. rivulorum*.⁸

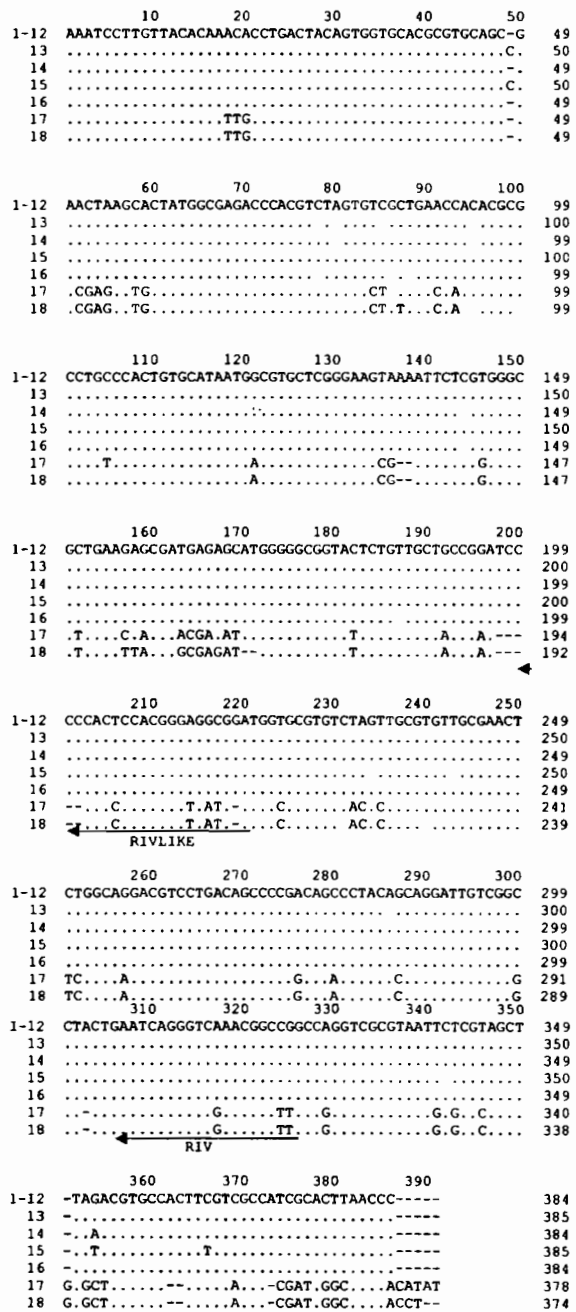


FIGURE 2. Alignment of internal transcribed spacer (ITS2) sequences of *Anopheles rivulorum*. 1–15 = *An. rivulorum* from Cameroon; 16 = consensus sequence of *An. rivulorum* from Burkina Faso;⁸ 17 = consensus sequence of *An. rivulorum* from Kenya;⁸ 18 = consensus sequence of *An. rivulorum* from South Africa.⁸ The arrows show the regions of annealing of primers RIV and RIVLIKE. The size of the ITS2 region was 384 basepairs for *An. rivulorum* from Cameroon and Burkina Faso and 375 basepairs for *An. rivulorum* from South Africa and Kenya.

TABLE 1

Pairwise nucleotide distances between species in the D3 (below the diagonal) and the internal transcribed spacer 2 (above the diagonal) regions in *Anopheles* mosquitoes*

	<i>An. rivulorum</i> -like	<i>An. rivulorum</i>	<i>An. leesoni</i>	<i>An. parensis</i>	<i>An. vaneedeni</i>	<i>An. funestus</i>	<i>An. minimus</i>	<i>An. mouchei</i>
<i>An. rivulorum</i> -like	–	0.145 (0.039)	0.430 (0.084)	0.628 (0.110)	0.564 (0.100)	0.492 (0.089)	0.421 (0.081)	0.886 (0.206)
<i>An. rivulorum</i>	0.096 (0.033)	–	0.500 (0.102)	0.529 (0.097)	0.474 (0.092)	0.391 (0.076)	0.431 (0.084)	0.903 (0.219)
<i>An. leesoni</i>	0.087 (0.034)	0.074 (0.030)	–	0.681 (0.130)	0.578 (0.102)	0.554 (0.101)	0.084 (0.027)	0.821 (0.162)
<i>An. parensis</i>	0.126 (0.041)	0.140 (0.043)	0.117 (0.041)	–	0.388 (0.068)	0.385 (0.070)	0.702 (0.127)	1.460 (0.592)
<i>An. vaneedeni</i>	0.128 (0.043)	0.142 (0.044)	0.118 (0.041)	0.011 (0.012)	–	0.123 (0.026)	0.582 (0.100)	1.515 (0.673)
<i>An. funestus</i>	0.157 (0.048)	0.157 (0.047)	0.147 (0.047)	0.036 (0.020)	0.048 (0.024)	–	0.559 (0.100)	1.313 (0.491)
<i>An. minimus</i>	0.114 (0.039)	0.074 (0.031)	0.024 (0.016)	0.117 (0.041)	0.118 (0.041)	0.147 (0.047)	–	0.832 (0.157)
<i>An. mouchei</i>	0.084 (0.032)	0.059 (0.027)	0.061 (0.027)	0.144 (0.046)	0.145 (0.046)	0.131 (0.044)	0.061 (0.028)	–

* Values in parentheses are standard errors estimated by bootstrap analysis.

For this reason, we propose to provisionally refer to the taxon from western-central Africa as "*An. rivulorum*-like."

Analysis of the D3 region. The rDNA 28S D3 domain was sequenced in three *An. rivulorum*-like and three *An. leesoni* specimens from Cameroon, two *An. rivulorum*, two *An. leesoni*, and one *An. parensis* specimens from South Africa. Original sequences of the D3 region have been deposited in the GenBank database under the following accession numbers: AY257553 for *An. leesoni*, AY256345 for *An. rivulorum*, AY256346 *An. rivulorum*-like, and AY256347 for *An. parensis*. The D3 sequences available on GenBank for *An. vaneedeni* (AF007095), *An. funestus* (AF007094),²⁷ *An. minimus* A (AF416782), and *An. mouchei* (Kengne P, unpublished data) were included in the analysis. Nucleotide variability within the species *An. leesoni*, including specimens from South Africa and Cameroon, is nil.

Sequences in the taxa *An. rivulorum* and *An. rivulorum*-like showed very weak intragroup variability ($\pi = 0$ and $\pi = 0.011$, SE = 0.011, respectively). Genetic distances between recognized species ranged from 0.011, SE = 0.011 between *An. vaneedeni* and *An. parensis* to 0.157, SE = 0.047 between *An. rivulorum* and *An. funestus* (Table 1). The genetic distance separating *An. rivulorum* and *An. rivulorum*-like was 0.096, SE = 0.033, therefore strengthening the ITS2 findings.

Improving the PCR-based diagnostic assay. The set of species-specific primers defined by Koekemoer and others⁹ was supplemented with an additional primer allowing specific identification of the new taxon we described earlier in this report. This new primer was named RIVLIKE (Figure 2). Its sequence was 5'-CCG CCT CCC GTG GAG TGG GGG-3' with a melting temperature (Tm) of 60.7°C. It anneals in a region of the ITS2 sequence where 8 of 21 nucleotides allow distinction between both *An. rivulorum*, thus ensuring its specificity. The amplified PCR fragment characteristic of *An. rivulorum*-like is 313 basepairs long, allowing easy identification on regular agarose gels (Figure 3). The primers and the sizes of the diagnostic PCR products are summarized in Table 2.

With this additional primer, the PCR conditions were slightly modified compared with those recommended by Koekemoer and others⁹: final reaction volume was 25 μ L containing 2.5 μ L of 10 \times buffer including 15 mM MgCl₂, 5 pmol of each primer, 200 μ M of each dNTP, and 0.5 units of *Taq* polymerase unit. Amplification started with an initial denaturation step at 94°C for two minutes, followed by 36 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 45°C for 30 seconds, and elongation at 72°C for 40 seconds, with a final extension step at 72°C for five minutes. The PCR

products were loaded onto regular 2.5% agarose gels, electrophoresis was done at 120 V/250 mA for one hour, and diagnostic bands were visualized after staining with ethidium bromide.

The RIV primer, specific for *An. rivulorum* from South Africa and Kenya, anneals in a region where three mismatches hamper reliable amplification of the DNA from *An. rivulorum*-like specimens from Cameroon and Burkina Faso (Figure 2). Our updated PCR protocol showed that specimens of *An. rivulorum*-like from Cameroon consistently had a single band at 313 basepairs (Figure 3), while control *An. rivulorum* specimens from South Africa had the expected band at 411 basepairs. Thus, the PCR protocol described in this paper allows clear distinction between *An. rivulorum* from southeastern Africa and *An. rivulorum*-like from west-central Africa. Reliable and reproducible identification of *An. leesoni*, *An. parensis*, *An. vaneedeni*, and *An. funestus* specimens was also achieved, demonstrating that addition of the RIVLIKE primer and other modification we added to the protocol did not alter the sensitivity nor specificity of the assay.

Hybrid specimens were mimicked by mixing equal amounts of DNA from all possible combinations prior to amplification. Two bands of the expected sizes were obtained in all cases (Figure 4).

Implementation of the assay. A total of 45 adult females of the *An. funestus* group collected resting indoors in the vicinity of the prospected breeding sites were identified using the species-specific PCR described in this paper: 42 belonged to the species *An. funestus* and 3 were *An. leesoni*. The preva-

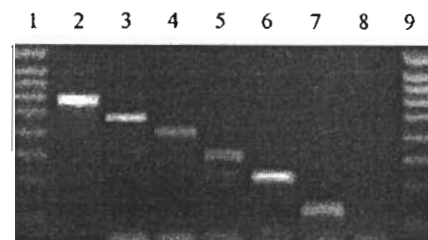


FIGURE 3. Amplified fragments using the species-specific polymerase chain reaction for the identification of members of the *Anopheles funestus* group. Lanes 1 and 9, 100-basepair DNA size marker ladder; lane 2, *An. vaneedeni*; lane 3, *An. funestus*; lane 4, *An. rivulorum*; lane 5, *An. rivulorum*-like; lane 6, *An. parensis*; lane 7, *An. leesoni*; lane 8, negative control. The sizes of the fragments of the ladder are 1,000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, and 100 basepairs.

TABLE 2

Polymerase chain reaction (PCR) primers and sizes of the amplified products for species diagnostic within the *Anopheles funestus* group*

Primers	Sequences (5' → 3')	T _m (°C)	Identified species	Size of the PCR product (bp)
UV	TGT GAA CTG CAG GAC ACA T	55.3	—	—
FUN	GCA TCG ATG GGT TAA TCA TG	52.4	<i>An. funestus</i>	505
VAN	TGT CGA CIT GGT AGC CGA AC	58.0	<i>An. vaneedeni</i>	587
RIV	CAA GCC GTT CGA CCC TGA TT	58.8	<i>An. rivulorum</i>	411
PAR	TGC GGT CCC AAG CTA GGT TC	60.5	<i>An. parensis</i>	252
LEES	TAC ACG GGC GCC ATG TAG TT	60.2	<i>An. lesoni</i>	146
RIVLIKE	CCG CCT CCC GTG GAG TGG GGG	60.7	<i>An. rivulorum-like</i>	313

* T_m = melting temperature; bp = basepairs.

lence of *An. funestus* in this sample is consistent with its well-known endophilic behavior. The presence of several *An. lesoni* females shows that this species, which is primarily exophilic, could also rest inside human dwellings. This had been reported earlier in a province of South Africa by Hargreaves and others.²⁸ The ITS2 region of the three adult *An. lesoni* were sequenced and were perfectly identical to those of the larvae. During this study, no adult *An. rivulorum-like* or *An. rivulorum* was collected inside houses.

DISCUSSION

In the present paper, based on morphologic and molecular data, we highlight the existence of a new taxon within the *An. funestus* group. Careful screening of sequence variation in specimens collected in Cameroon confirmed earlier findings of genetic heterogeneity within *An. rivulorum*.⁸ We thus complemented the assay with an additional primer, RIVLIKE, that allows one to distinguish the type species *An. rivulorum* originally described from Zimbabwe and Kenya²⁹⁻³¹ from the west/central African taxonomic unit we refer to as "*An. rivulorum-like*." Slight modifications of the protocol did not alter the sensitivity or specificity of the assay in identifying other members of the group.

The possibility that the cryptic taxon corresponded to *An. brucei* was discarded by morphologic observations that clearly showed discriminating criteria. *Anopheles brucei* was described only from its type locality (Lokoja in northern Nigeria) from a very limited number of specimens (six adults and

three 3 larvae),¹⁸ which are kept at the British Natural History Museum in London. Nothing is known to date about its geographic distribution and we do not envision processing archived specimens for genetic analysis. Additional collections from the type locality of *An. brucei* are needed to determine the taxonomic status of this species and assess in more detail its relationship to *An. rivulorum-like*.

Koekemer and others⁹ developed their assay from a limited number of specimens originating from a very restricted part of the species ranges. It was therefore necessary to assess accuracy of the primers for reliable amplification of the DNA of specimens from other areas in Africa. *Anopheles funestus* and *An. lesoni* specimens collected in Cameroon were correctly identified at different life stages, suggesting that the assay can probably be generalized to the whole geographic range of both species.

Anopheles lesoni has been classified in the *An. funestus* group based on morphologic and geographic criteria,² but some observations of its polytene chromosomes led Green⁵ to group *An. lesoni* with the Asian *An. fluviatilis/culicifacies* species (*An. minimus* was not included in this study). Our results are consistent with these findings and it is noteworthy that estimates of genetic distances between *An. lesoni* and *An. minimus* are significantly lower than those between *An. lesoni* and any other species of the *An. funestus* group (Table 1). To date, the classification of *An. lesoni* is still a moot point and further studies are needed to settle relationships between the African *An. funestus* and the Asian *An. minimus* groups.

All D3 and ITS2 sequences gathered so far for *An. lesoni* are roughly identical, both at a locale geographic scale (e.g., larvae from a single breeding site) or when populations are sampled across wide distances (i.e., between Cameroon and South Africa). Similar patterns were found within *An. funestus*, and were thoroughly discussed by Mukabayire and others.¹⁰ Clearly, genetic homogeneity in the ITS2 region seems to be the rule within species of the *An. funestus* group, providing support for 1) sensitivity and specificity of a diagnostic PCR assay based on such markers and 2) reliable use of this molecular tool throughout the species range. Furthermore, this gives weight to the statement that *An. rivulorum* is actually a mixture of at least two different taxonomic units.

Studies of the biology, ecology, and eventually epidemiologic importance as a vector of human malaria of the various members of the *An. funestus* group will be facilitated by their straightforward identification at all stages of development. Reliable species identification is indeed important to determine areas of sympatry and assess the relative role played by each species in the transmission of *Plasmodium*. Further-

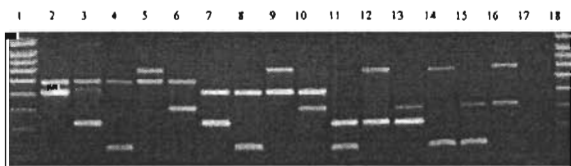


FIGURE 4. Amplification of hybrid DNA between members of the *Anopheles funestus* group. Lanes 1 and 18, 100-basepair DNA size marker; lane 2, *An. funestus* and *An. rivulorum*; lane 3, *An. funestus* and *An. parensis*; lane 4, *An. funestus* and *An. lesoni*; lane 5, *An. funestus* and *An. vaneedeni*; lane 6, *An. funestus* and *An. rivulorum-like*; lane 7, *An. rivulorum* and *An. parensis*; lane 8, *An. rivulorum* and *An. lesoni*; lane 9, *An. rivulorum* and *An. vaneedeni*; lane 10, *An. rivulorum* and *An. rivulorum-like*; lane 11, *An. parensis* and *An. lesoni*; lane 12, *An. parensis* and *An. vaneedeni*; lane 13, *An. parensis* and *An. rivulorum-like*; lane 14, *An. lesoni* and *An. vaneedeni*; lane 15, *An. lesoni* and *An. rivulorum-like*; lane 16, *An. vaneedeni* and *An. rivulorum-like*; lane 17, negative control. The sizes of the fragments of the ladder are 1,000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, and 100 basepairs.

more, availability of such diagnostic tools will improve our ability to evaluate efficacy of vector control measures implemented in areas where several species of the *An. funestus* group are present, a situation that could mislead evaluation of control programs.⁴

Received April 2, 2003 Accepted for publication May 29, 2003.

Acknowledgment: We thank Dr Lizette Koekemoer for providing the specimens from South Africa.

Financial support: This study was supported by the Paludisme (PAL)+ Program of the French Ministry of Research.

Authors' addresses: Anna Cohuet, Pierre Kengne, and Didier Fontenille, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France. Frederic Simard and Jean-Claude Toto, Laboratoire de l'Institut de Recherche pour le Développement d'Entomologie Médicale, Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, BP 288, Yaounde, Cameroon. Maureen Coetzee, Vector Control Reference Unit, National Institute for Communicable Diseases, Box 1038, Johannesburg 2000, South Africa and Department of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, School of Pathology of the National Health Laboratory Service and the University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa.

Reprint requests: Anna Cohuet, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34 394 Montpellier Cedex 5, France, Telephone: 33-4-67-04-19-24, Fax: 33-4-67-54-20-44, E-mail: anna.cohuet@mpl.ird.fr.

REFERENCES

- Gillies M, Coetzee M, 1987. *A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara*. Johannesburg: The South African Institute for Medical Research.
- Gillies M, De Meillon B, 1968. *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*. Johannesburg: The South African Institute for Medical Research.
- Wilkes TJ, Matola YG, Charlwood JD, 1996. *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol* 10: 108-110.
- De Meillon B, Van Eeden G, Coetzee L, Coetzee M, Meiswinkel R, Du Toit C, Hansford C, 1977. Observations on a species of the *Anopheles funestus* subgroup, a suspected exophilic vector of malaria parasites in north-eastern Transvaal, South Africa. *Mosq News* 37: 657-661.
- Green CA, 1982. Cladistic analysis of mosquito chromosome data (*Anopheles* (Celia) Myzomyia). *J Heredity* 73: 2-11.
- Green C, Hunt R, 1980. Interpretation of variation in ovarian polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *Anopheles parensis* Gillies and *Anopheles aruni*? *Genetica* 51: 87-195.
- Koekemoer LL, Lochouart L, Hunt RH, Coetzee M, 1999. Single-strand conformation polymorphism analysis for identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *J Med Entomol* 36: 125-130.
- Hackett BJ, Gimnig J, Guelbeogo W, Costantini C, Koekemoer LL, Coetzee M, Collins FH, Besansky NJ, 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol* 9: 369-374.
- Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, 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: 804-811.
- Mukabayire O, Boccolini D, Lochouart L, Fontenille D, Besansky NJ, 1999. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol* 8: 289-297.
- Mouchet J, Gariou J, 1961. Répartition géographique et écologique des anophèles au Cameroun. *Bull Soc Pathol Exot* 54: 102-108.
- Cornel AJ, Porter CH, Collins FH, 1996. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol* 33: 109-116.
- Beebe NW, 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.
- Sharpe RG, Hims MM, Harbach RE, Butlin RK, 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: 265-273.
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M, 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- Service M, 1960. A new species and variety of *Anopheles* from Nigeria, with notes on *Anopheles flavicosta* Edwards and *Aedes* (*Ae.*) *Wendyae* Service. *Proc R Entomol Soc Lond* 29: 85-90.
- Porter CH, Collins FH, 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 45: 271-279.
- Wesson DM, Porter CH, Collins FH, 1992. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol* 1: 253-269.
- Paskewitz SM, Wesson DM, Collins FH, 1993. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Mol Biol* 2: 247-257.
- Fritz GN, Conn J, Cockburn A, Seawright J, 1994. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol* 11: 406-416.
- Xu JN, Qu FY, 1997. Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. *Med Vet Entomol* 11: 134-138.
- Van Bortel W, Trung HD, Roelants P, Harbach RE, Backeljau T, Coosemans M, 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex. *Insect Mol Biol* 9: 335-340.
- Kengne P, Awono-Ambene P, Nkondjo C, Simard F, Fontenille D, 2003. Molecular identification of the *Anopheles niti* group of African malaria vectors. *Med Vet Entomol* 17: 1-9.
- Lounibos LP, Wilkerson R, Conn J, Hribar L, Fritz GN, Danoff-Burg J, 1991. Morphological, molecular, and chromosomal discrimination of cryptic *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) from South America. *J Med Entomol* 35: 830-838.
- Koekemoer LL, Coetzee M, Hunt RH, 1998. Hpa II endonuclease distinguishes between two species in the *Anopheles funestus* group. *Insect Mol Biol* 7: 273-277.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M, 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* 14: 181-189.
- Leeson H, 1935. Another anopheline of the *funestus* series from Southern Rhodesia. *Ann Trop Med Parasitol* 29: 69-70.
- Evans A, Garnham C, 1936. The *funestus* series of *Anopheles* at Kisumu and a coastal locality in Kenya. *Ann Trop Med Parasitol* 30: 511-513.
- Evans A, Leeson H, 1937. Notes on variation in *Anopheles rivulorum* Leeson in East Africa, with description of a new variety. *Ann Trop Med Parasitol* 31: 383-384.

Article 2 :

Article soumis à *Tropical Medicine and International Health*.

**HIGH MALARIA TRANSMISSION INTENSITY DUE TO *ANOPHELES FUNESTUS*
IN A VILLAGE OF SAVANNAH – FOREST TRANSITION AREA IN CAMEROON**

A. COHUET, F. SIMARD, C.S. WONDJI, C. ANTONIO-NKONDJIO, P. AWONO-
AMBENE & D. FONTENILLE

High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* in a village of Savannah – Forest transition area in Cameroon.

ABSTRACT

An entomological survey was conducted on vectors of malaria in a village of the forest-savannah transition area in Cameroon from February 1999 to October 2000. A total of 2,050 anopheline mosquitoes belonging to 8 species were caught after landing on human volunteers, by pyrethrum spray collections and in resting sites outdoors. *An. funestus* was the most abundant species (accounting for 91% of anophelines caught) followed by *An. gambiae* (7%). Polymerase chain reaction (PCR) identified all specimens of the *An. funestus* group as *An. funestus sensu stricto* and mosquitoes from the *An. gambiae* complex were mostly *An. gambiae sensu stricto* from the S molecular form. Malaria transmission was perennial with an entomological inoculation rate estimated at 172 infective bites per man during the period of study. *An. funestus* was responsible for 88 % of the total malaria transmission, with *Plasmodium falciparum* circumsporozoïte rate of 6.8% and an anthropophilic rate of 99.3%. These results confirm that in high agricultural activity areas, *An. funestus* can be, by far, the major malaria vector.

INTRODUCTION

The well-known *An. gambiae* has been studied in depth but, although it can arguably be considered the major vector of *Plasmodium* continent-wise (Gillies & De Meillon, 1968), it is frequently associated with other anophelines species that happen to overcome its importance in malaria transmission. This is particularly the case in equatorial Africa where malaria transmission is endemic with stable, perennial and very high levels of transmission. For example, in rural forested environment of South Cameroon, at least 5 species are involved in malaria transmission: from one village to another, sometimes separated by only some tens of kilometres, malaria transmission can be mainly due to *An. gambiae* (Manga *et al.*, 1997a; Meunier *et al.*, 1999; Wanji *et al.*, 2003), *An. moucheti* (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Manga *et al.*, 1995), *An. nili* (Carnevale *et al.*, 1992) or *An. funestus* (Manga *et al.*, 1997b).

An. hanckoki, can have a local importance in malaria transmission (Fontenille *et al.*, 2000; Wanji *et al.*, 2003). Among these malaria vectors, *An. funestus* is one of the most important. Its bionomics, closely related to human (anthropophilic trophic behaviour and endophilic feature), and its high susceptibility to human malaria parasites endows *An. funestus* with high vectorial ability, sometimes higher than *An. gambiae* (Fontenille *et al.*, 1997; Manga *et al.*, 1997b). Any control strategy to be implemented in field should consider the diversity of this complex vector system, and this is particularly true if innovative strategies based on release of genetically transformed mosquitoes with altered vector competence for *Plasmodium* are to be used. However there is a crucial lack of data on the population dynamics and role in transmission of any malaria vector other than members of the *An. gambiae* complex.

Moreover, it appears that each of these so-called “secondary” vectors also belong to species complexes or groups of morphologically very similar species with very different importance as malaria vectors, a feature that seems to be common to all malaria vectors including *An. gambiae*. Accurate species recognition is therefore required to target the true vector species and implement suitable (i.e., specific and selective) vector control measures. Accurate species identification within Anophelines mosquito species complexes is now possible through the use of straightforward, PCR-based, diagnostic tests. Such assay exist for more than a decade to identify species within the *An. gambiae* complex (Scott *et al.*, 1993) and has recently been developed for other African malaria vectors such as *An. funestus* (Cohuet *et al.*, 2003; Koekemoer *et al.*, 2002) and *An. nili* (Kengne *et al.*, 2003). By allowing more precise identification and characterization of vector populations in the fields, routine use of such tests will undoubtedly provide meaningful insights for the study of malaria transmission dynamics and vector species turnover, and eventually help gathering comprehensive knowledge of transmission heterogeneities commonly observed in sub-Saharan Africa. For example, such tool recently permitted to reveal that *An. parensis*, which is not a vector of human malaria, was almost the only member of the *An. funestus* group found resting inside human dwellings in a central area of Kenya (Kamau *et al.*, 2003).

We focused, here, on *An. funestus* in Cameroon, a country where three members of the group were described (Cohuet *et al.*, 2003; Mouchet & Gariou, 1961). We investigated the role of *An. funestus* in malaria transmission in a village where high densities of this species have been reported (Dia *et al.*, 2000).

MATERIAL AND METHODS

Study area

The study was carried out in the village of Nkoteng (4°30'N, 12°03'E) situated in a rural area of the central province of Cameroon, in a forest-savannah transition area. Several thousands inhabitants live in this village in traditional houses with mud walls and roofs of corrugated iron. Most people work at the locale sugar cane plantation. The climate is equatorial, with two rainy seasons, extending from March to June and September to November. Mean annual rainfall averaged over the period 1965-1996 was 1416 mm. In 1999, we recorded 1719 mm total rainfalls and 1213 mm in 2000 (see Figure 1). The mean monthly temperature between 1975 and 2000 was 24,8°C ranging from 23,4°C in July to 27°C in February. Some domestic animals such as pigs, sheep, goats, chickens and cows are kept in the village.

Field sampling and processing of mosquitoes

Entomological surveys were conducted every two months from February 1999 to October 2000. Adult mosquitoes were collected by human volunteers when landing on legs, for two consecutive nights from 1900 to 0600 hours in ten different indoor locations in the village. The human biting rate was expressed as the average number of mosquito bites per person per night.

Indoor-resting mosquitoes were collected inside bedrooms by pyrethrum spray in the afternoon, and outdoor-resting mosquitoes were collected using mouth aspirators in a pit shelter and an empty barrel.

Anophelines were sorted according to the morphological identification keys of Gillies & De Meillon (1968) and Gillies & Coetzee (1987). Bloodmeal spots were collected on filter paper after dissecting the stomach of freshly fed resting females, for feeding preference analysis. Each specimen was stored individually in tubes containing desiccant and kept at -20°C until processed in the laboratory.

Laboratory processing of Anophelines

The origin of the blood meal was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in Beier *et al.* (1988). The technique identified human, bovine, ovine, equine, pig and chicken blood.

The head and thorax of female Anophelines were tested for detection of the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* and *P. ovale* by ELISA, according to Burkot *et al.* (1984) and Wirtz *et al.* (1987). *P. vivax* Grassi & Feletti is not present in this region of Africa. The entomological inoculation rate (EIR) was calculated as the product of the human biting rate and the CSP rate for each sampling period and overall.

A representative sample of females from the *An. funestus* group and the *An. gambiae* complex, including all the specimens collected resting outdoors, was identified down to species using the PCR assays described by Cohuet *et al.* (2003) and Scott *et al.* (1993), respectively. Female *An. gambiae s.s.* were further identified down to their molecular form (M or S) according to Favia *et al.* (2001).

RESULTS

Identification and abundance of vector species

A total of 2,050 anopheline mosquitoes were caught. Seven Anopheline species or species complex were identified on morphological grounds: *An. funestus s.l.*, *An. gambiae s.l.*, *An. hancocki*, *An. moucheti*, *An. nili*, *An. wellcomei* and *An. ziemanni* (Table 1). *An. funestus s.l.* was the most abundant, accounting for 91% of total anophelines caught, followed by *An. gambiae s.l.* (7%). PCR identification within the *An. funestus* group revealed that all the specimens tested (N=352, including 133 specimens collected outdoors), were *An. funestus s.s.*. Of the *An. gambiae* complex females captured, 76 were identified by PCR. Two specimens were *An. arabiensis*, representing around 3% of *An. gambiae s.l.*. All others 74 specimens were *An. gambiae s.s.*, 73 of which belong to the S molecular form and only 1 showed an M profile. All 3 specimens collected outdoors were *An. gambiae s.s.* of the S molecular form.

Overall indoor human biting rate averaged over the study period was 3.4 bites/man/night for *An. funestus* and 0.4 for *An. gambiae s.l.*. Both species were present all year long, with marked seasonal fluctuations in abundance (Figure 1). Peak abundance was typically observed during the rainy seasons in April-June (4-5.6 bites/man/night for *An. funestus* and 0.8-1 bite/man/night for *An. gambiae*) while lowest densities were observed during the “long” dry season, in December-February. However, the human biting rate for *An. funestus* was always greater than 1 bite/man/night (Figure 1).

Feeding Preference

A total of 440 bloodmeal spots were tested by ELISA to determine the host it had been taken from. These were collected from both indoors and outdoors resting females, including 418 *An. funestus*, 20 *An. gambiae* and 2 *An. hanckoki*. All specimens had fed on human hosts but 3 *An. funestus* females had taken mixed blood meals and also contained ovine (1) or bovine (2) blood. Among these, one specimen was collected resting outdoors.

Circumsporozoïte Protein rate and entomological inoculation rate

In total, 1672 anopheline specimens belonging to the 8 species collected, were processed by ELISA. Only *An. funestus* and *An. gambiae* were found infected with *P. falciparum*. *P. ovale* was found in one *An. funestus*, together with *P. falciparum*. No *P. malariae* infection was found.

Plasmodium-infected *An. funestus* specimens were found at each time point. In total, 6.5 % (95% CI: 5.3 – 7.8) of *An. funestus* and 8.1% (95% CI: 3.5 – 15.3) of *An. gambiae* were positive by ELISA (Table 2). The difference was not statistically significant between both species ($X^2 = 0.39$, $df = 1$, $P > 0.05$). In *An. funestus* and in *An. gambiae* no significant difference of infection rate were found between samples of specimens indoor feeding, indoor resting or outdoor resting (X^2 test, $P > 0.05$).

From February 1999 to October 2000, the overall entomological inoculation rate was estimated at 172 infective bites per human. Malaria transmission occurred all year long (Table 2). Transmission intensity reached its peak in April 2000, with an average of 0.52 infective bites per human per night observed indoors. *An. funestus* is the major vector of *P. falciparum*, accounting for 88% of total transmission. *An. gambiae* also plays an active role in the transmission of malaria parasites in this locality, although its importance is, by far, overcome by *An. funestus*.

DISCUSSION

Longitudinal follow-up of malaria transmission dynamics for 20 months in the village of Nkoteng (South Cameroon) revealed that two common African mosquito vector species, *An. funestus* and *An. gambiae s.s.*, are involved and sustain perennial parasite inoculation to the local human population. The total entomological inoculation rate was estimated at 172 infective bites/human across the whole period of study, which, even if CSP ELISA overestimates the true transmission level by a factor of 1.1-1.9 (Fontenille *et al.*, 2001), remains high.

An. funestus is the major vector in the area, accounting for 88% of the total malaria transmission. *An. gambiae s.s.* was the only species of the *An. gambiae* complex found infected with malaria parasites but *An. arabiensis* is present in the area, although at a very low density. Five other Anopheline species were collected biting humans or resting inside human dwellings during our survey: *An. hancocki*, *An. moucheti*, *An. nili*, *An. wellcomei* and *An. ziemanni*. The three former species have been found infected with malaria parasites in other areas of Cameroon (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Fontenille *et al.*, 2000; Le Goff *et al.*, 1993; Manga *et al.*, 1995; Njan Nloga *et al.*, 1993; Wanji *et al.*, 2003). *An. nili* and *An. moucheti* in particular, were shown to be major human malaria vectors of locale importance, in Cameroon (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Carnevale *et al.*, 1992; Njan Nloga *et al.*, 1993) and in other West and Central African Countries (Dia *et al.*, 2003; Elissa *et al.*, 1999).

Density cycle of *An. funestus* depended partly on rainfall with a lower human indoor biting rate at the end of the dry season, around February. Presence of permanent swamps in the village would explain the year-round occurrence of *An. funestus*, as these represent typical breeding sites for this species. Densities of *An. gambiae* were fairly low (always <1 bite/person/night) but also varied along the year with a maximum during the first wet season (April - June).

Three members of the *An. gambiae s.l.* complex are found in Cameroon: *An. melas* colonises mangrove swamps along the Atlantic shore (South West of the country), *An. arabiensis* is the predominant species of the complex in the dry savannas of the North (southern border of lake Chad) and extends down to the evergreen forest,s edge and *An. gambiae s.s.* is widespread in the southern, more humid, part of the country. Our findings of few *An. arabiensis* specimens in Nkoteng represent the southern most report of this species in Cameroon, and probably points out the southern limit of its range in the country. In agreement with the acknowledged

ecotypic adaptation of chromosomal forms of *An. gambiae s.s.* (Coluzzi *et al.*, 1985; Toure *et al.*, 1998), all specimens identified so far from Nkoteng belong to the Forest chromosomal form, presenting mainly standard chromosome-2 arrangements (unpublished data). Both recently described M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* were represented in our sample, the S form being largely predominant. It has been advocated that these molecular forms represent incipient species but granting them with specific status is still a moot point (Black & Lanzaro, 2001; della Torre *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2003; Wondji *et al.*, 2002). Factors underlining their geographic distribution are still unclear, and deserve further investigation. Studies like ours will contribute to increase the body of data available on the distribution, relative prevalence and role in human malaria transmission of each form, providing baseline data for thorough assessment of the biological and epidemiological consequences of this genetic subdivision.

An. funestus s.s. is the only member of the *An. funestus* group identified in Nkoteng. All *An. funestus s.s.* from this village previously observed for chromosomal inversions (Dia *et al.*, 2000) belong to the Folonzo chromosomal form after assignment following Costantini *et al.* (1999). *An. lesoni* and *An. rivulorum*-like are known from Cameroon (Cohuet *et al.*, 2003; Mouchet & Gariou, 1961), but they were not collected in Nkoteng.

An. funestus was previously found from south to north of the country (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Manga *et al.*, 1997b; Mouchet & Gariou, 1961; Robert *et al.*, 1992; Wanji *et al.*, 2003) and was found as the main vector in some localities within the forest block (Manga *et al.*, 1997b). Our study showed that *An. funestus* could also have a major role in some malaria transmission in forest-savannah transition area. These findings underline the influence of local ecology on malaria transmission and the importance of breeding sites availability.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the inhabitants of Nkoteng village for their cooperation throughout the survey, and to the SOSUCAM (Société Sucrière du Cameroun) for providing meteorological data.

This study was funded by the French ministry of research throughout the PAL+ project.

REFERENCES

- Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, *et al.* (2002) High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *Journal of Medical Entomology* **39**, 350-355.
- Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, *et al.* (1988) Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Journal of Medical Entomology* **25**, 9-16.
- Black WC, Lanzaro GC (2001) Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s: introgressive hybridization, adaptive inversions, or recent reproductive isolation? *Insect Molecular Biology* **10**, 3-7.
- Burkot TR, Williams JL, Schneider I (1984) Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **33**, 783-788.
- Carnevale P, Le Goff G, Toto JC, Robert V (1992) *Anopheles nili* as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon. *Medical and Veterinary Entomology* **6**, 135-138.
- Cohuet A, Simard F, Toto JC, Kengne P, Coetzee M, Fontenille D (2003) Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **69**, 200-205.
- Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA (1985) Chromosomal inversion intergradation in incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di zoologia* **52**, 45-63.
- Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D (1999) Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* **41**, 595-611.
- della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, *et al.* (2002) Speciation within *Anopheles gambiae*-the glass is half full. *Science* **298**, 115-117.
- Dia I, Boccolini D, Antonio-Nkondjio C, Costantini C, Fontenille D (2000) Chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* from forest villages of South Cameroon. *Parassitologia* **42**, 227-229.
- Dia I, Diop T, Rakotoarivony I, Kengne P, Fontenille D (2003) Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, an. *arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean Zone (Ngari, Senegal). *Journal of Medical Entomology* **40**, 279-283.

- Elissa N, Karch S, Bureau P, *et al.* (1999) Malaria transmission in a region of savanna-forest mosaic, Haut-Ogooue, Gabon. *Journal of the American Mosquito Control Association* **15**, 15-23.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I, Louis C (2001) Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Molecular Biology* **10**, 19-23.
- Fontenille D, Lochouart L, Diagne N, *et al.* (1997) High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **56**, 247-253.
- Fontenille D, Meunier JY, Nkondjio CA, Tchuinkam T (2001) Use of circumsporozoite protein enzyme-linked immunosorbent assay compared with microscopic examination of salivary glands for calculation of malaria infectivity rates in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Cameroon. *Journal of Medical Entomology* **38**, 451-454.
- Fontenille D, Wanji S, Djouaka R, Awono-Ambene P (2000) *Anopheles hancocki*, vecteur secondaire du paludisme au Cameroun. *Bulletin de liaison et de documentation de l'OCEAC* **33**, 23-26.
- Gillies M, Coetzee M (1987) *A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara* The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Gillies M, De Meillon B (1968) *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region)*, 2^o Ed. edn. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Kamau L, Koekemoer LL, Hunt R, Coetzee M (2003) *Anopheles parensis*: the main member of the *Anopheles funestus* group found resting inside human dwelling in mwea area of central Kenya toward the end of the rainy season. *Journal of the American Mosquito Control Association* **19**, 130-133.
- Kengne P, Awono-Ambene P, Nkondjio CA, Simard F, Fontenille D (2003) Molecular identification of the *Anopheles nili* group of African malaria vectors. *Medical and Veterinary Entomology* **17**, 67-74.
- Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M (2002) A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **66**, 804-811.
- Le Goff G, Toto JC, Nzeyimana I, Gouagna LC, Robert V (1993) Les moustiques et la transmission du paludisme dans un village traditionnel du bloc forestier sud-Cameroun. *Bulletin de liaison et de documentation de l'OCEAC* **26**.
- Lehmann T, Licht M, Elissa N, *et al.* (2003) Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *Journal of Heredity* **94**, 133-147.

- Manga L, Bouchite B, Toto JC, Froment A (1997a) *Anopheles* species and the transmission of malaria in the forest/savannah transition zone in central Cameroon. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* **90**, 128-130.
- Manga L, Toto JC, Carnevale P (1995) Malaria vectors and transmission in an area deforested for a new international airport in southern Cameroon. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* **75**, 43-49.
- Manga L, Toto JC, Le Goff G, Brunhes J (1997b) The bionomics of *Anopheles funestus* and its role in malaria transmission in a forested area of southern Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **91**, 387-388.
- Meunier JY, Safeukui I, Fontenille D, Boudin C (1999) Malaria transmission in an area of future vaccination in equatorial forest of south Cameroon. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* **92**, 309-312.
- Mouchet J, Gariou J (1961) Répartition géographique et écologique des anophèles au Cameroun. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* **54**, 102-108.
- Njan Nloga A, Robert V, Toto JC, Carnevale P (1993) *Anopheles moucheti*, vecteur principal du paludisme au sud-Cameroun. *Bulletin de liaison et de documentation de l'OCEAC* **26**.
- Robert V, van den Broek A, Stevens P, *et al.* (1992) Mosquitoes and malaria transmission in irrigated rice-fields in the Benoue valley of northern Cameroon. *Acta Tropica* **52**, 201-204.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993) Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **49**, 520-529.
- Toure YT, Petrarca V, Traore SF, *et al.* (1998) The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* **40**, 477-511.
- Wanji S, Tanke T, Atanga SN, Akjonina C, Nicholas T, Fontenille D (2003) *Anopheles* species of the mount Cameroon region: biting habits, feeding behaviour and entomological inoculation rates. *Tropical Medicine and International Health* **8**, 643-649.
- Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, *et al.* (1987) Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bulletin of the World Health Organization* **65**, 39-45.
- Wondji C, Simard F, 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 Molecular Biology* **11**, 11-19.

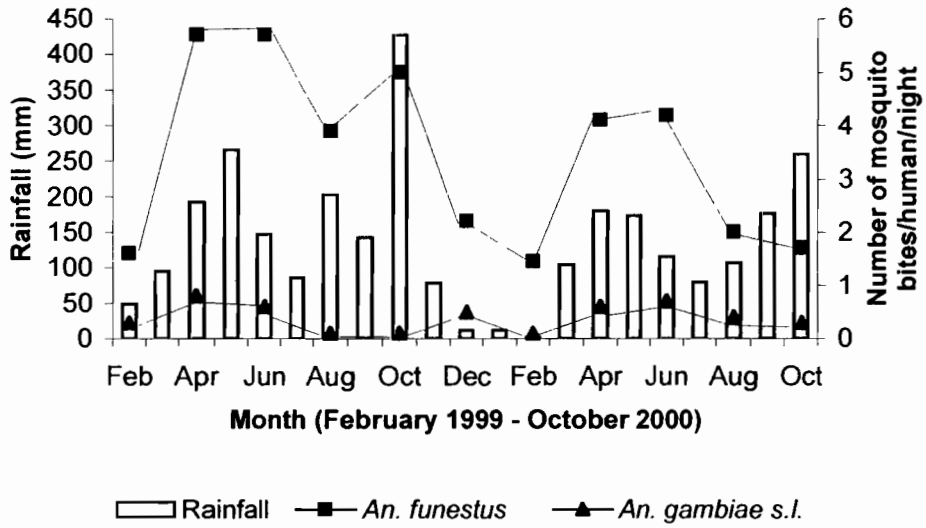


Figure 1 : Rainfall and indoor human biting rates for malaria vector species in Nkoteng, from February 1999 to October 2000.

Table 1: Number of Anophelines collected from February 1999 to October 2000 in Nkoteng village by three methods.

Mosquito species	Indoor feeding	Indoor resting	Outdoor resting	Total
<i>An. funestus</i>	767	968	133	1868
<i>An. gambiae s.l.</i>	86	57	3	146
<i>An. hanckoki</i>	22	1	0	23
<i>An. moucheti</i>	5	1	0	6
<i>An. nili</i>	5	0	0	5
<i>An. wellcomei</i>	1	0	0	1
<i>An. zeimanni</i>	1	0	0	1
Total	887	1027	136	2050

Table 2 : Monthly circumsporozoïte protein rate (CSPR in %) and entomological inoculation rate (EIR = number of infected bites/man/month) for *An. funestus* and *An. gambiae* in Nkoteng from February 1999 to October 2000.

Mosquito species		<i>An. funestus</i>			<i>An. gambiae s.l.</i>		
		Nt	CSPR	EIR	Nt	CSPR	EIR
1999	Feb	102	5.9	2.6	15	6.7	0.6
	Apr	274	5.8	10.0	22	4.6	1.1
	Jun	214	7.5	12.8	14	14.3	2.6
	Aug	198	5.6	6.7	2	0	0
	Oct	307	5.2	8.1	2	50	0.8
	Dec	73	6.9	4.7	8	0	0
2000	Feb	54	9.3	3.9	2	0	0
	Apr	117	9.4	11.6	12	25	4.1
	Jun	142	7.0	8.9	16	0	0
	Aug	27	7.4	4.6	1	0	0
	Oct	39	5.1	2.7	5	0	0
Total*		1547	6.5	153.2	99	8.1	18.4

Nt, number of mosquitoes tested by ELISA; CSPR, circumsporozoïte protein rate; EIR, monthly entomological inoculation rate. *: total number of mosquitoes tested, overall CSP rate, estimated EIR across 22 month (January 1999 – October 2000).

Seconde Partie :

**Isolement et localisation de marqueurs
microsatellites chez *Anopheles funestus* s.s.**

Article 3 :

Molecular Ecology Notes (2002), 2, p 498 – 500.

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE DNA
MARKERS IN THE MALARIA VECTOR *ANOPHELES FUNESTUS***

A. COHUET, F. SIMARD, A. BERTHOMIEU, M. RAYMOND, D. FONTENILLE
& M. WEILL

PRIMER NOTE

Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*

A. COHUET,* F. SIMARD,† A. BERTHOMIEU,‡ M. RAYMOND,‡ D. FONTENILLE* and M. WEILL‡
 *Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 05, France, †Laboratoire IRD d'Entomologie Médicale, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), BP 288, Yaoundé, Cameroun, ‡Institut des Sciences de l'Evolution, Laboratoire de Génétique et Environnement, CC065, UMR CNRS 5554, Université de Montpellier II, France

Abstract

Screening of the *Anopheles funestus* genomic DNA library detected 18 new sequences with dinucleotide tandem repeats. Primers were designed to amplify the loci and 14 out of 18 gave a repeatable and scorable amplification. Deviations from Hardy–Weinberg expectations were tested for each locus in a sample of 30 wild *Anopheles funestus* females. No heterozygote deficiency was detected for 11 loci of 14, thus revealing the absence of null alleles. The number of alleles per locus ranged from 5 to 15, and observed heterozygosity from 0.13 to 0.85.

Keywords: *Anopheles funestus*, malaria, microsatellites, polymorphism

Received 18 June 2002; revision received 12 July 2002; accepted 12 July 2002

Anopheles funestus is an important vector of human malaria in sub-Saharan Africa, being the main vector in some areas. Chromosomal inversion polymorphism suggests a genetic substructure within wild *A. funestus* populations, sometimes at a microgeographic scale (Costantini *et al.* 1999; Dia *et al.* 2000). Neutral molecular markers are needed to decipher further the genetic population structure. Twenty-two microsatellite DNA loci were recently characterized by Sinkins *et al.* (2000) but additional loci would be required for high throughput investigation of the distribution of neutral variability, within and between natural *A. funestus* populations. Development of new markers would eventually benefit gene mapping and 'quantitative trait loci' analysis in this important malaria vector. This study reports the characterization of a new set of polymorphic microsatellite markers.

Microsatellite loci were isolated as described by Estoup *et al.* (1993) using the detailed protocols of A. Estoup and O. Martin that are available at [HTTP://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm](http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm). Genomic DNA was extracted from a pool of 20 *A. funestus* specimens and was totally digested by *Sau3A*. Size-selected fragments (400–900 base pairs) were ligated into a pUC18 vector

(Pharmacia) digested by *Bam*HI, and plasmids were used to transform XL1-blue competent cells (Stratagene). Approximately 3000 recombinant clones were transferred onto Hybond-N + nylon membranes (Amersham) and screened with an equal mixture of (TC)₁₀ and (TG)₁₀ digoxigenine end-labelled oligonucleotide probes (Boehringer Mannheim). Plasmid DNA from 21 positive clones was purified using QIAprep Spin Miniprep Kit™ (Qiagen) and sequences of inserts were obtained with an ABI 310 sequencer (Perkin-Elmer).

Among 21 sequences, three were identical to formerly described loci (Sinkins *et al.* 2000). Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed flanking each of 18 remaining microsatellite sequences using the computer program OLIGO™ (version 4.0, National Biosciences). Primer pairs were chosen to amplify short (80–240 base pairs) PCR products.

Microsatellite variability was analysed using 30 females from Cameroon. DNA was isolated from single specimens following Collins *et al.* (1987). PCR amplifications were carried out in a 25- μ L reaction volume, from approximately 5–10 ng of template DNA. The reaction mixture contained 1 \times Qiagen PCR buffer (1.5 mM MgCl₂), 200 μ M each dNTP, 10 pmol of each primer, and 1 U Qiagen *Taq* Polymerase. The forward primer was 5' modified with either TET, HEX, or FAM fluorescent labels (Eurogentec) to allow multiplex

Correspondence: Anna Cohuet. Fax: +33 4 67 54 20 44; E-mail: anna.cohuet@mpl.ird.fr

Table 1 Characteristics of 14 microsatellite loci of *Anopheles funestus*

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'→3')	No of alleles	Allele size range (bp)	H_O	H_E	GenBank Accession no
FunD	(CT) ₁₈ GTCT(GT) ₆	F:GCTAACTACTCCGAAGCGCT R:GATCGCAAACTTCCGGTT	15	145–177	0.85	0.89	AY6008
FunE	(CA) ₇ TA(CA) ₃	F:GACCGTTCGTATCGTC R:ATCGAGTCACCCAATTCTCC	9	136–154	0.85	0.88	AY6009
FunF	(TG) ₉	F:GCCTTCAGTTTCGATTGGCG R:AATAAGATGCGACCGTGGC	7	104–118	0.79	0.78	AY6010
FunG	(TG) ₉	F:GAGCAAGCAGCTTACTGCAC R:ACGTTTCAGTGCACATCAATG	11	146–168	0.82	0.84	AY6011
FunH	(GT) ₁₁	F:ACCACCCGAAGGCATCTA R:ATTCCTTCGCGTCTACAGTG	10	134–164	0.57	0.85	AY6012
FunI	(CA) ₁₁	F:GTCAGGGTGGTACACGAATA R:GCATCTAACCCCTGCTGCTT	9	181–197	0.36	0.80	AY6013
FunJ	(GT) ₂ GC(GT) ₂₃	F:GGGCTCCATTCTAAATGCC R:GTGACGTTTCGGGATAAGG	10	190–212	0.86	0.84	AY6014
FunK	(GT) ₉	F:GCGCTTCGCAAAACATAC R:ACTCACACCCCATCTTTGTG	10	184–202	0.81	0.92	AY6015
FunL	(GT) ₈	F:AACAGTGAAGGCAAAATGTC R:GCACGGTTACCACTGCTCA	12	140–166	0.83	0.87	AY6016
FunN	(TG) ₈	F:ATCCGAAAACAGAACGGG R:GGTACCAACACGCAATA	5	234–244	0.13	0.48	AY6018
FunO	(CA) ₆ TA(AC) ₄	F:GCACACATTCAGGCAGC R:GCCACATTCGACCTTT	10	110–132	0.70	0.76	AY6019
FunP	(AC) ₉	F:GACCGCTTCAAAACGAG R:GTTCCGCATGTTCTTCTCTC	9	84–104	0.62	0.80	AY6020
FunQ	(TG) ₉	F:GCAACTGCTAGTAAATGTTTCC R:ACATTTCCACAATTTGCGC	7	84–98	0.65	0.75	AY6021
FunR	(TG) ₈ T(TG) ₃	F:GTAGTCGATGGTCCGTTGTG R:ACCGTCCCTTCCATCTGTGA	8	132–148	0.76	0.79	AY6022

The forward primer is labelled for each locus and the annealing temperature is 54 °C for all primer pairs. H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity under Hardy–Weinberg equilibrium, tested on 30 *Anopheles funestus* females; bold characters denote a significant ($P < 0.05$) heterozygote deficiency, taking multiple tests (Bonferroni method) into account, estimation of exact P -values by the Markov chain method

electrophoresis. Amplifications were performed using a Mastercycler gradient Eppendorf thermocycler under the following conditions: an initial denaturation at 94 °C for 2 min followed by 36 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 54 °C, 30 s at 72 °C and a final elongation step of 10 min at 72 °C. Fragment analyses were conducted with an ABI PRISM 377. Alleles were sized relative to an internal standard using GENESCAN version 3.1 (Applied Biosystems).

Of the 18 primer pairs, four failed to amplify or gave a banding pattern that was difficult to interpret (available sequences in GenBank: AY116005, AY116006, AY116007, AY116017). The 14 other loci yielded repeatable and scorable results (Table 1). All markers were polymorphic, showing five to 15 alleles. Expected and observed counts of homozygotes/heterozygotes were determined using GENEPOP version 3.2 (Raymond & Rousset 1995). These tests for homozygote excess were significant at three loci, which may suggest one or more null alleles operating at these loci. Linkage disequilibrium between all pairs of loci was not

detected ($P > 0.05$ Fisher's exact test) when using GENEPOP. The loci have not yet been localized relative to the known chromosomal inversions.

Acknowledgements

This work was supported by the PAL+ programme of the French Ministry of Research.

References

- Collins FH, Mendez AM, Rasmussen MO *et al.* (1987) A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **37**, 37–41.
- Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D (1999) Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia*, **41**, 595–611.
- Dia I, Boccolini D, Antonio-Nkondjio C, Costantini C, Fontenulle D (2000) Chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles*

500 PRIMER NOTE

- funestus* from forest villages of South Cameroon. *Parassitologia*, 42, 227–229
- Estoup A, Solignac M, Harry M, Cornuet JM (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21, 1427–1431.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248–249
- Sinkins SP, Hackett BJ, Costantini C *et al.* (2000) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology*, 9, 490–492

Article 4 :

Article accepté dans *Journal of Heredity* .

**A MICROSATELLITE PHYSICAL MAP OF THE AFRICAN HUMAN MALARIA
VECTOR *ANOPHELES FUNESTUS***

I. SHARAKHOV, O. BRAGINETS, O. GRUSHKO, A. COHUET, M. W.
GUELBEOGO, D. BOCOLLINI, M. WEILL, N'F. SAGNON, D. FONTENILLE
& N. BESANSKY

A microsatellite physical map of the African human malaria vector *Anopheles funestus***Abstract**

Microsatellite markers and chromosomal inversion polymorphisms are useful genetic markers for determining population structure in Anopheline mosquitoes. In *Anopheles funestus* ($2N=6$), only chromosome arms 2R, 3R and 3L are known to carry polymorphic inversions. The physical location of microsatellite markers with respect to polymorphic inversions is potentially important information for interpreting population genetic structure, yet none of the available marker sets had been physically mapped in this species. Accordingly, we mapped 32 polymorphic *An. funestus* microsatellite markers to the polytene chromosomes using fluorescent *in situ* hybridization, and identified 17 markers outside of known polymorphic inversions. Here we provide an integrated polytene chromosome map for *An. funestus* that includes the breakpoints of all known polymorphic inversions as well as the physical locations of microsatellite loci developed to date. Based on this map, we suggest a standard set of 16 polymorphic microsatellite markers that are distributed evenly across the chromosome complement, occur predominantly outside of inversions, and amplify reliably. Adoption of this set by researchers working in different regions of Africa will facilitate metapopulation analyses of this primary malaria vector.

Anopheles gambiae, *An. arabiensis* and *An. funestus* are the principal vectors of malaria in Africa. All are widely distributed from south of the Sahara Desert to northern South Africa (1). Successful vector control strategies for Africa must take into account the population genetic structure of these dominant mosquito species. *An. funestus* has received scant attention, not least because of the lack of molecular markers. Although understandable, the paucity of focused studies on *An. funestus* is inconsistent with its major role in malaria transmission during the dry season, when *An. gambiae* and *An. arabiensis* are less active (2).

Commonly used markers for inferring anopheline population structure include chromosomal inversions and microsatellites. Cytogenetic analysis has revealed incipient speciation within *An. gambiae* s.s. and *An. funestus* (3). Although a direct role for chromosomal inversions in the speciation process has not been established, abundant evidence suggests that particular chromosomal rearrangements are adaptive in different environments. In contrast, microsatellite markers are commonly assumed to evolve neutrally. The high polymorphism of microsatellite markers has facilitated studies at the population and infraspecific levels in these species (4-6), complementing cytogenetic studies. Studies of *An. gambiae* suggest that gene flow between populations may occur at different levels across the genome (7). In particular, reduced recombination and selection can influence loci within inversions or near inversion breakpoints, resulting in estimates of gene flow that may depart significantly from those based on loci elsewhere in the genome (8). Therefore, analysis of population genetic structure should be informed by the location of genetic markers with respect to polymorphic inversions. Comparison of patterns of variation among loci inside and outside of inversions may lend insight about levels of gene flow between populations as well as the role of chromosomal inversions in these populations.

Within the last few years, polymorphic microsatellite markers for *An. funestus* were developed at three institutions: the University of Notre Dame (9, B. Schemerhorn et al, in review), SUNY at Buffalo (10) and ISEM-Institut de Recherche pour le Développement (11).

Application of these loci at various locales throughout Africa has revealed high levels of polymorphism within *An. funestus* samples and significant differentiation between locales more than 150 km apart (Braginets et al., in review). Unfortunately, none of the loci developed had been physically mapped. In this study we have mapped 32 polymorphic *An. funestus* microsatellite markers to the polytene chromosomes. Based on this map, we suggest 16 as a reference set whose employment by different research groups will facilitate comparison and integration of population genetic studies conducted in different parts of Africa.

Physical mapping by fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

To obtain polytene chromosome preparations, indoor spray catches in villages near Ouagadougou, Burkina Faso were carried out in September of 1999 and December of 2001. Adults were sorted in the field under a dissecting microscope, and ovaries at the appropriate stage were dissected into fresh Carnoy's solution (ethanol:glacial acetic acid, 3:1). These were stored at -20C until processing. Ovaries were gently pressed with a cover slip in 50% propionic acid, dipped in liquid nitrogen, and sequentially dehydrated in 50%, 70%, 95%, and 100% ethanol. The quality of banding pattern of polytene chromosomes was examined under an Olympus BX60 phase-contrast microscope. Probes were prepared from ~100 ng of either microsatellite-containing plasmid or PCR product, produced using 1 pmol each of the forward and reverse universal M13 primers. Cycling conditions were 95C for 5 min; 25 cycles of 94C for 30 s, 70C for 2 min; 68C for 3 min. The DNA was labeled with Cy3-AP3-dUTP or Cy5-AP3-dUTP (Amersham) using the GIBCO BRL BioPrime DNA labeling system (Life Technologies) with dNTPs from the nick translation kit (Amersham), in half-volume reactions. The *in situ* hybridization was performed with the GIBCO BRL *in situ* Hybridization and Detection system, following the manufacturer's recommended protocol. After hybridization, chromosomes were washed in 0.2XSSC and counterstained with YOYO-1 or Propidium Iodide (Sigma) and

mounted in DABCO antifade solution (Sigma). Fluorescent signals were detected using a Bio-Rad MRC 1024 Scanning Confocal (2 channel/LaserSharp 3.2 program/ networked) System.

Integrated map of microsatellite markers and inversion breakpoints

Using FISH, we mapped *An. funestus* microsatellite clones on the five arms of the polytene chromosome complement (Fig. 1). Incorporation of different fluorescent labels allowed us to probe simultaneously with two different microsatellite clones. Of 40 clones used as probes, 31 mapped to single chromosomal locations on the *An. funestus* cytogenetic map, and 9 hybridized to multiple locations. Hybridization to multiple locations is not uncommon for microsatellite-containing clones (12). In addition, we found that sequence flanking AF16 was identical to corresponding sequence from cDNA 04_D01, which mapped to a unique location (13). Taken together, a total of 32 microsatellite markers could be assigned to single chromosomal locations (Fig. 2). Also indicated in Fig. 2 are the breakpoints of all 17 polymorphic inversions found to date in *An. funestus*. Eleven had been found on arm 2R (a, b, c, d, e, and h, Ref. 14; s, t, ab and au, Ref. 15; tz, Ref. 16), two on arm 3R (a and b, Ref. 14), and two on arm 3L (a and b, Ref. 14). Our ongoing cytogenetic studies of *An. funestus* in Burkina Faso revealed two new inversions, 3Lc and 3Rd, reported here for the first time. Precise positions of the breakpoints for inversion 2Rtz in Fig. 2 were communicated to us by I. Dia; those for 2Rh are based on Ref. 17. Photomicrographs of some polymorphic inversions that occur in Burkina Faso and Kenya are shown in Fig. 3.

Reference set of microsatellite markers

To facilitate population genetic studies on *An. funestus* we suggest a reference set of 16 microsatellite markers (Table 1). Composition of this set was influenced by a balance of factors

including reliable amplification, easy scoring, even coverage of all chromosome arms, and location preferably outside of known polymorphic inversions. We have included AFUB3, AFND40, AFND1 and FUN F, despite their location inside of inversions, for the following reasons. First, inversions 2Rb, 2Rab, 2Rc and 3Lb are relatively rare and do not occur widely in Africa (14, 15). Second, although inversion 3La has a broad geographic distribution, AFND1 and FUN F are in the middle of this relatively long inversion. Experimental data from *Drosophila* suggest that reduced levels of variation associated with inversions are confined to the vicinity of inversion breakpoints rather than to the middle of long inversions, where double crossovers and gene conversion can take place (18).

Application to the study of *An. funestus* chromosomal forms

In parts of West Africa, there is cytogenetic evidence for temporally and microspatially overlapping but nonpanmictic populations of *An. funestus* (19, W. Guelbeogo et al., unpublished). Provisionally named “Folonzo” and “Kiribina”, these are defined according to the joint distribution of inversions on 2R (a, s) and 3R (a, b) (see Ref. 19 for the algorithm). Of the fifteen microsatellites that mapped inside or near inversions, several were associated with these key inversions (Fig. 2). Notably, AFND5 is located near the proximal breakpoint of 2Ra and two additional loci, FUN D and FUN G, are positioned within 3Rb near the distal breakpoint. AFUB6, AFND32 and AFND37 are located near the breakpoints of inversion 2Rs. Therefore the possible correspondence between molecular and cytogenetic differentiation between the two forms can be tested using these six markers.

Conclusion

A significant problem encountered in vector population genetic studies is that various investigators use different markers or different methods that make data comparison difficult or impossible. Therefore it is extremely important to standardize methods and sets of markers (7, 20). In this study we have determined the locations of microsatellite markers with respect to the chromosomal banding pattern and the position of all known chromosomal inversions, and we suggest a standard set of microsatellite loci for future applications. Using common molecular markers by various investigators in different regions will lend much needed explanatory power to assessments of *An. funestus* population structure across Africa.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from NIH (R01-AI48842) to N.J.B.

References

- 1 Gillies, M.T. and De Meillon, B. (1968) *The Anophelinae of Africa South of the Sahara* , South African Institute for Medical Research
- 2 Fontenille, D. *et al.* (1997) High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 56, 247-53
- 3 della Torre, A. *et al.* (2002) Speciation within *Anopheles gambiae*--the glass is half full. *Science* 298, 115-7.
- 4 Kamau, L. *et al.* (1999) Analysis of genetic variability in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* using microsatellite loci. *Insect Mol Biol* 8, 287-97.
- 5 Donnelly, M.J., Simard, F. and Lehmann, T. (2002) Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends in Parasitol* 18, 75-80
- 6 Lehmann, T. *et al.* (2003) Population structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *J Hered* 94, in press
- 7 Krzywinski, J. and Besansky, N.J. (2003) Molecular systematics of Anopheles: from subgenera to subpopulations. *Annu Rev Entomol* 48, 111-39
- 8 Lanzaro, G.C. *et al.* (1998) Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci US A* 95, 14260-5
- 9 Sinkins, S.P. *et al.* (2000) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol* 9, 490-2.
- 10 Sharakhov, I.V., Braginets, O., Mbogo, C.N. and Yan, G. (2001) Isolation and characterization of trinucleotide microsatellites in African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes* 1, 289-292
- 11 Cohuet, A. *et al.* (2002) Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes* 2, 498-500
- 12 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
- 13 Sharakhov, I.V. *et al.* (2002) Inversions and gene order shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Science* 298, 182-5.
- 14 Green, C.A. and Hunt, R.H. (1980) Interpretation of variation in ovarian polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *A. parensis* Gillies, and *A. aruni*?. *Genetica* 51, 187-195

- 15 Boccolini, D., Sagnon, N. and Toure, Y.T. (1998) Chromosomal polymorphism in *Anopheles funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia* 40, 14
- 16 Lochouart, L., Dia, I., Boccolini, D., Coluzzi, M. and Fontenille, D. (1998) Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92, 607-12
- 17 Sharakhov, I.V., Sharakhova, M.V., Mbogo, C.M., Koekemoer, L.L. and Yan, G. (2001) Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics* 159, 211-8.
- 18 Depaulis, F., Brazier, L. and Veuille, M. (1999) Selective sweep at the *Drosophila melanogaster* *Suppressor of Hairless* locus and its association with the In(2L)t inversion polymorphism. *Genetics* 152, 1017-24.
- 19 Costantini, C., Sagnon, N.F., Ilboudo-Sanogo, E., Coluzzi, M. and Boccolini, D. (1999) Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* 41, 595-611
- 20 Wang, R., Kafatos, F.C. and Zheng, L. (1999) Microsatellite markers and genotyping procedures for *Anopheles gambiae*. *Parasitol Today* 15, 33-37.

Table 1. Chromosomal locations of the reference set of *An. funestus* microsatellite loci

	Locus*	Location (arm, subdivision, inside/outside inversions)	
1.	AFND12	X, 3B	OUTSIDE
2.	FUN Q	X, 5D	OUTSIDE
3.	AFUB3	2R, 8B	Inside of 2Rb, ab
4.	AFND40	2R, 9B	Inside of 2Rb, c, ab
5.	FUN O	2R, 18A	OUTSIDE
6.	AFUB11	2L, 20D	OUTSIDE
7.	AFND23	2L, 24A	OUTSIDE
8.	FUN L	2L, 24C	OUTSIDE
9.	AFUB10	2L, 26CD	OUTSIDE
10.	AFND41	3R, 29C	OUTSIDE
11.	AFND20	3R, 32D	OUTSIDE
12.	AFND7	3R, 33A	OUTSIDE
13.	AFND19	3R, 34A	OUTSIDE
14.	AFND1	3L, 43B	Inside of 3La, b
15.	FUN F	3L, 43A	Inside of 3La, b
16.	AFUB12	3L, 46C	OUTSIDE

*Note: for primer sequences of AFND1-AFND41 see (9, Schemerhorn et al, in review); for AFUB2- AFUB15 see (10); for FUN D - FUN R see (11).

Figure Legends

Fig. 1. FISH performed on the chromosomes of *An. funestus*. Chromosomes counterstained with the fluorophore YOYO-1 and hybridized with fluorescently labeled probes Cy5 (blue) and Cy3 (red) are shown.

Fig. 2. Locations of microsatellite loci (arrows) and inversions (brackets) with respect to the photomap of *An. funestus* polytene chromosomes (13). Inversions are shown in their standard and presumed ancestral orientation (14). Positions of microsatellites that hybridized to multiple locations (AFND2, AFND3, AFND8, AFND31, AFUB5, AFUB15, FUN H, FUN J and FUN N) are not shown.

Fig. 3. Microphotographs of polymorphic inversions of *An. funestus* collected from Burkina Faso (panels A, C, D, E, F) and Kenya (panel B). Note that inversions in panels A, D, and E have been recorded in both countries; inversion 2Rh (panel B) has not been observed in Burkina Faso, and those in panels C, F were not observed in Kenya.

Fig. 1

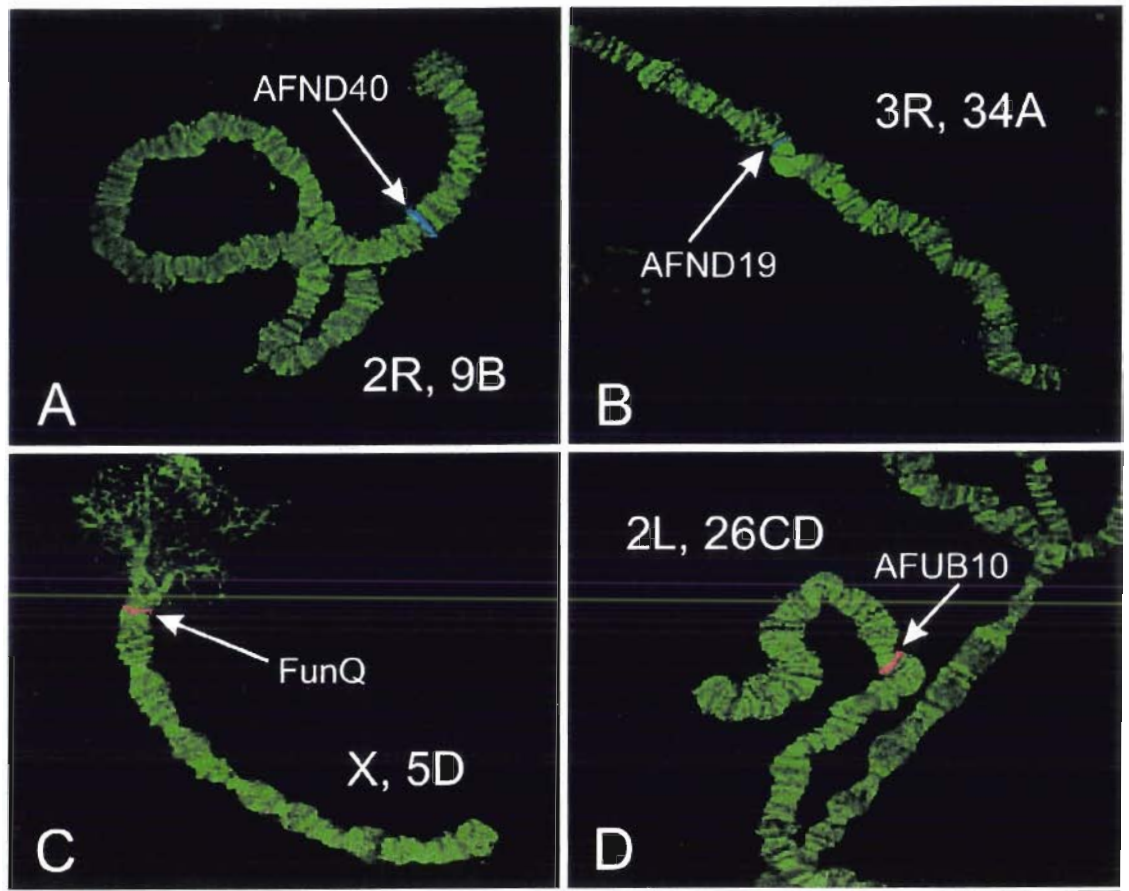


Fig. 2

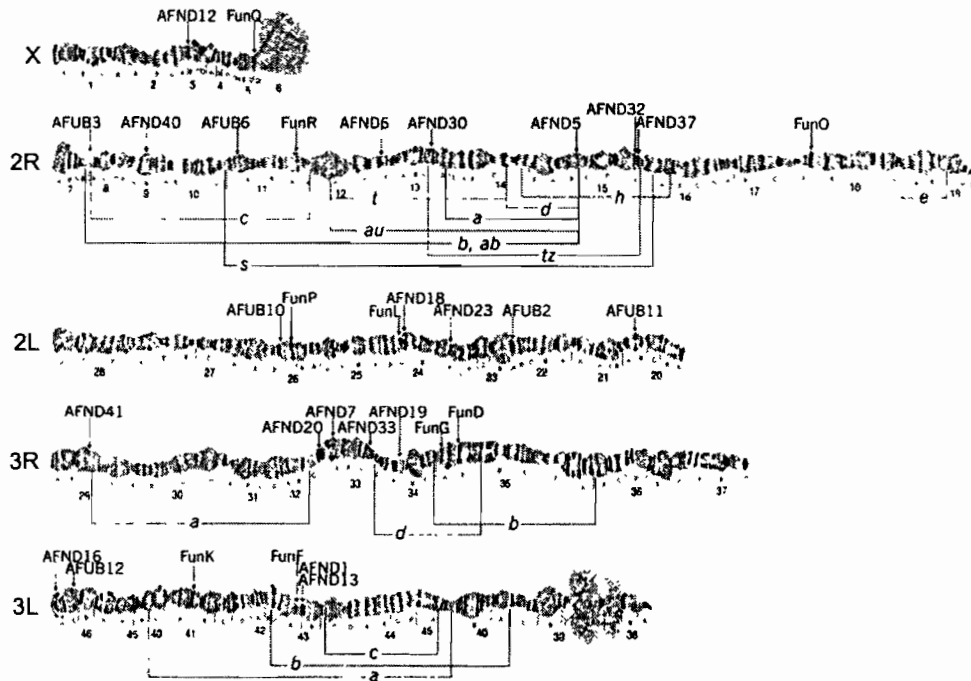
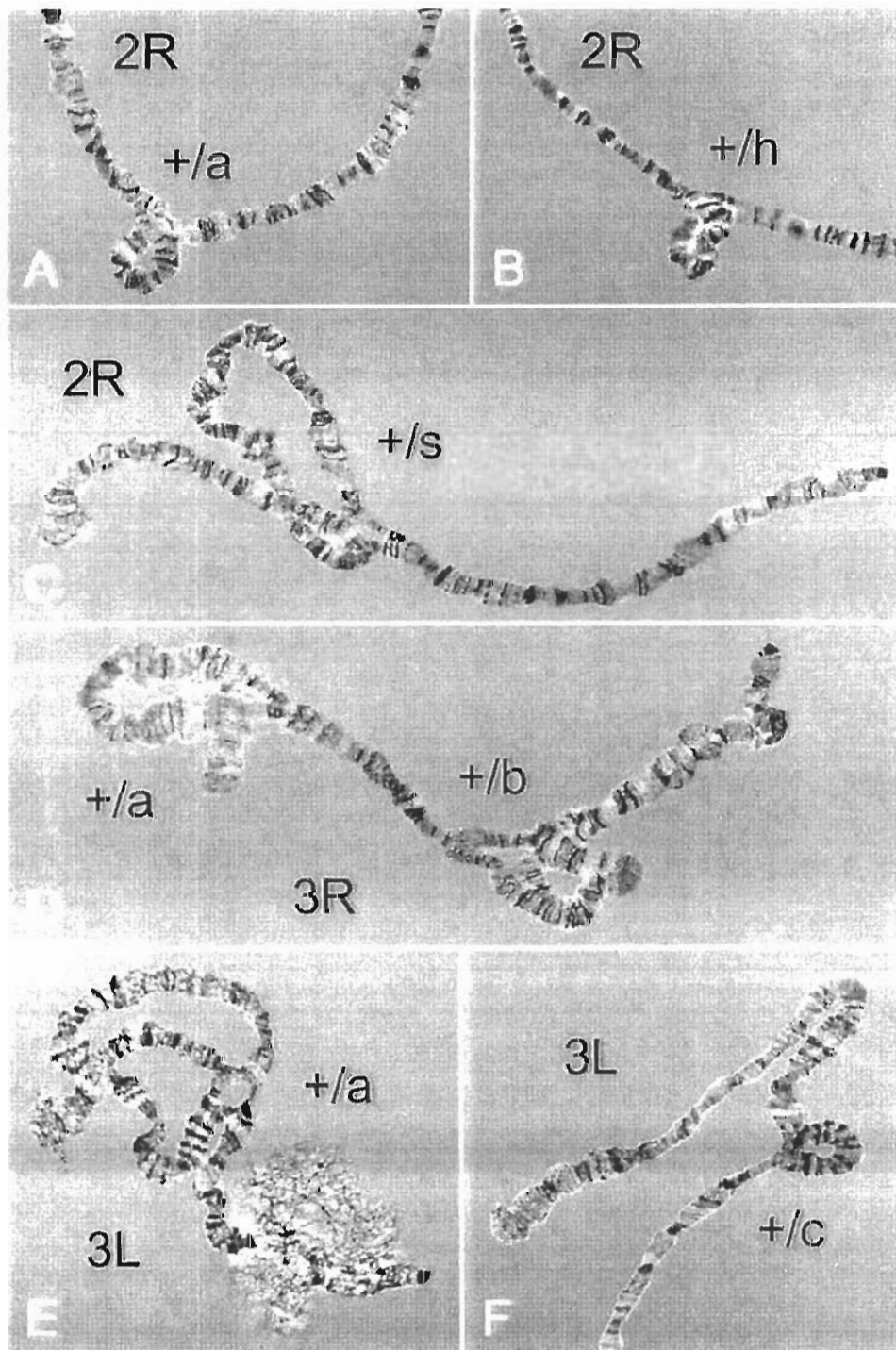


Fig. 3.



Troisième Partie :

**Structure génétique d'*Anopheles funestus* s.s. au
Cameroun et au Sénégal**

Article 5 :

Article soumis à *Genetics*.

**GENE FLOW BETWEEN CHROMOSOMAL FORMS OF THE MALARIA VECTOR
ANOPHELES FUNESTUS, IN CAMEROON, CENTRAL AFRICA**

**A. COHUET, I. DIA, F. SIMARD, M. RAYMOND, F. ROUSSET, C. ANTONIO-
NKONDJIO, P. AWONO-AMBENE, C. S. WONDJI & D. FONTENILLE**

Gene flow between chromosomal forms of the malaria vector *Anopheles funestus*, in Cameroon, Central Africa

ABSTRACT

Previous chromosomal data on the major malaria vector *An. funestus* have show a high degree of structuring within populations from West Africa and led to characterize two chromosomal forms named “Kiribina” and “Folonzo”. In central Africa, few data were available. We thus undertook to assess of genetic structure of *An. funestus* populations from Cameroon using chromosomal inversions and microsatellite markers. Microsatellite markers revealed no particular departure from panmixia within each local population, and a genetic structuring consistent with isolation by distance. On the opposite, cytogenetic studies demonstrated high levels of chromosomal heterogeneities, both within and between populations. Distribution of chromosomal inversions was not random and a cline of frequency was observed, according to ecotypic conditions : the standard arrangement was nearly fixed on all chromosomal arms in the northern and drier localities, while inversions were observed in high frequencies and up to fixation in southern, forest localities. Strong deficiency of heterokaryotypes was found in certain localities in the transition area, strengthening the subdivision of *An. funestus* in chromosomal forms. Altogether, these findings suggest gene flow between chromosomal forms of *An. funestus* in Cameroon and an adaptive role of chromosomal inversions to different environments in the country.

INTRODUCTION

Together with *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, *An. funestus* is responsible for most of human malaria transmission throughout sub-saharan Africa. *An. funestus* closely depends on humans : it is a highly anthropophilic mosquito that prefers to rest inside human dwellings. *An. funestus* has a high vectorial ability, sometimes higher than *An. gambiae* (Fontenille *et al.* 1997; Manga *et al.* 1997). Moreover, *An. funestus* often follows in peak abundance *An. gambiae* after the end of the rainy season, thereby extending malaria transmission into the dry season (Gillies and De Meillon 1968). However, despite such

epidemiological importance, *An. funestus* has received far less attention than members of the *An. gambiae* complex.

Knowledge of population structure in a major vector species is fundamental to an understanding of malaria epidemiology and the spread of insecticide resistance. It becomes crucial in the context of genetic control through the introduction of genes conferring refractoriness to the parasite (Collins and Besansky 1994) to foresee the spread of the gene(s) of interest.

In West Africa *An. funestus* populations showed a high level of genetic and behavioural heterogeneity. In Burkina Faso and in Senegal, departures from Hardy-Weinberg equilibrium for most chromosomal inversions and linkage disequilibrium between inversions located on different chromosomes suggest that *An. funestus* populations could be divided in chromosomal forms (Costantini *et al.* 1999; Dia *et al.* 2000a; Lochouart *et al.* 1998). In Burkina Faso, two chromosomal forms were defined: the first one, named “Kiribina”, was characterised by standard chromosomes, with the exception of inversion 2R_s; the second one, named “Folonzo”, was mainly polymorphic on chromosomal arm 2 and presented high frequencies of inversions 3R_a, 3R_b and/or 3L_a (Costantini *et al.* 1999; Guelbeogo *et al.* 2002). The Folonzo form might be more anthropophilic and endophilic than Kiribina (Costantini *et al.* 1999). Few data are available from Central Africa. Some populations from South Cameroon were analysed for chromosomal inversions and fall within the definition of the Folonzo form according to the algorithm proposed by Costantini *et al.* (1999), with additional inversions 2R_d and 2R_h (Dia *et al.* 2000b).

In East Africa however (namely, Angola and Kenya), chromosomal inversions were found polymorphic but, contrary to West Africa, heterokaryotypes were found at the expected Hardy-Weinberg frequencies in each location and no evidence for population subdivision was found (Boccolini *et al.* 2002; Kamau *et al.* 2003; Sharakhov *et al.* 2001a). Thus, chromosomal structuring of wild *An. funestus* populations appears highly variable throughout Africa.

The strong deficiency of heterokaryotypes observed in Burkina Faso was inferred to result from reproductive isolation between chromosomal forms (Costantini *et al.* 1999). However, karyotype frequencies themselves are poor markers for gene flow because chromosomal inversions are apparently strongly affected by natural selection in Anophelinae (Coluzzi *et al.* 1979) and other Diptera (Alvarez and Zapata 1997; Caceres *et al.* 1999). Therefore, heterokaryotypes deficits at chromosomal loci may reflect the outcome of environmental selective pressure on inversions, with no or little effect on gene flow in other (unlinked) parts of the genome.

To further explore this hypothesis, we studied the distribution of chromosomal inversions and assessed genetic variability at ten microsatellite markers in wild *An. funestus* populations collected along a North-South transect in Cameroon, encompassing different ecotypical conditions. Microsatellite DNA markers may be the best tool currently available to study anophelines population genetics. Such loci were recently isolated in *An. funestus* by several teams (Cohuet *et al.* 2002; Sharakhov *et al.* 2001b; Sinkins *et al.* 2000) and most of them were mapped on the genome, and positioned relatively to chromosomal inversions (Sharakhov *et al.* 2003), allowing selection of loci for a whole genome scan.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites

Mosquitoes were collected across Cameroon along a transect from South to North of the country, in Mfou (3°41'N, 11°32'E), Mbebe (4°19'N, 11°12'E), Ntui (4°26'N, 11°37'E), Nkoteng (4°30'N, 12°03'E), Fouban (5°47'N, 10°43'E), Bankim (6°20'N, 11°22'E), Tibati (6°28'N, 12°37'E), Ngaoundere (7°19'N, 13°35'E), Lagdo (9°30'N, 13°44'E) and Maga (10°51'N, 14°57'E) (Figure 1).

Humid forest in the South of the country gradually turns into arid savannas in the North. Cameroon can roughly be divided into four climatic zones, based on amount and distribution of annual rainfall (Olivry 1986). According to this classification, Mfou, Mbebe, Ntui, Fouban and Bankim lie within the equatorial climate zone, with mean annual rainfalls ranging from 1,600 to 1,800 mm. In this area two rainy seasons occur, from March to June and from September to November. Tibati, Ngaoundere and Maroua are located in the Sudanian climatic domain. Mean annual rainfall decreases from South to North, with 1,700 mm in Tibati down to 900 mm in Lagdo. Only one rainy season occur during the year, the number of rainy months decreasing from South to North. In Tibati the rainy season extends from March to November, and in Lagdo from May to October. Maga is in the Sudano-Sahelian climate domain, with mean annual rainfalls around 750 mm and one rainy season from May to September.

Mosquito collection and field processing of specimens

Specimens were collected between October 2000 and January 2003 either after landing on human volunteers or by indoor pyrethrum spraying. Specimens from Mfou, Mbebe and

Nkoteng were collected during the rainy season in May 2001; specimens from Ngaoundere, Lagdo and Maga, during the dry season in December 2001 and specimens from Ntui, Fouban, Bankim during the dry season in January 2003. Specimens from Tibati were collected during the rainy seasons of 2000 and 2002. Females from the *An. funestus* group were visually sorted from other anophelines according to morphological identification keys (Gillies and Coetzee 1987; Gillies and De Meillon 1968). All specimens were stored individually in tubes containing desiccant. Half-gravid females of the *An. funestus* group were dissected and ovaries were immediately fixed in ice-cold Carnoy's fixative (one part of glacial acetic acid and three parts of pure ethanol). The corresponding carcasses were stored in tubes with desiccant. Back in the laboratory, all tubes were stored at -20°C until processed.

DNA extraction and species identification

Genomic DNA was extracted from wings and legs of each individual mosquito following a slightly modified version of the protocol of Cornel & Collins (1996) and resuspended in sterile water. *An. funestus* s.s. females were included in the analysis after species identification was carried out by the recently described diagnostic PCR assay (Cohuet *et al.* 2003; Koekemoer *et al.* 2002). No other member of the *An. funestus* group was observed in our samples.

Microsatellite amplification

Ten microsatellite loci were selected from published *An. funestus* sequence data (Cohuet *et al.* 2002; Sinkins *et al.* 2000), based on high polymorphism, apparent absence of null alleles, mean allele sizes ranging from 110 to 220 bp, and cytological location allowing whole-genome scan (Figure 2). We used AFND5 and FunO located on chromosomal arm 2R ; FunL on chromosomal arm 2L; FunG, FunD, AFND19 and AFND20 on chromosomal arm 3R ; FunF on chromosomal arm 3L; AFND2 and AFND3 which precise cytological location is still undefined (Sharakhov *et al.* 2003). PCR amplification was carried out in 25 µl reaction volume, from 5-10 ng of template DNA. Reaction mixture contained 1X PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen, France), 200 µM each dNTP, 10 pmol of each primer, and 0.5 to 1 U Taq Polymerase (Qiagen, France). The forward primer was labelled in 5' with either TET, HEX or FAM fluorescent markers (Eurogentec, Belgium) to allow multiplex electrophoresis. Amplification was performed under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 2 min followed by 36 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 54°C, 30 s at 72°C and a final elongation step of 10 min at 72°C. Fragment analyses were conducted

with an ABI PRISM 377. Alleles were sized relatively to an internal size standard using GENESCAN version 3.1 (Applied Biosystems, France).

Polytene chromosomes preparation

Ovaries of half-gravid females were used to obtain squash preparations of the polytene chromosomes according to Hunt (1973). The preparations were examined under phase contrast microscopy and paracentric inversion karyotypes were scored according to the chromosomal map and nomenclature of Sharakhov *et al.* (2003).

Data analysis

For each microsatellite locus, deviations from Hardy-Weinberg expectations was tested in each location and overall. Cytogenetic data (i.e., karyotypes) were analysed in the same way, considering alternative chromosomal arrangements as different alleles at one locus as previously defined (Costantini *et al.* 1999; Dia *et al.* 2000b; Dia *et al.* 2000a; Lochouarn *et al.* 1998). Statistical significance was assessed by the exact probability tests available in GENEPOP 3.2 (Raymond and Rousset 1995). Statistical significance for linkage disequilibrium between pairs of microsatellite loci in the pooled population and within each population were computed by exact tests using GENEPOP 3.2. For specimens analysed both with chromosomal and microsatellite markers, cytogenetic data were included in the analysis.

Genetic differentiation between geographical populations was examined by F statistic (Wright 1951), calculated according to Weir and Cockerham (1984). Significance of F_{st} was assessed using the G-based exact test of genotypic differentiation (Goudet *et al.* 1996). The correlation between genetic and geographical distances was assessed by the regression of $F_{st}/(1-F_{st})$ on the logarithm (ln) of geographical distance (Rousset 1997), and tested using the Mantel test available in GENEPOP.

Global tests were employed to evaluate significance of multiple tests. Fisher's combination of probabilities test was implemented to assess statistical significance of mean F_{is} and F_{st} estimates (across loci or across samples). The sequential Bonferroni procedure (Holm 1979) can detect a single test-specific departure when multiple tests are performed: it was applied to evaluate significance of locus-specific departures within populations.

RESULTS

Chromosomal diversity and inversions distribution

Cytological analysis was conducted in six villages: Ntui, Nkoteng, Bankim, Tibati, Ngaoundere and Lagdo along the transect from South to North (Figure 1). All inversions found in Cameroon are schematised in Figure 2. No inversion was found on chromosomal arm 2L or on the X heterosome in accordance with other studies on this species. Polymorphism on chromosome arm 2R was low, with only three inversions observed (2*Ra*, 2*Rd* and 2*Rh*). As 2*Ra*, 2*Rd* and 2*Rh* could not be present together on one chromatide because of entanglement, we treated them as different alleles at the same locus. Two independent inversions were observed on arm 3R (3*Ra* and 3*Rb*) and a single inversion was observed on arm 3L (3*La*).

All three specimens karyotyped in Nkoteng were homozygous for inversions 3*Ra*, 3*Rb* and 3*La*. Inversions 2*Rh* and 2*Rd* were observed on arm 2R. As 45 specimens previously analysed in this village showed identical karyotypes, we could consider this population as fixed for the inversions 3*Ra*, 3*Rb* and 3*La* and that two inversions, 2*Rh* and 2*Rd*, exist on arm 2R (Dia *et al.*, 2000a).

Inversions 2*Rh* and 2*Rd* were found in Nkoteng, Ntui and Tibati. Inversion 2*Rd* was always found at the heterozygote state with inversion 2*Rh* as previously recorded in this region (Dia *et al.*, 2000a). Inversion 2*Ra* was observed in only two sampling sites (Ntui and Bankim). The frequency of the standard (2R+) arrangement increased in northern populations and was fixed beyond Ngaoundere (Table 1). Inversions 3*Ra* and 3*Rb* were fixed in Nkoteng and absent in Lagdo where only the standard (3R+) arrangement was found. Clinal frequencies were found in localities in-between. Inversion 3*La* was fixed in Ntui and Nkoteng and its frequency decreased in northern populations until be rare in Lagdo. Clinal distribution of chromosomal inversions was therefore observed, on chromosomal arms 2R, 3R and 3L, inversions being more represented in villages from forested areas, while standard arrangements are more frequently found in drier savannas, with a gradient of frequencies along the latitudinal transect (Figure 3).

When considering all karyotyped specimens as belonging to a single population, Hardy-Weinberg equilibrium was significantly rejected ($P < 10^{-4}$) for all chromosomal inversions with a deficit of heterozygotes (Table 1, "All"). All pairs of chromosomal inversions were in linkage disequilibrium (Table 2).

According to the algorithm proposed by Costantini *et al.* (1999), all specimens from Nkoteng and Ntui belong to the Folonzo form and all these from Lagdo belong to Kiribina. Both chromosomal forms were found in Bankim, Tibati and Ngaoundere, within the transitional zone between forest and savannas.

In Tibati, where sample size was appropriate for subsequent analysis, significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium was observed for all inversions due to a deficit of heterokaryotypes. Hardy-Weinberg equilibrium was re-established when individuals were assigned to chromosomal forms according to Costantini *et al.* (1999). Linkage disequilibrium between all pairs of inversions was highly significant ($P < 0.01$) in Tibati: 2Rd, 2Rh, 3Ra, 3Rb and 3La were almost always associated all together while arrangements 2R+, 3R+ and 3L+ occurred together in the same individuals, despite arms 2R and 3R are on two different chromosomes. Such pattern is consistent with the subdivision of *An. funestus* populations in distinct chromosomal forms in this location. In Ngaoundere a similar pattern was observed, but *Fis* values were not statistically significant, probably because of low sample size in this locality.

In contrast, in Bankim, Hardy-Weinberg expectations were not rejected, except for the inversion system on chromosomal arm 3L, and no linkage disequilibrium was significant between inversions.

Microsatellite diversity and neutral population structure

Genotypes at 10 microsatellite loci were determined for all karyotyped and additional *An. funestus* specimens. In total, 583 adult females, collected in ten villages spread along a North-South transect in Cameroon (Figure 1), were analysed. Four microsatellites loci mapped within chromosomal inversions: AF5 in 2Rd, 2Rh, and 2Ra, FunD and FunG in 3Ra, and FunF in 3La. Four other loci, FunO, FunL, AFND20 and AFND19, were located outside chromosomal inversions (Figure 2), while precise cytological location of AF2 and AF3 is still unknown (Sharakhov *et al.* 2003). All loci were highly polymorphic, showing between 8 and 32 alleles per locus (Table 3). Similar levels of variability were observed in all populations with a mean number of alleles per locus ranging from 10.3 to 11.6, and average observed heterozygosity across all loci ranging from 0.72 to 0.81.

When all samples were pooled together and considered as belonging to one single population, Hardy-Weinberg predictions were significantly rejected ($P < 0.05$, single test level) for six loci, with positive values of *Fis* for five of them (Table 3, "All"). Three out of

10 loci therefore showed significant deficit of heterozygotes after Bonferroni procedure, suggesting pooling of different genes pools (Wahlund effect). These findings were strengthened by analysis of linkage disequilibrium between loci as 14 out of 45 tests were significant ($P < 0.05$, single test), three of them remaining significant after Bonferroni procedure was applied (Table 3).

At the population level, slight deviations from Hardy-Weinberg expectations occurred. They remained significant in three cases after the sequential Bonferroni procedure was applied over loci and populations (locus AFND2 in the population of Ngaoundere and Maga, locus FunD in Fouban). The Hardy-Weinberg disequilibrium across all loci remained significant only in one population, Fouban and was due to one locus (FunD). Thus, no obvious departure from Hardy-Weinberg equilibrium was evidenced in any population and in particular none matched the deficiency of heterokaryotypes in Tibati. Exact tests for linkage disequilibrium within each population (450 pairwise comparisons) resulted in four significant values after correction by the sequential Bonferroni procedure, each in different populations. Several loci are relatively close to one another in the genome (AF20, AF19, FunD and FunG on arm 2R, see Figure 2), however our results suggest absence of statistical linkage. Together with Hardy-Weinberg equilibrium, linkage disequilibrium analysis revealed that each geographical population, including Tibati, might be considered as panmictic.

Linkage disequilibrium between microsatellite loci and chromosomal inversion systems was assessed considering only specimens for which both microsatellite genotype and karyotype was known (78 individuals). Among 40 pairwise linkage disequilibrium tests, 3 were significant ($P < 0.05$) at the single test level. None of them remained significant after application of the Bonferroni correction, showing no association between chromosomal inversions and microsatellite alleles (Table 2).

Pairwise *Fst* estimates between populations and across all loci are shown in Table 4, together with corresponding geographical distance between sampling sites. Average *Fst* based on the whole data set (10 loci and 10 populations) was low (0.0145) but highly significant ($P < 10^{-4}$, by Fisher's combined probability test) suggesting restricted gene flow between *An. funestus* populations at this geographical scale (Table 3). Except two loci (AFND3 and AFND20) all showed significant genetic differentiation ($P < 0.05$), with *Fst* estimates ranging from 0.0014 to 0.0375. Genome-wide differentiation was therefore demonstrated. Mean *Fst* estimates were computed separately for loci within (AFND5: 0.0066, FunG: 0.0212, FunD: 0.0267, FunF: 0.0090) and outside (FunO: 0.0169, AFND20: 0.0018, AFND19: 0.0150,

FunL: 0.0014) chromosomal inversions. Comparison by Mann Whitney test was non significant ($P > 0.05$) but power was clearly low. It suggests homogeneity between these groups of loci and negligible (if any) influence of chromosomal inversions on our estimates.

Isolation by distance was tested and statistically significant correlation between genetic (pairwise F_{st}) and geographic distance ($P < 10^{-4}$) was detected when considering the whole data set (Figure 3). These results suggest that the level of genetic differentiation between populations of *An. funestus* in Cameroon is due to a restriction of gene flow by geographical distance. To investigate whether one or few loci were responsible for the significant results, we repeated the analyses by keeping, in a stepwise procedure, all data except for one locus. Then, we considered only loci located within chromosomal inversions or only loci located outside inversions. The results remained significant regardless of which locus was removed or which group of loci was considered ($P < 0.05$). These data suggest that all loci contributed to the significant test of isolation by distance.

DISCUSSION

In *An. funestus* populations from Cameroon, chromosomal inversions were distributed along a cline of frequencies, with 3Ra, 3Rb, 2Rd, 2Rh and 3La more frequent in the equatorial forested area in the south of the country while standard arrangements were found in more arid regions, in the north of the country. Similar clinal distribution of chromosomal inversions following an environmental gradient was previously observed in other African malaria vectors. The biological significance of inversion polymorphism has indeed been studied in depth in two species of the *An. gambiae* complex, namely *An. gambiae s.s.* and *An. arabiensis*, and chromosomal inversions were found to be distributed according to ecotypic conditions (Coluzzi 1982; Coluzzi *et al.* 1985; Coluzzi *et al.* 1979; Petrarca *et al.* 2000; Toure *et al.* 1998). Such a distribution was explained by the fact that chromosomal inversions are strongly exposed to environmental selection, being involved in ecotypic adaptation, probably by protection of coadapted genes associations from recombination (Coluzzi *et al.* 1979). In *An. funestus* populations from Cameroon, the distribution of chromosomal inversions is therefore in agreement with a similar adaptive role: 2Rd, 2Rh, 2Ra, 3Ra, 3Rb and 3La would favour adaptation to equatorial climates, while standard arrangements would confer a better adaptive value under drier conditions.

In the forest-savannah transition area where chromosomal inversions were polymorphic, two contrasting patterns were found. In Tibati, a high deficit of heterokaryotypes and linkage

disequilibrium between chromosomal inversions suggested local subdivision of *An. funestus* in chromosomal forms. This is reminiscent of the situation in West Africa, which led to characterize the Folonzo and Kiribina forms (Costantini *et al.* 1999; Dia *et al.* 2000a; Lochouart *et al.* 1998). In Bankim, however, panmixia was not rejected, as formerly observed in Angola (Boccolini *et al.* 2002), Kenya (Kamau *et al.* 2003; Sharakhov *et al.* 2001a) and Madagascar (Le Goff, personal communication). This result confirmed that subdivision of *An. funestus* populations, in genetically distinct chromosomal forms, could not be generalized to the whole species range.

Microsatellite markers showed no departure from panmixia in any geographical population from Cameroon. Even in Tibati, where both Folonzo and Kiribina chromosomal forms were found and a high deficit of heterokaryotypes was observed, no subdivision of the gene pool was revealed by microsatellite loci. Furthermore, genetic differentiation between geographical populations was essentially due to geographical distance between collection sites, and similar levels of genetic differentiation were detected by loci located within and outside polymorphic chromosomal inversions. No linkage disequilibrium was evidenced between microsatellite loci and chromosomal inversions, as well as among loci located within inversions. Thus, homogeneity of the gene pool was revealed by microsatellite markers, in spite of a high degree of chromosomal structuring.

Several hypotheses could be proposed to explain the distribution of chromosomal inversions in *An. funestus*. These include (i) achieved or incipient speciation, (ii) ecological homogamy or (iii) negative environmental selection against hybrid heterokaryotypes.

According to the speciation hypothesis (i), reproductive isolation between (at least) two valid species, each one having its own set of chromosomal inversions, is achieved or nearly so. Thus, although certain chromosomal inversions may be shared between established species, each species would be genetically isolated from the other(s) and could be identified through species-specific, diagnostic inversions. This is the case for example between *An. gambiae* and *An. arabiensis*, both species being characterized by fixed inversions on chromosome X, with inversion 2La fixed in *An. arabiensis*, and polymorphic in *An. gambiae* (Coluzzi *et al.* 2002; Toure *et al.* 1998). In this case, evidences for genetic divergence between species/populations should be found throughout the genome, the amplitude of which will depend on time since lineage splitting. High amounts of genetic differentiation were indeed revealed between *An. gambiae* and *An. arabiensis* using, among others, microsatellite markers (Besansky *et al.* 2003; Kamau *et al.* 1998; Lanzaro *et al.* 1998; Wang *et al.* 2001).

Our data are in poor agreement with this hypothesis. First, hybrid heterokaryotypes were indeed found at expected frequencies in Bankim, as well as in several areas in southeast Africa. Second, microsatellites loci did not detect any evidence for population subdivision within local populations. Altogether, these results are inconsistent with complete reproductive isolation between chromosomal forms. The issue of incipient speciation is trickier to address, as sufficient time since splitting is required for genome-wide signatures of genetic differentiation to be observed. Ongoing studies within the species *An. gambiae* s.s. are good examples of such complexity, and contrasting results were observed depending on the molecular markers used and the populations studied (della Torre *et al.* 2002; Lanzaro *et al.* 1998; Wondji *et al.* 2002). The very same complexity seems to emerge from our data on *An. funestus* but, to date, any inference in this regard needs to be tentative and still requires further investigation. Recent availability of the complete genome sequence of *An. gambiae* will undoubtedly result in improvement of our ability to detect and assess relevance and biological significance of molecular signatures of speciation. Knowledge gained this way will eventually benefit studies on other malaria vectors, including *An. funestus*.

The second hypothesis, ecological homogeneity (ii), relies mainly on the adaptive value of inversions, alternative karyotypes developing in different types of larval breeding sites. Geographic distance between both types of breeding sites will define the probability for carriers of alternative karyotypes to actually meet and mate, as mating in *An. funestus* is known to occur before the first bloodmeal, shortly after emergence in the vicinity of breeding sites (Charlwood *et al.* 2003). Thus, although sympatry between chromosomal forms is observed at the adult stage, at least among blood-seeking or resting females, cross-mating will only occur in locations where both types of breeding sites are productive at the same time and close enough from one another to allow population admixture during mating. In this case, reproductive barriers between chromosomal forms occur at a premating stage and are highly environment-dependent. The situation may be reversible and/or variable throughout the year, depending on availability and spatial distribution of both types of breeding sites. Although our data are consistent with this hypothesis, additional cytogenetic studies and longitudinal follow-up of the chromosomal makeup of *An. funestus* populations in different areas of Africa, as well as in depth characterization of *An. funestus* biology and ecology (i.e., breeding site preference, dispersion, ...) are clearly needed.

Finally, (iii) *An. funestus* chromosomal forms may freely interbreed in nature, but huge environmental selection against hybrid heterokaryotypes would limit their development up to the adult stage. In other words, hybrid heterokaryotypes would be strongly selected against,

because there is no ecological niche in which they could develop (for example, no 'intermediate' breeding sites, see above). In this case, reproductive barriers between chromosomal forms occur at the post-mating level and essentially rely on fitness reduction in heterokaryotypic individuals. Here also, hybrids survival and hence, their overall frequency in natural populations, would essentially depend on local (microgeographic) environmental conditions. As such, and for still unclear reasons, selection might be relaxed in Bankim and the southeast African region, whilst acting at a much higher level throughout West Africa.

In conclusion, our study allowed to exclude the hypothesis of achieved speciation between chromosomal forms in *An. funestus* populations from Cameroon and would favour the effect of negative environmental selection to explain the lack of hybrid heterokaryotypes we observed in the face of genetic homogeneity (e.g. panmixia) revealed by (possibly neutral) microsatellite markers. As previously found in *An. gambiae s.s.* (della Torre *et al.* 2002; della Torre *et al.* 2001), we underlined the role of chromosomal inversions in ecological adaptation and the lack of concordance between chromosomal forms and reproductive units. However, ecological features involved in adaptation are still unclear and further studies are needed at both genetic and biological levels.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the French ministry of research throughout the PAL+ project. We would like to acknowledge the villagers for their cooperation throughout the survey.

REFERENCES

- Alvarez, G., and C. Zapata, 1997 Conditions for protected inversion polymorphism under supergene selection. *Genetics* **146**: 717-722.
- Besansky, N. J., J. Krzywinsky, T. Lehmann, F. Simard, M. Kern *et al.*, 2003 Semipermeable species boundaries between *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*: evidence from multilocus DNA sequence variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10818-10823.
- Boccolini, D., G. C. Carrara, P. J. Cani and C. Costantini, 2002 Preliminary data on *Anopheles funestus* chromosomal polymorphism in a peri-urban site of Western Angola. *Parassitologia* **44**: 22.
- Caceres, M., A. Barbadilla and A. Ruiz, 1999 Recombination rate predicts inversion size in Diptera. *Genetics* **153**: 251-259.
- Charlwood, J., R. Thompson and H. Madsen, 2003 Observations on the swarming and mating behaviour of *Anopheles funestus* from southern Mozambique. *Malar J* **2**: 2.
- Cohuet, A., F. Simard, A. Berthomieu, M. Raymond, D. Fontenille *et al.*, 2002 Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes* **2**: 498-500.
- Cohuet, A., F. Simard, J. C. Toto, P. Kengne, M. Coetzee *et al.*, 2003 Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg* **69**: 200-205.
- Collins, F. H., and N. J. Besansky, 1994 Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science* **264**: 1874-1875.
- Coluzzi, M., 1982 Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes., pp. 143-153 in *Mechanisms of Speciation*, edited by C. Barigozzi. Alan Liss Inc, New York.
- Coluzzi, M., V. Petrarca and M. A. Di Deco, 1985 Chromosomal inversion intergradation in incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.* **52**: 45-63.
- Coluzzi, M., A. Sabatini, A. della Torre, M. A. Di Deco and V. Petrarca, 2002 A polypene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* **298**: 1415-1418.
- Coluzzi, M., A. Sabatini, V. Petrarca and M. A. Di Deco, 1979 Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **73**: 483-497.

- Cornel, A. J., C. H. Porter and F. H. Collins, 1996 Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol* **33**: 109-116.
- Costantini, C., N. Sagnon, E. Ilboudo-Sanogo, M. Coluzzi and D. Boccolini, 1999 Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* **41**: 595-611.
- della Torre, A., C. Costantini, N. J. Besansky, A. Caccone, V. Petrarca *et al.*, 2002 Speciation within *Anopheles gambiae*-the glass is half full. *Science* **298**: 115-117.
- della Torre, A., C. Fanello, M. Akogbeto, J. Dossou-yovo, G. Favia *et al.*, 2001 Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae s.s.* in West Africa. *Insect Mol Biol* **10**: 9-18.
- Dia, I., D. Boccolini, C. Antonio-Nkondjio, C. Costantini and D. Fontenille, 2000b Chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* from forest villages of South Cameroon. *Parassitologia* **42**: 227-229.
- Dia, I., L. Lochouarn, D. Boccolini, C. Costantini and D. Fontenille, 2000a Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* **7**: 179-184.
- Fontenille, D., L. Lochouarn, N. Diagne, C. Sokhna, J. J. Lemasson *et al.*, 1997 High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* **56**: 247-253.
- Gillies, M., and M. Coetzee, 1987 *A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara*. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Gillies, M., and B. De Meillon, 1968 *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region)*. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Goudet, J., M. Raymond, T. de Meeus and F. Rousset, 1996 Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**: 1933-1940.
- Guelbeogo, W., D. Boccolini, N. J. Besansky, N. F. Sagnon and C. Costantini, 2002 Temporal variability in chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* from two villages near Ouagadougou, Burkina Faso (West Africa). *Parassitologia* **44**: 86.
- Holm, S., 1979 A simple sequential rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* **6**: 65-70.
- Hunt, R. H., 1973 A cytological technique for the study of *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* **15**: 137-139.

- Kamau, L., W. A. Hawley, T. Lehmann, A. S. Orago, A. J. Cornel *et al.*, 1998 Use of short tandem repeats for the analysis of genetic variability in sympatric populations of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Heredity* **80**: 675-682.
- Kamau, L., G. O. Munyekenye, L. L. Koekemoer, R. H. Hunt and M. Coetzee, 2003 A survey of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group from 10 sites in Kenya with special emphasis on population genetic structure based on chromosomal inversion karyotypes. *J Med Entomol* **40**: 664-671.
- Koekemoer, L. L., L. Kamau, R. H. Hunt and M. Coetzee, 2002 A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* **66**: 804-811.
- Lanzaro, G. C., Y. T. Toure, J. Carnahan, L. Zheng, G. Dolo *et al.*, 1998 Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14260-14265.
- Lochouart, L., I. Dia, D. Boccolini, M. Coluzzi and D. Fontenille, 1998 Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**: 607-612.
- Manga, L., J. C. Toto, G. Le Goff and J. Brunhes, 1997 The bionomics of *Anopheles funestus* and its role in malaria transmission in a forested area of southern Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**: 387-388.
- Olivry, 1986 *Fleuves et rivières du Cameroun*. Edition de l'ORSTOM, Bondy.
- Petrarca, V., A. D. Nugud, A. Elkarim, A. M. Haridi, M. A. Di Deco *et al.*, 2000 Cytogenetics of the *Anopheles gambiae* complex in Sudan, with special reference to *An. arabiensis*: relationship with East and West African populations. *Med Vet Entomol* **14**: 149-164.
- Raymond, M., and F. Rousset, 1995 GENEPOP Version 1.2. A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **26**: 248-249.
- Rousset, F., 1997 Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**: 1219-1228.
- Sharakhov, I. V., O. Braginets, O. G. Grushko, A. Cohuet, W. Guelbeogo *et al.*, 2003 A microsatellite physical map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. *J Hered*: In press.
- Sharakhov, I. V., O. Braginets, C. N. Mbogo and Y. Guiyun, 2001b Isolation and characterization of trinucleotide microsatellites in African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes* **1**: 289-292.

- Sharakhov, I. V., M. V. Sharakhova, C. M. Mbogo, L. L. Koekemoer and G. Yan, 2001a
Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the African malaria
mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics* **159**: 211-218.
- Sinkins, S. P., B. J. Hackett, C. Costantini, J. Vulule, Y. Y. Ling *et al.*, 2000 Isolation of
polymorphic microsatellite loci from the malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular
Ecology* **9**: 490-492.
- Toure, Y. T., V. Petrarca, S. F. Traore, A. Coulibaly, H. M. Maiga *et al.*, 1998 The
distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the
Anopheles gambiae complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* **40**: 477-511.
- Wang, R., L. Zheng, Y. T. Toure, T. Dandekar and F. C. Kafatos, 2001 When genetic distance
matters: measuring genetic differentiation at microsatellite loci in whole-genome scans
of recent and incipient mosquito species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10769-10774.
- Weir, B., and C. Cockerham, 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population
structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Wondji, C., F. Simard and D. Fontenille, 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**: 11-19.
- Wright, S., 1951 The genetical structure of populations. *Ann. Eugen* **15**: 323-354.

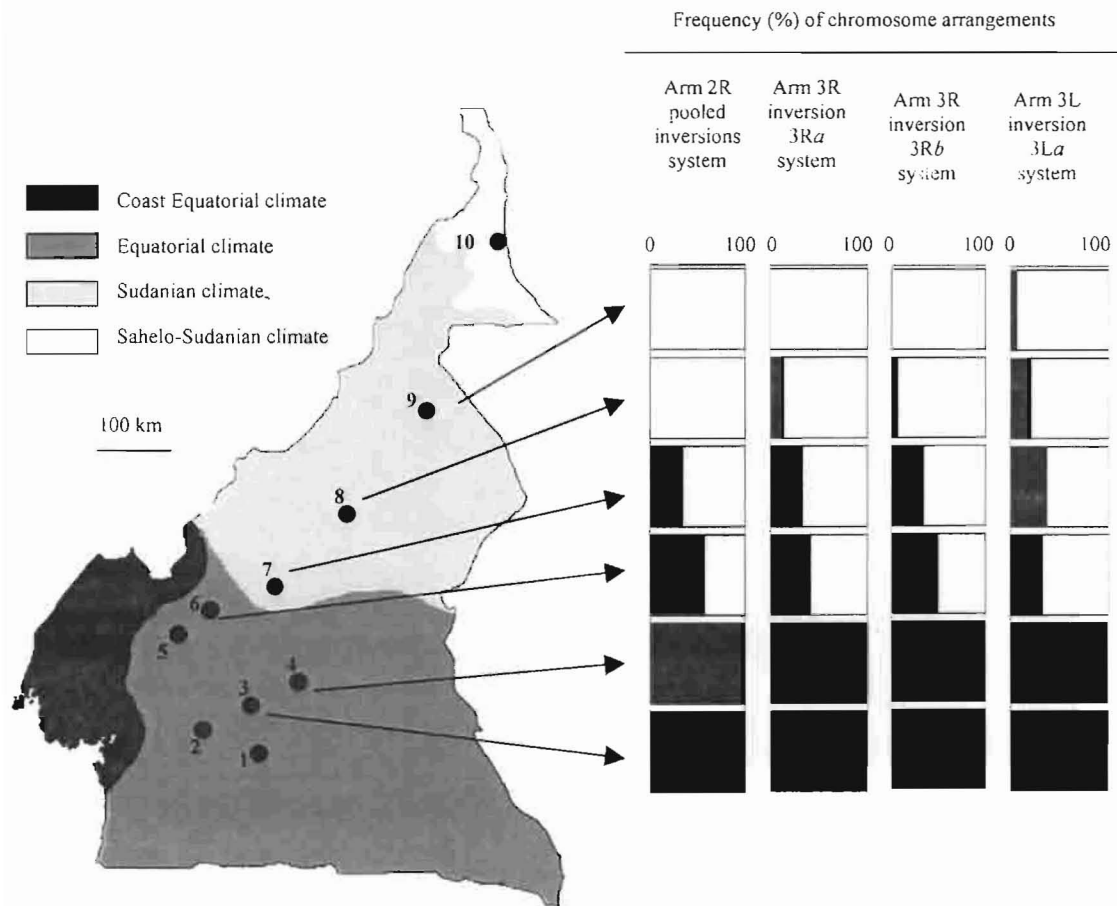


Figure 1 : Localities sampled for *An. funestus* across Cameroon and clinal distribution of chromosomal inversions. 1: Mfou, 2: Mbebe, 3: Ntui, 4: Nkoteng, 5: Foumban, 6: Bankim, 7: Tibati, 8: Ngaoundere, 9: Lagdo, 10: Maga.

Black coloration on the right panel represents inverted arrangements, and white represents standard arrangements.

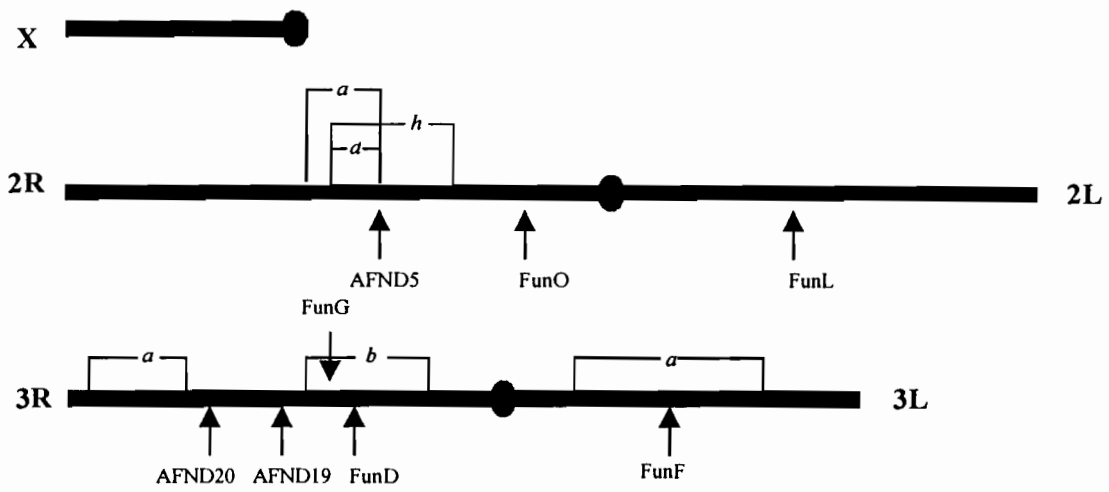


Figure 2 : Chromosomal inversions of *An. funestus* in Cameroon, and location of microsatellites loci (Sharakhov *et al.* 2003).

	2Rdha inversion system											3Ra inversion system							3Rb inversion system							3La inversion system						
	2n	+/+	h/h	h/d	a/+	a/a	f(+)	f(h)	f(d)	f(a)	Fis	2n	+/+	a/+	a/a	f(+)	f(a)	Fis	2n	+/+	+/b	b/b	f(+)	f(b)	Fis	2n	+/+	a/+	a/a	f(+)	f(a)	Fis
Ntui	12	0	0	0.50	0	0.50	0	0.25	0.25	0.50	0.29*	12	0	0	1.00	0	1.00	-	12	0	0	1.00	0	1.00	-	12	0	0	1.00	0	1.00	-
NKoteng	6	0	0	1.00	0	0	0	0.50	0.50	0	-1	6	0	0	1.00	0	1.00	-	6	0	0	1.00	0	1.00	-	6	0	0	1.00	0	1.00	-
Bankim	14	0.14	0	0	0.57	0.29	0.43	0	0	0.57	-0.09	24	0.33	0.50	0.17	0.58	0.42	0.01	24	0.17	0.67	0.17	0.50	0.50	-0.29	18	0.67	0	0.33	0.67	0.33	1**
Tibati	46	0.65	0.17	0.17	0	0	0.65	0.26	0.09	0	0.66**	54	0.63	0.07	0.30	0.67	0.33	0.84**	52	0.58	0.15	0.27	0.65	0.35	0.67**	56	0.54	0.18	0.28	0.63	0.37	0.61**
Ngaoundere	10	1.00	0	0	0	0	1.00	0	0	0	-	14	0.71	0.14	0.14	0.86	0.14	0.63	14	0.86	0.14	0	0.93	0.07	-	14	0.71	0.14	0.14	0.79	0.21	0.63
Lagdo	40	1.00	0	0	0	0	1.00	0	0	0	-	46	1.00	0	0	1.00	0	-	44	1.00	0	0	1.00	0	-	46	0.87	0.13	0	0.93	0.07	-0.05
All	128	0.64	0.06	0.16	0.06	0.08	0.67	0.15	0.08	0.11	0.58**	156	0.63	0.11	0.26	0.69	0.31	0.74**	152	0.59	0.17	0.24	0.68	0.32	0.61**	152	0.60	0.12	0.28	0.66	0.34	0.74**

125

Table 1 : Karyotypes and inversions frequencies of *An. funestus*.

* for *Fis* estimates indicates significant ($P < 0.05$, single test level) departure from Hardy-Weinberg equilibrium, and ** indicate significant values ($P < 0.05$) taking into account multiple testing. - : sample size too low to warrant analyses, or only one arrangement found. 2n : number of chromatids scored.

		Microsatellite loci										Chromosomal inversions			
		Within inversions					Outside inversions			Not located					
		AFND5	FunG	FunD	FunF	FunO	AFND20	AFND19	FunL	AFND2	AFND3	2Rdha	3Ra	3Rb	3La
Microsatellite loci	Inside inversions	AFND5													
		FunG	-												
		FunD	-	+											
		FunF	-	-	+										
		FunO	+	+	+	+									
	Outside inversions	AFND20	-	-	+	-	-								
		AFND19	-	-	-	-	+	+							
		FunL	-	+	-	-	+	-	-						
	Not located	AFND2	-	-	-	+	-	-	+						
		AFND3	-	-	-	-	-	-	+	-					
Chromosomal inversions	2Rdha	-	-	-	-	-	-	-	+	-					
	3Ra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+				
	3Rb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+			
	3La	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+		

Table 2 : Pairwise linkage disequilibrium for 10 microsatellite loci and four chromosomal inversions for pooled *An. funestus* populations. + sign indicate significant ($P < 0.05$) linkage disequilibrium before Bonferroni procedure, † sign indicate significant ($P < 0.05$) linkage disequilibrium after Bonferroni procedure. – sign indicate lack of significance ($P < 0.05$ level).

Locus (location)		Populations										
		Mfou (2n=108)	Mbebe (2n=112)	Ntui (2n=104)	Nkoteng (2n=112)	Foumban (2n=96)	Bankim (2n=96)	Tibati (2n=176)	Ngaoundere (2n=108)	Lagdo (2n=146)	Maga (2n=108)	All ^a (2n=1166)
AF2 (unknown)*	Nall	9	9	10	10	12	11	10	12	10	11	17
	Hobs	0.83	0.76	0.84	0.77	0.80	0.83	0.78	0.72	0.81	0.74	0.79
	Fis	-0.044	0.016	-0.022	0.061	0.017	0.028	0.043*	0.115**	-0.050*	0.111**	0.061**
AFND3 (unknown)	Nall	5	5	6	5	3	6	5	4	6	5	9
	Hobs	0.56	0.54	0.42	0.59	0.52	0.62	0.61	0.65	0.44	0.57	0.55
	Fis	-0.025	0.004	0.241	-0.049	-0.011	-0.081	-0.148	-0.244	0.186	-0.074*	-0.024*
AFND5 (2R-15A)	Nall	6	6	6	6	6	6	7	6	7	5	8
	Hobs	0.50	0.55	0.57	0.67	0.73	0.84	0.67	0.52	0.58	0.65	0.63
	Fis	0.059	0.031	0.068	-0.170	-0.114	-0.265	-0.075	0.133	-0.029	-0.033	-0.035
FunO (2R-18A)	Nall	7	8	9	9	10	9	8	12	11	10	15
	Hobs	0.67	0.56	0.60	0.57	0.73	0.82	0.73	0.81	0.77	0.76	0.70
	Fis	0.066	0.111	0.151	0.116	0.068	-0.043*	-0.015	0.003	-0.023*	0.008	0.049*
AFND20 (3R-32D)	Nall	9	11	11	12	10	11	12	12	10	9	15
	Hobs	0.66	0.62	0.86	0.78	0.75	0.72	0.69	0.76	0.81	0.69	0.73
	Fis	0.168*	0.224*	-0.011	0.061	0.055	0.104	0.131*	0.076	0.016	0.128	0.097**
AFND19 (3R-34A)	Nall	10	11	11	10	10	10	10	13	12	11	17
	Hobs	0.70	0.81	0.81	0.83	0.92	0.84	0.79	0.87	0.66	0.85	0.80
	Fis	0.099	0.013	0.030	-0.021	-0.068*	-0.023	0.039	-0.062	0.146*	-0.028	0.029*
FunG (3R-35A)	Nall	14	14	12	17	13	14	14	12	14	13	26
	Hobs	0.85	0.88	0.75	0.85	0.88	0.91	0.88	0.85	0.89	0.83	0.86
	Fis	0.030	-0.009	0.130	0.041	-0.032	-0.038	-0.063	-0.122	-0.085	0.020	0.000
FunD (3R-35B)	Nall	19	20	20	20	21	22	22	25	20	20	32
	Hobs	0.83	0.91	0.87	0.91	0.80	0.94	0.88	0.85	0.91	0.81	0.87
	Fis	0.089	0.000	0.065	-0.005	0.078**	-0.005	-0.009	0.058*	-0.007	0.042	0.051**
FunL (2L-24C)	Nall	18	17	15	16	16	19	19	14	17	13	29
	Hobs	0.85	0.89	0.93	0.90	0.80	0.83	0.77	0.83	0.90	0.80	0.84
	Fis	0.036	0.003	-0.045	-0.010	0.080	0.070	0.108	0.008	-0.049	0.050	0.029
FunF (3L-43A)	Nall	7	6	7	6	7	5	9	6	8	6	12
	Hobs	0.76	0.75	0.81	0.75	0.60	0.70	0.77	0.80	0.79	0.77	0.75
	Fis	-0.035	-0.005	-0.112	-0.012	0.200	0.020	-0.022	-0.072	-0.022	-0.068	-0.003
Mean across all loci ^b	Nall	10.4	10.7	10.7	11.1	10.8	11.3	11.6	11.6	11.5	10.3	18.0
	Hobs	0.72	0.73	0.75	0.76	0.75	0.81	0.76	0.77	0.76	0.75	0.75
	Fis	0.044	0.039	0.050	0.012	0.027*	-0.016*	-0.010	-0.011*	0.009*	0.016	0.025*

Table 3 : Genetic variability and significance level for goodness of fit tests to Hardy-Weinberg equilibrium within *An. funestus* populations from 10 localities in Cameroon.

2n, number of chromosomes scored. Hobs, observed heterozygosity (direct count). Nall, number of alleles. *Fis* was calculated according to Weir and Cockerham (1984). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.05$ after Bonferonni correction (see text).

^a : all specimens were considered as belonging to one single panmictic population.

^b : multilocus *Fis* estimates were computed according to Weir & Cockerham (1984) using GENEPOP 3.2. (Raymond & Rousset, 1995); statistical significance of *Fis* across loci was assessed through Fisher exact test.

	Mfou	Mbebe	Ntui	Nkoteng	Foumban	Bankim	Tibati	Ngaoundere	Lagdo	Maga
Mfou	-	80	85	105	250	270	330	460	640	880
Mbebe	0.0062*	-	50	100	170	190	290	420	580	830
Ntui	0.0083*	0.0071	-	50	195	175	250	380	560	800
Nkoteng	-0.0002	-0.0022	0.0037	-	190	180	230	380	550	800
Foumban	0.0164*	0.0289*	0.0184*	0.0203*	-	80	220	360	490	740
Bankim	0.0107*	0.0137*	0.0026	0.0090*	0.0095*	-	130	260	410	660
Tibati	0.0203*	0.0293*	0.0123*	0.0199*	0.0079*	0.0044*	-	150	310	540
Ngaoundere	0.0330*	0.0386*	0.0165*	0.0298*	0.0231*	0.0113*	0.0046*	-	190	410
Lagdo	0.0281*	0.0368*	0.0146*	0.0250*	0.0315*	0.0136*	0.0108*	0.0112	-	240
Maga	0.0298*	0.0373*	0.0145*	0.0283*	0.0224*	0.0102*	0.0028*	0.0015	0.0067*	-

Table 4 : Measure of genetic differentiation (F_{st}) and geographical distance between *An. funestus* populations from Cameroon. F_{st} below the diagonal. * : $P < 0.01$. Distance in kilometres above the diagonal.

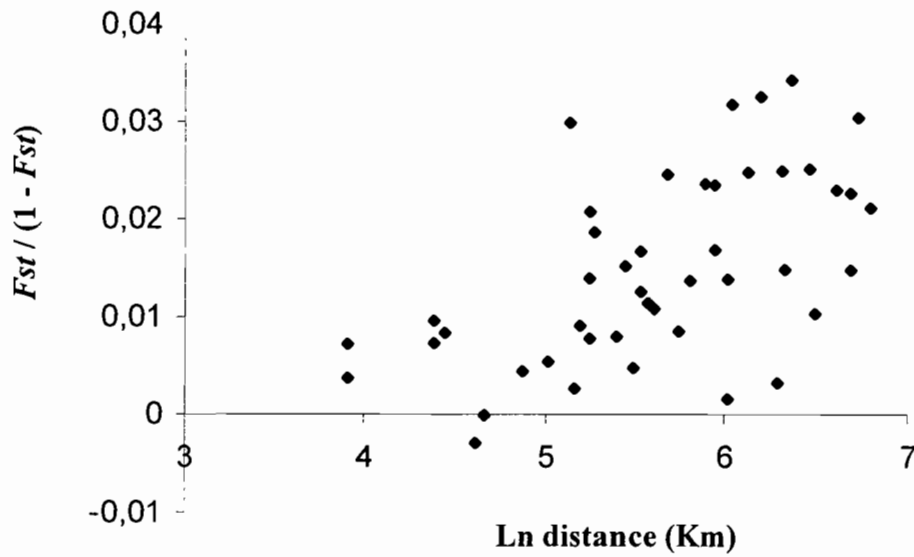


Figure 3 : Correlation between $F_{st} / (1 - F_{st})$ and logarithm of distance (in kilometres) for pairwise comparisons of 10 *An. funestus* populations from Cameroon at the 10 microsatellite loci analysed.

Article 6:

Article accepté dans *Insect Molecular Biology*.

**POPULATIONS STRUCTURE OF THE MALARIA VECTOR *ANOPHELES*
FUNESTUS IN SENEGAL BASED ON MICROSATELLITE AND CYTOGENETIC
DATA**

A. COHUET, I. DIA, F. SIMARD, M. RAYMOND & D. FONTENILLE

Populations structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data.

ABSTRACT

The study of chromosomal inversions distribution within natural *Anopheles funestus* populations from West Africa revealed high levels of genetic structuring. In Burkina Faso, this was interpreted as evidence for incipient speciation, and two chromosomal forms were described, namely, “Folonzo” and “Kiribina”. Assignment of field collected specimens to one chromosomal form depends upon application of an algorithm based on chromosomal inversions. We assessed relevance and applicability of this algorithm on *An. funestus* populations from Senegal, where both forms occur. Furthermore, we estimated the level of genetic differentiation between populations using microsatellite loci spread over the whole genome. Significant genetic differentiation was revealed between geographical populations of *An. funestus*, and the pattern observed suggested isolation by distance. Chromosomal heterogeneity was not detected by microsatellite markers. Thus, although incipient speciation could not be ruled out by our data, our results suggest that differential environmental selection pressure acting on inversions should be considered a major factor in shaping their distribution in wild *An. funestus* populations.

INTRODUCTION

An. funestus Giles is a major vector of human malaria in Africa. Together with *An. gambiae* Giles and *An. arabiensis* Patton, these species complement each other and sustain perennial, high intensity malaria transmission all over sub-Saharan Africa. *An. funestus* often follows in peak abundance *An. gambiae* after the end of the rainy season, thereby extending malaria transmission into the dry season (Gillies & De Meillon, 1968). Moreover, in some areas of Africa, *An. funestus* is the main vector of malaria, with infection rates as high or higher than its counterparts from the *An. gambiae* complex (Fontenille & Lochouarn, 1999; Fontenille *et al.*, 1997; Manga *et al.*, 1997; Mendis *et al.*, 2000). As such, any vector control measure to be implemented in the field will need to target at least *An. funestus* as well as members of the *An. gambiae* complex. However, despite such paramount epidemiological

importance in malaria transmission, *An. funestus* has received far less attention than members of the *An. gambiae* complex and basic data on the biology, role as a malaria vector and population genetic structuring within this species are crucially lacking. The importance of detailed understanding of vector population structure has been emphasized in the context of genetic control (Aultman *et al.*, 2001; Collins & Besansky, 1994; Curtis *et al.*, 1999; Green, 1981). Comprehensive knowledge on gene flow between populations is also pivotal to the successful use and management of classical control techniques based on insecticides, as it will permit to foresee the spread of genes of interest such as genes involved in insecticide resistance, refractoriness/susceptibility to *Plasmodium* infection, or feeding behaviour.

An. funestus belongs to a group of 10 species that are morphologically very similar and can only be distinguished at specific stages of their development (Gillies & Coetzee, 1987; Gillies & De Meillon, 1968). The members of this group are *An. funestus*, *An. vaneedeni* Gillies and Coetzee, *An. parensis* Gillies, *An. aruni* Solti, *An. confusus* Evans and Leeson, *An. rivulorum* Leeson, *An. fuscivenosus* Leeson, *An. lesoni* Evans, *An. brucei* Service and the recently identified *An. rivulorum*-like (Cohuet *et al.*, 2003; Hackett *et al.*, 2000). Of the ten species, *An. funestus* has the widest distribution, extending throughout the whole sub-saharan Africa, and is also highly anthropophilic and endophilic. This is the only member of the group to play a significant role in human malaria transmission continent-wide, although other species of the group have been found naturally infected with *Plasmodium falciparum* (Wilkes *et al.*, 1996).

Few studies have focused on the genetic structure of *An. funestus* populations. However, several observations led to the prediction of population subdivision. Evidence for population heterogeneity within and between *An. funestus* populations comes from the distribution of paracentric inversions on chromosomal arms 2R, 3R and 3L (Green & Hunt, 1980).

In Burkina Faso, *An. funestus* populations are polymorphic for at least four paracentric chromosomal inversion (Boccolini *et al.*, 1994). Wide variations in inversion frequencies were observed among samples without consistent geographical or temporal clines (Costantini *et al.*, 1999). Highly significant linkage disequilibrium and departures from Hardy-Weinberg expectations were recorded for inversions 3Ra, 3Rb and 2Rs in most samples, suggesting a Wahlund effect (pooling of subpopulations). Furthermore, significantly higher frequencies of the inverted arrangements 3Ra and 3Rb were found in indoor human-fed samples vs corresponding outdoor animal-fed samples.

Based on these findings, two chromosomal forms, named “Kiribina” and “Folonzo” were defined by Costantini *et al.* (1999). Specimens of *An. funestus* can be assigned to a chromosomal form using an algorithm based on chromosomal inversions. The Kiribina form is characterised by standard 2R and 3R chromosomes, or presence of the 2Rs inversion. The Folonzo form is nearly fixed for inversions 3Ra and 3Rb, polymorphic on arm 2R, and seems to have a higher vectorial capacity. Such level of structuring led Costantini *et al.* (1999) to hypothesize that chromosomal forms represent reproductive units and thus that incipient speciation occurs in *An. funestus*.

To further assess the taxonomic status of these chromosomal forms, we studied genetic variability at 9 microsatellite loci in 4 *An. funestus* populations collected along a West-East transect in Senegal (West Africa), where previous cytogenetic studies demonstrated high levels of chromosomal heterogeneities, both within and between populations (Dia *et al.*, 2000; Lochouart *et al.*, 1998). We particularly focused on the village of Kouvar where chromosomal data showed strong heterokaryotype deficits, suggesting that both chromosomal forms are sympatric and synchronous in this area.

RESULTS

Genetic diversity. Genotypes at nine microsatellite loci were determined from 247 *An. funestus* specimens collected in our four study sites (Figure 1). All loci were highly polymorphic showing between 6 and 25 alleles (Table 1). Across the 4 populations, mean number of alleles per locus ranged from 9 to 11.4 and mean observed heterozygosity across all loci ranged from 0.70 to 0.73.

Hardy-Weinberg and linkage disequilibrium. When considering all samples as belonging to a single population, Hardy-Weinberg expectations were significantly rejected ($P < 0.05$, single test level) for AFND3, AFND20, FunG, FunD and FunF, with positive values of F_{is} (Table 1, “overall”). Five out of 9 loci (or 56%, $P < 10^{-4}$, binomial test with 0.05 % “success” rate) therefore showed significant deficit of heterozygotes, suggesting pooling of different genes pools (Wahlund effect). Alternatively, using the Bonferroni procedure to detect locus-specific deviations, two F_{is} estimates remained statistically significant at the 5% threshold, for loci FunD and FunG. At the population level, slight deviations from Hardy-Weinberg expectations occurred. In Kedougou, the deficit of heterozygotes across all loci was

significant ($P < 0.05$), suggesting a subdivision in the population (Table 1). Exact tests for linkage disequilibrium within each population and in the pooled population resulted in two significant values after the sequential Bonferroni procedure was applied (36 pairwise comparisons within each population), between AFND19 and FunL and between FunO and FunD in the population of Kedougou. Together with significant heterozygote deficit observed over all loci, linkage disequilibrium in Kedougou strengthens our findings of population heterogeneity in this sample. No pair of loci appeared in linkage disequilibrium in more than one population, suggesting the absence of statistical linkage between loci despite their proximity in the genome (AFND19, AFND20, FunD and FunG on arm 3R) (Figure 2).

Genetic differentiation. Estimates of pairwise F_{st} between populations and across all loci are shown in Table 2, together with corresponding geographical distance between sampling sites.

Average F_{st} based on the whole data set (9 loci and 4 populations) was low (0.0214) but highly significant ($P < 10^{-4}$), suggesting restricted gene flow between *An. funestus* populations at this geographical scale. Single locus estimates varied among loci from 0.0057 to 0.0510; all of them were statistically significant ($P < 0.05$), thus showing genome-wide differentiation. The highest single locus F_{st} estimates were observed for loci AFND3, FunG and FunD, a result that is consistent with previous evidence for strong and significant heterozygote deficits observed at these loci when populations are pooled (see above). Mean pairwise F_{st} estimates over all loci between the different locations ranged from 0.0080 ($P < 0.05$) to 0.0424 ($P < 10^{-4}$) (Table 2). Global and pairwise F_{st} estimates were computed separately for loci located within (4 loci) and outside (4 loci) chromosomal inversions. There was no significant difference (Mann-Whitney test, $P = 0.48$), suggesting homogeneity between these groups of loci and negligible (if any) influence of chromosomal inversions on our estimates.

Isolation by distance. Isolation by distance was tested and showed a correlation between genetic (pairwise F_{st}) and geographic distance ($P < 0.05$), when considering the whole data set, despite a low number of populations (Figure 3). These results suggest that the level of the genetic differentiation between populations of *An. funestus* in Senegal would be mainly due to a restriction of gene flow by geographical distance. The correlation became non significant when considering only loci located within inversions ($P = 0.08$) or outside inversions ($P = 0.19$), probably due to lack of statistical power.

Population of Kouvar. In the Kouvar sample, 42 individuals were analysed both for chromosomal inversions and microsatellite genotype. All of them were collected between July and October 2000.

No inversion was found on chromosomal arm 2L or on the X heterosome in accordance with other studies on this species (Boccolini *et al.*, 2002; Boccolini *et al.*, 1994; Boccolini *et al.*, 1998; Costantini *et al.*, 1999; Dia *et al.*, 2000; Green & Hunt, 1980; Kamau *et al.*, 2003; Lochouarn *et al.*, 1998; Sharakhov *et al.*, 2001). One inversion was detected on each of the three other arms: 2Rs, 3Rb and 3La. Significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium was observed for all inversions, showing a deficit of heterokaryotypes (Table 3). All pairs of inversions appeared in linkage disequilibrium ($P < 0.05$). Linkage disequilibrium was tested between chromosomal inversions and microsatellite alleles. No pair-wise test was significant ($P > 0.05$). When individuals were assigned to chromosomal forms following the algorithm of Costantini *et al.* (1999), 38 were assigned without ambiguity: 7 belong to the Folonzo form and 31 to the Kiribina form. Hardy-Weinberg equilibrium was re-established in the Folonzo form, but deficit of heterokaryotypes remained significant for inversions 2Rs ($P < 0.05$) and 3La ($P < 0.05$) in the Kiribina form, as opposed to what was found in Burkina Faso.

DISCUSSION

Population structure of *An. funestus* from Senegal was previously studied at the chromosomal level (Dia *et al.*, 2000; Lochouarn *et al.*, 1998) and showed a high degree of structuring. The population of Dielmo was fixed for 2R+ and inversions 3Ra and 3Rb were observed floating at low frequency (<18%). Population of Sankagne was nearly fixed for 2Rs and 3R+. When applying the algorithm proposed by Costantini *et al.* (1999), most of specimens from Dielmo and all specimens from Sankagne were assigned to the Kiribina form. However, Dielmo and Sankagne populations were almost fixed for alternative arrangements on arm 2R, suggesting that the Kiribina form is not homogenous in Senegal. Population of Kedougou was typical to the chromosomal form Folonzo with the chromosomal arm 2R polymorphic (without 2Rs inversion) and 3Ra and 3Rb nearly fixed. Population of Kouvar showed both chromosomal forms with 2Rs, 3Ra, 3Rb and 3La polymorphic and significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium between each pair of inversions (Lochouarn *et al.*, 1998). Our results also showed strong heterokaryotypes deficit

and linkage disequilibrium between chromosomal inversions in Kouvar. In this locality, most of the specimens were assigned to the Kiribina form. However, significant deficit in heterokaryotypes persisted for inversions 2Rs and 3La after assignment of specimens to their chromosomal form. The fact that Hardy-Weinberg equilibrium was not re-established in the population of Kouvar by separating specimens following Costantini's algorithm, confirmed that chromosomal structuring differs between Burkina Faso and Senegal. If the algorithm is well adapted in Burkina Faso, it seems unlikely that it can be extended to populations distant from Burkina Faso as previously shown with samples from Angola (Boccolini *et al.*, 2002).

It was shown that chromosomal inversions reduce or even suppress recombination in certain regions of the genome, when found at the heterozygous state (Caceres *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 1997; Rieseberg, 2001), and therefore can protect well adapted gene associations from recombination (Alvarez & Zapata, 1997; Caceres *et al.*, 1999; Coluzzi, 1982; Coluzzi *et al.*, 1979). With this respect, the most likely explanations for heterozygote deficiencies observed for chromosomal arrangements in our *An. funestus* samples are (i) reproductive isolation between chromosomal forms (i.e., the 'speciation' hypothesis) or (ii) natural selection against certain heterokaryotypes (i.e., the 'selection' hypothesis), inversion being commonly viewed as underdominant mutations decreasing fitness of hybrids compared to homozygotes (Rieseberg, 2001). Neutral markers such as microsatellites could help address this issue. Selection on inversions is a locus-specific evolutionary force, and in this case, genetic differences should be observable only at these loci directly exposed to natural selection or at tightly linked loci, whereas genetic heterogeneity following speciation should be reflected throughout the genome. In *An. gambiae*, microsatellite loci located within polymorphic chromosomal inversions, revealed higher level of genetic structuring than loci located outside inversions (Onyabe & Conn, 2001). This was observed even between sympatric populations belonging to alternative chromosomal forms of *An. gambiae* in Mali (Lanzaro *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2001). Furthermore, significant linkage disequilibrium was detected between loci within chromosomal inversions (Lanzaro *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1996), suggesting recombination rate is lower within polymorphic chromosomal inversions in *An. gambiae*. In our study however, similar levels of genetic differentiation between *An. funestus* populations were detected for loci located within and outside polymorphic chromosomal inversions. Specimens from Kouvar that were both karyotyped and genotyped, revealed no linkage disequilibrium between microsatellite loci and chromosomal inversions, as well as among loci located within inversions. However, significant linkage disequilibrium

was evidenced between chromosomal inversions, despite these were observed on different chromosomal arms.

In Dielmo and Sankagne as well, no evidence for departure from panmixia was observed using our set of microsatellite markers. An opposite figure was observed in Kedougou where microsatellite markers revealed population substructure, in spite of the fact that all specimens from this area were indentified as belonging to the same chromosomal form, Folonzo (Dia *et al.*, 2000; Lochouarn *et al.*, 1998). This may reflect bias in our sampling design in this area, where overall very low human densities triggers several human settlements to be sampled in order to reach adequate sample sizes, representing a pool of potentially differentiated mosquitoes. Preference of *An. funestus* for breeding in patchily isolated permanent bodies of water, and the generally uneven distribution of this vector in Africa, indeed suggest discontinuous populations (Charlwood *et al.*, 2000; Gillies & Coetzee, 1987; Gillies & De Meillon, 1968; Molineaux & Gramiccia, 1980). Moreover, the isolation by distance found in the present study provides support for the usefulness of microsatellite markers to detect population substructure in *An. funestus*.

In conclusion, our results suggest that microsatellite markers did not sustain the genetic structuring revealed by chromosomal markers, both within and among *An. funestus* populations in Senegal. These results are thus consistent with the selection hypothesis. It is noticeable however, that fine-scale analysis of the evolutionary dynamics of different parts of the *An. funestus* genome would require dense linkage maps while only few microsatellite markers are available to date. Boosted by recent advances in molecular entomology and the genomics of *An. gambiae* (Holt *et al.*, 2002), renewed interest of the scientific community for this “neglected” malaria vector will undoubtedly result in the development and implementation of new molecular tools that will help shade light on the complex genetic structure of anophelines malaria vectors in Africa.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Study sites. The study was carried out in four villages along river Gambia from West to East Senegal (Figure 1). Dielmo (13°45'N, 16°25'W) is located 280 km South-East of Dakar and approximately 15km North of the Gambian border. The vegetation is a Sudan-type savannah. The rainy season extends from June to mid-October and the average annual rainfall is approximately 700 mm. The village is situated on the marshy bank of a small permanent

stream which permits the persistence of anopheline larval development sites throughout the year. A population of 250 inhabitants lives in the village. Malaria transmission dynamics in Dielmo was previously described in details (Fontenille *et al.*, 1997). The village of Sankagne (13°24'N, 13°45'W), is East of The Gambia, 2 km from river Gambia, in the Sudanian domain. The rainy season extends from June to October. The population of Sankagne is 1600 inhabitants. Kouvar (13°23'N, 13°37'W), with 1000 inhabitants, is located 25 km East of Sankagne, 3 km from the river. A permanent pool is located 500 m from the village. In the region of Sankagne and Kouvar, the mean annual rainfall is approximately 900 mm. The Kedougou area (12°33'N, 12°11'W) is situated in extreme South-East of Senegal in a Sudanguinean phytogeographic domain. The rainy season extends from June to November with an average annual rainfall of 1250 mm. Collections were carried out in small villages around Kedougou within a radius of 30 kilometers. The human population density is fairly low, with 2.5 inhabitants per km² living in small dispersed agricultural villages.

Mosquito collection and field processing of specimens. Mosquitoes were collected by indoor pyrethrum spraying between November 1997 and October 2001. Females from the *An. funestus* group were visually sorted from other anophelines according to morphological identification keys (Gillies & Coetzee, 1987; Gillies & De Meillon, 1968). All specimens were stored individually in tubes containing desiccant. In Kouvar, half-gravid females of the *An. funestus* group were dissected and ovaries were immediately fixed in Carnoy's fixative (one part of glacial acetic acid and three parts of pure ethanol). The corresponding carcasses were stored in tubes with desiccant. Back in the laboratory, all tubes were stored at -20°C until processing.

DNA extraction and species identification. Genomic DNA was extracted from wings and legs of each individual mosquito following a slightly modified version of the protocol of Cornel & Collins (1996) and resuspended in sterile water. *An. funestus s.s.* females were included in the analysis after species identification was carried out by the recently described diagnostic PCR assay (Cohuet *et al.*, 2003; Koekemoer *et al.*, 2002). No other member of the *An. funestus* group was observed in our samples.

Microsatellite amplification. Nine microsatellite loci were selected from published *An. funestus* sequence data (Cohuet *et al.*, 2002; Sinkins *et al.*, 2000), based on high

polymorphism, no evidence for null alleles, mean allele sizes ranging from 110 to 220 bp, and cytological location allowing whole-genome scan (Figure 2). We used AFND5 and FunO located on chromosomal arm 2R ; FunL on chromosomal arm 2L; FunG, FunD, AFND19 and AFND20 on chromosomal arm 3R ; FunF on chromosomal arm 3L; and AFND3 which precise cytological location is still undefined (Sharakhov *et al.*, 2003).

PCR amplification was carried out in 25µl reaction volume, from 5-10 ng of template DNA. Reaction mixture contained 1X PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen, France), 200 µM each dNTP, 10 pmol of each primer, and 0.5 to 1 U Taq Polymerase (Qiagen, France). The forward primer was labelled in 5' with either TET, HEX or FAM fluorescent markers (Eurogentec, Belgium) to allow multiplex electrophoresis. Amplification was performed under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 2 min followed by 36 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 54°C, 30 s at 72°C and a final elongation step of 10 min at 72°C. Fragment analyses were conducted with an ABI PRISM 377. Alleles were sized relatively to an internal size standard using GENESCAN version 3.1 (Applied Biosystems, France).

Polytene chromosomes preparation. Ovaries of half-gravid females were used to obtain squash preparations of the polytene chromosomes according to Hunt (1973). The preparations were examined under phase contrast microscopy and paracentric inversion karyotypes were scored according to the chromosomal map and nomenclature of Sharakov *et al.* (2003).

Data analysis. For each microsatellite locus, goodness-of-fit to Hardy-Weinberg expectations was tested in each location and overall. Cytogenetic data from Kouvar were analysed in the same way, considering alternative chromosomal arrangements as different alleles at one locus as previously defined (Costantini *et al.*, 1999, Lochouarn *et al.*, 1998). Statistical significance was assessed by the exact probability test available in GENEPOP 3.2 (Raymond & Rousset, 1995).

Linkage disequilibrium between pairs of microsatellite loci in the pooled population and within each population was assessed using exact tests available in GENEPOP 3.2. In Kouvar, cytogenetic data (i.e., karyotypes) were included in the analysis.

Genetic differentiation between geographical populations was examined by *F* statistics (Wright, 1951), calculated according to Weir and Cockerham (1984). Significance of *F_{st}* was

assessed using the G-based exact test of genotypic differentiation (Goudet *et al.*, 1996). The correlation between genetic and geographical distances was assessed by the regression of $F_{st}/(1-F_{st})$ on the logarithm (ln) of geographical distance (Rousset, 1997), and tested using the Mantel test available in GENEPOP.

Global tests were employed to evaluate significance of multiple tests. Fisher's exact test was used to assess statistical significance of mean F_{is} and F_{st} estimates (across loci or across samples). The sequential Bonferroni procedure (Holm, 1979) can detect a single test-specific departure when multiple tests are performed: it was applied to evaluate significance of locus-specific departures within populations. Finally, the binomial test, which estimates the probability of obtaining the observed number of significant tests at the 0.05 level given the total number of tests, was used to explore genome-wide signatures.

REFERENCES

- Alvarez, G., Zapata, C. (1997) Conditions for protected inversion polymorphism under supergene selection. *Genetics* **146**, 717-722.
- Aultman, K.S., Beaty, B.J., Walker, E.D. (2001) Genetically manipulated vectors of human disease: a practical overview. *Trends Parasitol* **17**, 507-509.
- Boccolini, D., Carrara, G.C., Cani, P.J., Costantini, C. (2002) Preliminary data on *Anopheles funestus* chromosomal polymorphism in a peri-urban site of Western Angola. *Parassitologia* **44**, 22.
- Boccolini, D., Sabatini, A., Sanogo, E., Sagnon, N., Coluzzi, M., Costantini, C. (1994) Chromosomal and vectorial heterogeneities in *Anopheles funestus* from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* **36(1)**, 20.
- Boccolini, D., Sagnon, N., Touré, Y.T. (1998) Chromosomal polymorphism in *Anopheles funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia* **40(1)**, 14.
- Caceres, M., Barbadilla, A., Ruiz, A. (1999) Recombination rate predicts inversion size in Diptera. *Genetics* **153**, 251-259.
- Charlwood, J.D., Vij, R., Billingsley, P.F. (2000) Dry season refugia of malaria-transmitting mosquitoes in a dry savannah zone of east Africa. *Am J Trop Med Hyg* **62**, 726-732.
- Cohuet, A., Simard, F., Berthomieu, A., Raymond, M., Fontenille, D., Weill, M. (2002) Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes* **2**, 498-500.
- Cohuet, A., Simard, F., Toto, J.C., Kengne, P., Coetzee, M., Fontenille, D. (2003) Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 200-205.
- Collins, F.H., Besansky, N.J. (1994) Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science* **264**, 1874-1875.
- Coluzzi, M. (1982) Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes. In: *Mechanisms of Speciation* (ed. Barigozzi C), Alan Liss Inc, New York, pp. 143-153.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V., Di Deco, M.A. (1979) Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **73**, 483-497.

- Cornel, A.J., Porter, C.H., 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**, 109-116.
- Costantini, C., Sagnon, N., Ilboudo-Sanogo, E., Coluzzi, M., Boccolini, D. (1999) Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* **41**, 595-611.
- Curtis, C.F., Pates, H.V., Takken, W., *et al.* (1999) Biological problems with the replacement of a vector population by *Plasmodium*-refractory mosquitoes. *Parassitologia* **41**, 479-481.
- Dia, I., Lochouarn, L., Boccolini, D., Costantini, C., Fontenille, D. (2000) Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* **7**, 179-184.
- Fontenille, D., Lochouarn, L. (1999) The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia* **41**, 267-271.
- Fontenille, D., Lochouarn, L., Diagne, N., *et al.* (1997) High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* **56**, 247-253.
- Gillies, M., Coetzee, M. (1987) *A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara* The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Gillies, M., De Meillon, B. (1968) *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region)*, 2° Ed. edn. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeus, T., Rousset, F. (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**, 1933-1940.
- Green, C., Hunt, R. (1980) Interpretation of variation in ovarian polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *Anopheles parensis* Gillies and *Anopheles aruni*? *Genetica* **51**, 87-195.
- Green, C.A. (1981) Malaria epidemiology and anophelines cytogenetics. In: *Cytogenetics and genetics of vectors*, Pal R., Kitzmiller J.B. & Kanda T., pp. 1-20.
- Hackett, B.J., Gimnig, J., Guelbeogo, W., *et al.* (2000) Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol* **9**, 369-374.
- Holm, S. (1979) A simple sequential rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* **6**, 65-70.

- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., *et al.* (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129-149.
- Hunt, R.H. (1973) A cytological technique for the study of *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* **15**, 137-139.
- Kamau, L., Munyekenye, G.O., Koekemoer, L.L., Hunt, R.H., Coetzee, M. (2003) A survey of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group from 10 sites in Kenya with special emphasis on population genetic structure based on chromosomal inversion karyotypes. *J Med Entomol* **40**, 664-671.
- Koekemoer, L.L., Kamau, L., Hunt, R.H., 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**, 804-811.
- Lanzaro, G.C., Toure, Y.T., Carnahan, J., *et al.* (1998) Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14260-14265.
- Lochouart, L., Dia, I., Boccolini, D., Coluzzi, M., Fontenille, D. (1998) Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**, 607-612.
- Manga, L., Toto, J.C., Le Goff, G., Brunhes, J. (1997) The bionomics of *Anopheles funestus* and its role in malaria transmission in a forested area of southern Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**, 387-388.
- Mendis, C., Jacobsen, J.L., Gamage-Mendis, A., *et al.* (2000) *Anopheles arabiensis* and *An. funestus* are equally important vectors of malaria in Matola coastal suburb of Maputo, southern Mozambique. *Med Vet Entomol* **14**, 171-180.
- Molineaux, L., Gramiccia, G. (1980) The Garki Project. Research on Epidemiology and Control of Malaria in the Sudan Savannah of West Africa. *World Health Org.*
- Navarro, A., Betran, E., Barbadilla, A., Ruiz, A. (1997) Recombination and gene flux caused by gene conversion and crossing over in inversion heterokaryotypes. *Genetics* **146**, 695-709.
- Onyabe, D.Y., Conn, J.E. (2001) Genetic differentiation of the malaria vector *Anopheles gambiae* across Nigeria suggests that selection limits gene flow. *Heredity* **87**, 647-658.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995) GENEPOP Version 1.2. A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* **26**, 248-249.

- Rieseberg, L.H. (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Vol* **16**, 351-358.
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F-statistics* under isolation by distance. *Genetics* **145**.
- Sharakhov, I.V., Braginets, O., Grushko, O.G., *et al.* (2003) A microsatellite physical map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. *J Hered*, In press.
- Sharakhov, I.V., Sharakhova, M.V., Mbogo, C.M., Koekemoer, L.L., Yan, G. (2001) Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics* **159**, 211-218.
- Sinkins, S.P., Hackett, B.J., Costantini, C., *et al.* (2000) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol* **9**, 490-492.
- Taylor, C., Toure, Y.T., Carnahan, J., *et al.* (2001) Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* **157**, 743-750.
- Weir, B., Cockerham, C. (1984) Estimating *F-statistics* for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wilkes, T.J., Matola, Y.G., Charlwood, J.D. (1996) *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol* **10**, 108-110.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Ann. Eugen* **15**, 323-354.
- Zheng, L., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Collins, F.H., Kafatos, F.C. (1996) An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics* **143**, 941-952.

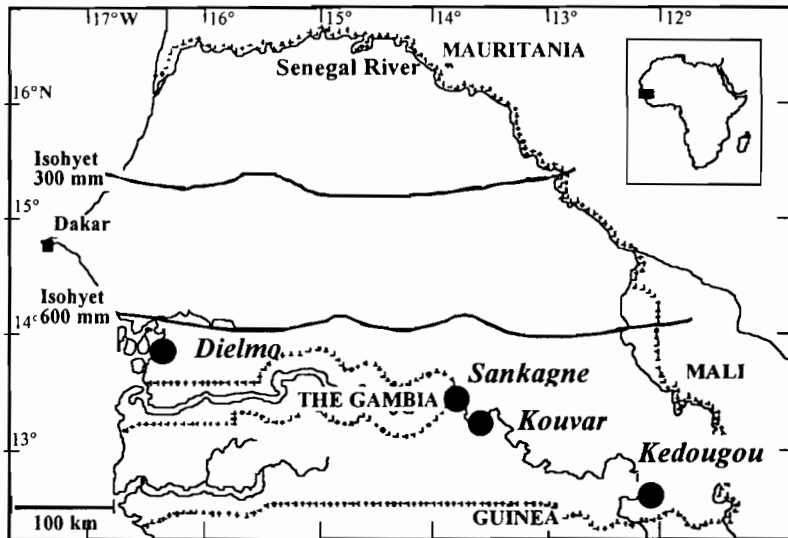


Figure 1 : Map of Senegal showing the 4 study sites (in italics).

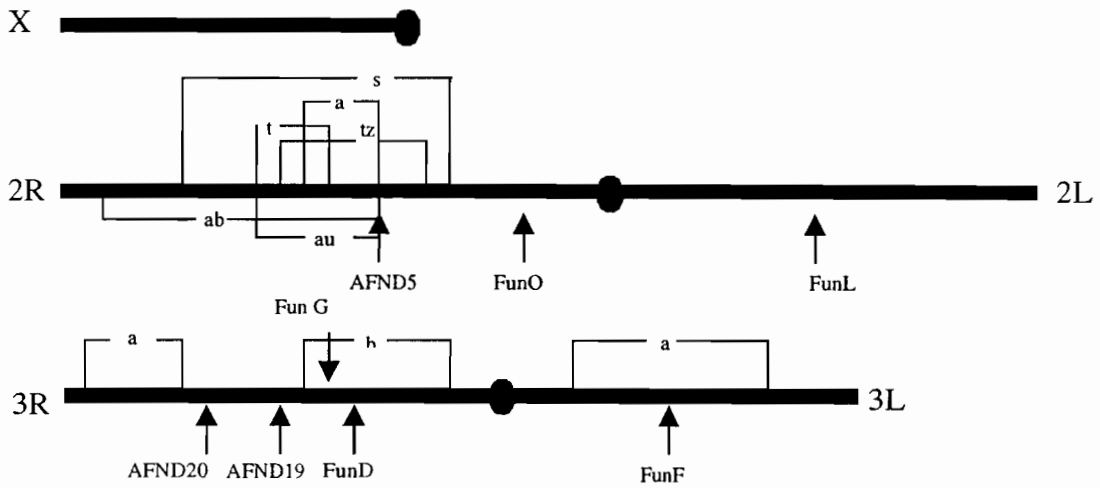


Figure 2 : Chromosomal inversions of *An. funestus* in Senegal, and location of microsatellite loci, AFND3 is not located yet (Sharakhov *et al.*, 2003).

Locus (chromosomal location)		Populations				
		Dielmo	Sankagne	Kouvar	Kedougou	Overall ^a
		2n = 100	2n = 120	2n = 144	2n = 130	2n = 494
AFND3 (unknown)	Nall	3	5	5	4	6
	Hobs	0.56	0.53	0.37	0.39	0.46
	<i>Fis</i>	-0.064	-0.028	0.113	-0.146	0.024
AFND5 (2R : 15A)	Nall	7	6	6	5	7
	Hobs	0.59	0.61	0.74	0.63	0.65
	<i>Fis</i>	-0.007	0.023	-0.040	-0.121	-0.020
FunO (2R : 18A)	Nall	8	11	12	11	15
	Hobs	0.79	0.75	0.77	0.69	0.75
	<i>Fis</i>	-0.003	-0.016	0.007	0.086	0.032
AFND20 (3R : 32D)	Nall	8	11	9	8	11
	Hobs	0.75	0.79	0.65	0.67	0.72
	<i>Fis</i>	0.042	0.046	0.125	0.138	0.091
AFND19 (3R : 34A)	Nall	8	12	12	11	15
	Hobs	0.74	0.76	0.74	0.76	0.75
	<i>Fis</i>	-0.044	0.040	0.033	0.062	0.029
FunG (3R : 35A)	Nall	11	14	11	8	17
	Hobs	0.84	0.85	0.77	0.86	0.83
	<i>Fis</i>	-0.085	0.030	0.081	-0.041	0.028
FunD (3R : 35B)	Nall	15	20	21	21	25
	Hobs	0.71	0.75	0.87	0.92	0.81
	<i>Fis</i>	0.121	0.117	0.038	0.026	0.092
FunL (2L : 24C)	Nall	14	16	15	9	21
	Hobs	0.86	0.80	0.75	0.72	0.78
	<i>Fis</i>	-0.061	0.037	0.066	0.142	0.053
FunF (3L : 43A)	Nall	7	8	8	6	8
	Hobs	0.70	0.70	0.70	0.64	0.69
	<i>Fis</i>	0.060	-0.064	0.063	0.136	0.055
Mean across all loci ^b	Nall	9	11.4	11	9.2	14
	Hobs	0.72	0.73	0.70	0.70	0.71
	<i>Fis</i>	-0.002	0.027	0.049	0.044	0.045

Table 1 : Genetic variability and significance level for goodness of fit tests to Hardy-Weinberg equilibrium within *Anopheles funestus* populations from 4 localities in Senegal.

2n, number of chromosomes scored. Hobs, observed heterozygosity (direct count). Nall, number of alleles. *Fis* was calculated according to Weir and Cockerham (1984). Bold values: $P < 0.05$; Bolded underlined values : $P < 0.05$ after Bonferonni correction (see text).

^a : all specimens were considered as belonging to one single panmictic population.

^b : multilocus *Fis* estimates were computed according to Weir & Cockerham (1984) using GENEPOP 3.2. (Raymond & Rousset, 1995); statistical significance of *Fis* across loci was assessed through Fisher exact test.

Loci	Sankagne	Kouvar	Sankagne	Dielmo	Dielmo	Dielmo	All
	vs Kouvar (25 km)	vs Kedougou (170 km)	vs Kedougou (195 km)	vs Sankagne (305 km)	vs Kouvar (330 km)	vs Kedougou (500 km)	
AFND3	0.0083	-0.0021	0.0332	<u>0.0325</u>	<u>0.0938</u>	<u>0.1404</u>	<u>0.0510</u>
AFND5	0.0065	<u>0.0427</u>	0.0125	-0.0002	<u>0.0282</u>	-0.0045	<u>0.0142</u>
FunO	<u>0.0083</u>	0.0067	-0.0095	<u>0.0604</u>	<u>0.0178</u>	<u>0.0597</u>	<u>0.0239</u>
AFND20	0.0104	-0.0023	-0.0019	<u>0.0052</u>	<u>0.0287</u>	<u>0.0127</u>	<u>0.0088</u>
AFND19	-0.0003	0.0077	0.0007	<u>0.0157</u>	<u>0.0059</u>	<u>0.0274</u>	<u>0.0095</u>
FunG	<u>0.0124</u>	-0.0042	<u>0.0139</u>	<u>0.0811</u>	<u>0.0783</u>	<u>0.0675</u>	<u>0.0415</u>
FunD	0.0060	0.0121	<u>0.0401</u>	<u>0.0394</u>	<u>0.0282</u>	<u>0.0756</u>	<u>0.0336</u>
FunL	0.0179	0.0059	0.0119	<u>0.0143</u>	-0.0043	<u>0.0096</u>	<u>0.0092</u>
FunF	0.0008	0.0024	<u>0.0208</u>	0.0034	-0.0029	<u>0.0096</u>	<u>0.0057</u>
Mean across all loci	<u>0.0080</u>	<u>0.0085</u>	<u>0.0131</u>	<u>0.0292</u>	<u>0.0274</u>	<u>0.0424</u>	<u>0.0214</u>
loci within inversions ^a	<u>0.0064</u>	<u>0.0135</u>	<u>0.0228</u>	<u>0.0342</u>	<u>0.0305</u>	<u>0.0398</u>	<u>0.0245</u>
loci outside inversions ^b	<u>0.0095</u>	0.0048	0.0004	<u>0.0237</u>	<u>0.0124</u>	<u>0.0280</u>	<u>0.0131</u>

Table 2 : Genetic differentiation (F_{st}) between *Anopheles funestus* populations from Senegal. Geographical distance between sites is given in brackets. Bolded values : $P < 0.05$; bolded underlined values : $P < 0.05$ after Bonferroni correction.

^a loci within polymorphic inversions are AFND5, FunG, FunD and FunF.

^b loci outside polymorphic inversions are AFND19, AFND20, FunO and FunL.

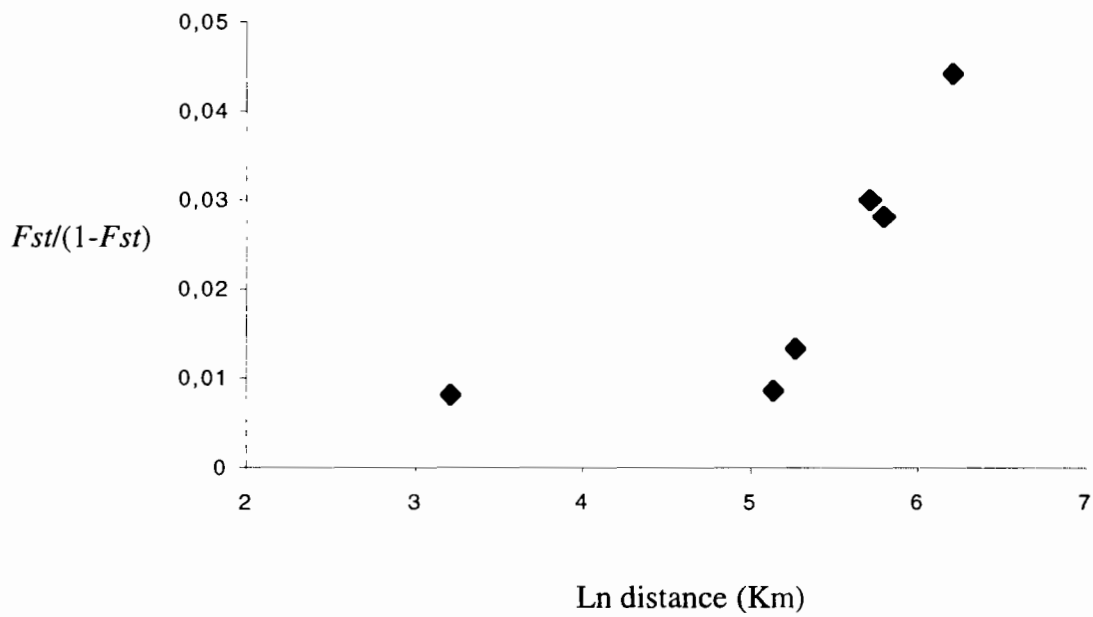


Figure 3 : Correlation between $F_{st}/(1-F_{st})$ and logarithm of distance (in km) for pairwise comparisons of 4 *Anopheles funestus* populations from Senegal genotyped at 9 microsatellite loci.

Chromosomal arm 2R	2n	f(s/s)	f(s/+)	f(+/+)	f(s)	f(+)	<i>Fis</i>
	80	0.625	0.1	0.275	0.675	0.325	<u>0.797</u>
Chromosomal arm 3R	2n	f(b/b)	f(b/+)	f(+/+)	f(b)	f(+)	<i>Fis</i>
	80	0.225	0	0.775	0.225	0.775	<u>1</u>
Chromosomal arm 3L	2n	f(a/a)	f(a/+)	f(+/+)	f(a)	f(+)	<i>Fis</i>
	84	0.262	0.238	0.5	0.381	0.619	<u>0.589</u>

Table 3 : Chromosomal arrangements and inversions frequencies (f) in 42 *Anopheles funestus* individuals from Kouvar, analysed both for chromosomal inversions and microsatellite genotypes. 2n = number of chromatids scored. *Fis* is calculated according to Weir & Cockerham (1984). Bold values $P < 0.05$; bolded underlined values : $P < 0.01$.

Discussion générale

1. SYNTHÈSE DES PRINCIPAUX RESULTATS

1.1. Les espèces du groupe *Funestus* :

1.1.1. Validation et amélioration de la technique d'identification des principales espèces du groupe *Funestus* :

Article 1 : Cohuet, A., Simard, F., Toto, J.C., Kengne, P., Coetzee, M. & Fontenille, D., 2003. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence of a new species. *Am J Trop Med Hyg*, 69(2), 200-205.

An. funestus s.s. étant un vecteur majeur du paludisme en Afrique, nous avons vu que son identification demeure une étape essentielle de la lutte antivectorielle. Au cours de ce travail, la technique moléculaire d'identification des espèces membres du groupe *Funestus* a été validée afin d'éviter des erreurs d'identification qui pourraient être à l'origine de stratégies de lutte antivectorielle inadaptées.

La PCR spécifique d'espèces développée par Koekemoer *et al.* (2002), testée sur les membres du groupe *Funestus* au Cameroun, s'est révélée inefficace pour identifier les individus jusqu'alors considérés comme *An. rivulorum*.

Une analyse morphologique plus poussée a permis de détecter un caractère discriminant, entre ces spécimens du Cameroun et les *An. rivulorum* typiques d'Afrique du Sud, les premiers ayant un thorax gris-noir alors que les seconds sont brun-orangés. Par ailleurs, l'analyse des séquences ITS2 et D3 de l'ADN ribosomal, a montré une divergence d'un niveau inter-spécifique entre les *An. rivulorum* de l'Est et du Sud de l'Afrique vis-à-vis des spécimens du centre et de l'Ouest de l'Afrique.

Les critères morphologiques et moléculaires constituent ensemble des arguments très probants pour l'existence d'une espèce supplémentaire dans le groupe *Funestus*, proche d'*An. rivulorum*. Nous avons temporairement nommé cette nouvelle espèce « *An. rivulorum-like* ». Des séquences ITS2 publiées précédemment de spécimens du Burkina Faso (Hackett *et al.*, 1999) montrent qu'ils appartiennent à ce même taxon, dont l'aire de répartition s'étendrait donc au moins du Cameroun, en Afrique centrale, au Burkina Faso, en Afrique de l'Ouest.

Les autres espèces du groupe *Funestus* trouvées au Cameroun, *An. funestus s.s.* et *An. leesoni*, ne diffèrent pas significativement des individus d'Afrique du Sud, tant au niveau

morphologique qu'au niveau des séquences de l'ADN ribosomal et sont correctement identifiées par le test PCR.

La PCR spécifique d'espèces a donc été adaptée de manière à pouvoir identifier l'espèce nouvellement caractérisée, par ajout d'une amorce spécifique, et est ainsi utilisable au-delà du Sud de l'Afrique où elle avait été développée.

1.1.2. Rôle prépondérant d'*An. funestus* dans la transmission du paludisme dans un village du Sud-Cameroun :

Article 2: Cohuet, A., Simard, F., Wondji, C. S., Antonio-Nkondjio, C., Awono-Ambene, P. & Fontenille, D. High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* in a village of savannah-forest transition area in Cameroon. *Trop Med & Int Health* (soumis).

La disponibilité des outils moléculaires d'identification des membres des principaux groupes ou complexes a permis d'effectuer une étude de suivi de transmission dans le village de Nkoteng au Cameroun, avec une attention particulière sur la composition du groupe *Funestus* et du complexe *Gambiae*. Cette étude a montré qu'*An. funestus s.s.* est de loin le vecteur principal dans cette localité et est responsable de 88 % des piqûres infectantes à *P. falciparum*. *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis*, également présents, sont des vecteurs secondaires dans cette localité. La transmission est stable au cours de l'année avec un taux entomologique d'inoculation estimé à 172 piqûres infectantes par homme sur la période de janvier 1999 à octobre 2000.

An. funestus est le seul membre du groupe détecté sur les 352 spécimens testés par PCR spécifique d'espèces. *An. lesoni* et *An. rivulorum-like* qui avaient été trouvés plus au Nord dans le pays ne semblent donc pas présents dans cette localité. Le rôle majeur joué par *An. funestus* dans ce village n'est pas une exception en Afrique et confirme l'intérêt qu'il faut porter à cette espèce pour contrôler le paludisme.

1.2. Caractérisation de marqueurs microsatellites chez *An. funestus* s.s. :

1.2.1. Isolement de loci microsatellites :

Article 3 : Cohuet, A., Simard, F., Berthomieu, A., Raymond, M., Fontenille, D. & Weill, M., 2002. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes*, 2, 498–500.

Afin d'étudier le polymorphisme génétique d'*An. funestus*, des marqueurs microsatellites ont été isolés et s'ajoutent à ceux précédemment publiés (Sinkins *et al.*, 2000; Sharakhov *et al.*, 2001b). Pour cela, une banque d'ADN génomique d'*An. funestus* a été construite à partir d'individus du Sud du Cameroun. La banque a été criblée à l'aide de sondes oligonucléotidiques (TC)₁₀ et (TG)₁₀ marquées à la dioxigénine. Vingt et un clones positifs ont été purifiés et les inserts séquencés. Parmi eux, 18 correspondaient à des nouveaux loci microsatellites non identifiés jusqu'alors. Des amorces ont été choisies dans les régions flanquantes pour amplifier ces loci microsatellites. Les loci ont ensuite été testés pour l'existence d'allèles nuls. Seuls les loci ne présentant pas de déséquilibre de Hardy-Weinberg systématique sur l'ensemble des populations et ainsi supposés ne pas comporter d'allèle nul, ont été conservés pour l'analyse de structures génétiques.

1.2.2. Localisation sur le génome des loci microsatellites :

Article 4 : Sharakhov, I., Braginets, O., Grushko, O., Cohuet, A., Guelbeogo, M. W., Bocollini, D., Weill, M., Sagnon, N'F., Fontenille, D. & Besansky, N. A microsatellite physical map of the african human malaria vector *Anopheles funestus*. *J Hered* (accepté).

Les loci microsatellites d'*An. funestus*, isolés par différentes équipes ont été localisés sur le génome par hybridation *in situ*, par l'équipe de Nora Besansky à Notre-Dame (USA). Pour cela des sondes correspondant à chacun des loci microsatellites ont été amplifiées et marquées à l'aide de fluorochrome. L'hybridation *in situ* de ces sondes sur des préparations de chromosomes polytènes a permis de localiser 32 loci polymorphes sur le génome, relativement aux inversions chromosomiques. Deux loci se situent sur le chromosome X, 10 sur le bras 2R, 7 sur le bras 2L, 7 sur le bras 3R et 6 sur le bras 3L. Quinze de ces loci sont

situés à l'intérieur d'inversions chromosomiques polymorphes connues et 17 hors des inversions.

La connaissance de la répartition des loci microsatellites est importante pour choisir un set de loci représentatif de l'ensemble du génome pour les études de structure des populations. Le positionnement vis-à-vis des inversions chromosomiques permet aussi de considérer les phénomènes d'autostop que peuvent éventuellement subir les loci à l'intérieur ou à proximité des inversions. A plus long terme, la localisation de nombreux loci microsatellites pourra aider à la cartographie du génome d'*An. funestus* par QTL (Quantitative Trait Loci) et à l'analyse de liaisons avec des gènes d'intérêt.

1.3. Structure des populations d'*An. funestus* :

1.3.1 Au Cameroun :

Article 5 : Cohuet, A., Dia, I., Simard, F., Raymond, M., Rousset, F., Antonio-Nkondjio, C., Awono-Ambene, P., Wondji, C. S., & Fontenille, D. Gene flow between chromosomal forms of the malaria vector *Anopheles funestus*, in Cameroon, Central Africa. *Genetics* (soumis).

Une étude de la structure génétique des populations d'*An. funestus* au Cameroun a été réalisée en confrontant les données cytogénétiques et microsatellites de populations géographiques collectées le long d'un transect Sud-Nord à travers le pays.

Les inversions chromosomiques montrent une distribution clinale, avec des karyotypes inversés (2Rh, 2Rd, 2Ra, 3Ra, 3Rb et 3La) au Sud du pays en zone de forêt humide alors que les karyotypes standards se trouvent plus au Nord, en zone de savane sèche.

La distribution clinale des inversions montre une corrélation entre des conditions écologiques et la fréquence des inversions. Elle suggère, comme chez *An. gambiae* et *An. arabiensis* un rôle des inversions dans l'adaptation à l'environnement (Coluzzi *et al.*, 1979, 1985; Toure *et al.*, 1998b, Petrarca *et al.*, 1986, 1987, 2000; Robert *et al.*, 1989).

En zone de transition savane-forêt, où les inversions sont polymorphes, deux types de situations sont rencontrées :

- à Tibati, les inversions chromosomiques montrent une forte structuration sur la base d'un fort déséquilibre de Hardy-Weinberg et déséquilibre de liaison. Ce profil est du même type que celui observé en Afrique de l'Ouest et renforce les observations précédentes de la subdivision des populations d'*An. funestus* en formes

chromosomiques « Folonzo » et « Kiribina » déjà décrite par Costantini *et al.* (1999).

- à Bankim, ces mêmes inversions, polymorphes, montrent la présence d'hétérokaryotypes à la fréquence attendue selon Hardy-Weinberg et une absence de déséquilibre de liaison entre les inversions. Les inversions suggèrent donc la panmixie à Bankim comme cela a déjà été rencontré, en Angola, en Afrique de l'Est, au Kenya et à Madagascar.

Par ailleurs, les fréquences génotypiques aux loci microsatellites situés dans et hors des inversions chromosomiques montrent que chacune des populations géographiques du Cameroun peut être considérée comme panmictique. La différenciation génétique entre les populations géographiques correspond à un isolement par la distance. L'hétérogénéité chromosomique n'est pas détectée par les marqueurs microsatellites. Ces données montrent que les formes chromosomiques ne sont pas génétiquement isolées.

Pour expliquer la structuration chromosomique des populations du Cameroun, plusieurs hypothèses sont envisageables :

- 1- La structuration chromosomique reflèterait un isolement reproductif abouti entre deux espèces.
- 2- La structuration pourrait être due au fait que les deux formes chromosomiques, bien que collectées ensemble au stade adulte, ne soient pas sympatriques au moment de l'accouplement. Tibati pourrait être une zone de contact entre les deux populations après l'accouplement, lorsque les femelles des différentes formes chromosomiques digèrent leur repas de sang.
- 3- Le déficit d'hétérokaryotypes serait dû à une contre-sélection par des facteurs environnementaux. Les inversions seraient des mutations sous-dominantes provoquant la baisse de fitness des hétérozygotes.

La présence des hétérokaryotypes à la fréquence attendue selon Hardy-Weinberg à Bankim, montre que les inversions chromosomiques révèlent une reproduction panmictique dans certains environnements et ne représentent donc pas des marqueurs d'espèces. De plus, le niveau de flux de gènes montré au Cameroun entre populations de formes chromosomiques différentes par les marqueurs microsatellites confirme que les formes chromosomiques ne

sont pas génétiquement isolées dans cette région. La première hypothèse peut donc être écartée.

Les deux autres hypothèses se basent sur le fait que les inversions chromosomiques sont sélectionnées par des environnements différents. Comme les formes chromosomiques sont trouvées en sympatrie à l'état adulte, nous supposons que la sélection s'exerce à l'état larvaire. Il existerait des gîtes larvaires de différents types, caractéristiques de chaque forme chromosomique.

La seconde hypothèse peut expliquer le profil obtenu au Cameroun. La séparation, même à petite échelle géographique, des gîtes larvaires caractéristiques des formes chromosomiques pourrait être à l'origine d'une homogamie. L'accouplement ayant lieu avant le premier repas sanguin et probablement au niveau des gîtes larvaires (Charlwood *et al.*, 2003), les unions entre individus de formes chromosomiques différentes seraient évitées. Les adultes collectés à Tibati dans les habitations pourraient provenir de gîtes larvaires différents et donc avec des marqueurs d'adaptation (les inversions) différents. A Bankim, la disposition des gîtes de type « Folonzo » et de type « Kiribina », plus proches, autoriserait les croisements entre formes chromosomiques. Cependant, si cette hypothèse reste plausible d'après les résultats obtenus au Cameroun, elle n'explique pas le fait que les croisements entre formes chromosomiques aient lieu en Afrique australe et de l'Est et pas en Afrique de l'Ouest.

Enfin, la troisième hypothèse concilie les profils trouvés à travers l'Afrique. Là encore, des gîtes larvaires de différents types permettraient le développement d'une forme chromosomique ou l'autre. Contrairement à l'hypothèse précédente, l'isolement entre les deux formes serait, non pas pré-zygotique, mais post-zygotique par contre-sélection des hybrides. Les larves hétérokaryotes seraient incapables de se développer dans les gîtes caractéristiques de chacune des formes chromosomiques et seraient contre-sélectionnées. Un troisième type de gîtes, moins sélectif, permettrait le développement larvaire des populations d'*An. funestus* indépendamment de leurs formes chromosomiques et ne contre-sélectionnerait pas les hétérokaryotes. Ce type de gîtes se trouverait dans le Sud et l'Est de l'Afrique et certaines régions de l'Afrique centrale comme à Bankim, mais serait absent en Afrique de l'Ouest et certaines régions de l'Afrique centrale comme à Tibati. La contre-sélection des hybrides peut être, comme nous l'avons vu en introduction de ce document, à l'origine d'une spéciation. Cependant, au Cameroun, l'existence de zones où les hybrides ne sont pas contre-sélectionnés maintient des flux de gènes entre les formes chromosomiques et évitent la divergence génétique.

1.3.2. Au Sénégal :

Article 6: Cohuet, A., Dia, I., Simard, F., Raymond, M. & Fontenille, D. Populations structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data. *Insect Mol Biol* (accepté).

Au Sénégal, nous avons étudié la structure génétique à l'aide de marqueurs microsatellites de 4 populations échantillonnées d'Ouest en Est du pays et pour lesquelles des données de cytogénétique étaient disponibles. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la population de Kouvar où les inversions chromosomiques avaient montré une forte structuration. Nos nouvelles données de cytogénétique ont confirmé que Kouvar serait une zone de sympatrie entre les deux formes chromosomiques.

Au Sénégal comme au Burkina Faso, mais contrairement au Cameroun, la panmixie entre karyotypes inversés et non inversés n'a encore jamais été observée. Si on considère l'hypothèse d'une contre-sélection des hétérozygotes, en Afrique de l'Ouest cette contre-sélection serait étendue sur une large échelle géographique. Un tel profil est en faveur de l'apparition d'un phénomène de renforcement qui aboutirait à une spéciation. La distribution des inversions chromosomiques pourrait donc refléter une spéciation naissante entre les formes chromosomiques en Afrique de l'Ouest. Cependant, nous avons vu que, malgré leur faible proportion, les hétérozygotes ne sont pas absents et leur contre-sélection n'est donc pas systématique. De plus, s'il est clair que la subdivision en formes chromosomiques Folonzo et Kiribina est adaptée aux populations du Burkina Faso, elle ne reflète qu'imparfaitement la structuration observée au Sénégal où la forme Kiribina, elle-même, est hétérogène avec des fréquences d'inversions très variables. Enfin, l'analyse des données des marqueurs microsatellites montre la panmixie dans chaque localité, y compris à Kouvar, et une différenciation des populations due à un isolement par la distance. La subdivision des populations révélée par la distribution des karyotypes n'est pas corrélée par une divergence génétique et serait donc en faveur de l'existence de flux de gènes entre les formes chromosomiques.

L'hypothèse d'une spéciation naissante en Afrique de l'Ouest est donc à nuancer. La distribution des inversions chromosomiques semble plus être dépendante de facteurs environnementaux qu'être le résultat d'un isolement reproductif et n'est pas accompagnée de divergence génétique détectée à ce jour.

2. PERSPECTIVES

2.1. Identification des espèces du groupe *Funestus* :

L'outil d'identification des espèces du groupe *Funestus* est encore imparfait dans le sens où toutes les espèces du groupe ne sont pas identifiables par la PCR diagnostique. C'est le cas des espèces *An. aruni*, *An. confusus*, *An. brucei*, *An. fuscivenosus* et *An. fluviatilis*, si on considère cette dernière comme appartenant à ce groupe. Les séquences ITS2, sur lesquelles est basé le test PCR diagnostique, sont inconnues pour ces espèces, et il est envisageable que les amorces spécifiques utilisées puissent hybrider de manière aspécifique sur ces séquences. Des identifications erronées sont donc encore possibles. Afin de les éviter, les espèces du groupe *Funestus* encore mal connues devront être davantage étudiées. Cependant, elles ont été décrites à partir de quelques individus qui sont précieusement conservés dans des collections. Leur rareté ne permet pas de les détruire et les conditions de leur conservation ne garantissent pas une qualité suffisante de l'ADN pour des analyses de biologie moléculaire. Dans le cas d'*An. brucei*, que nous aurions aimé comparer au taxon *An. rivulorum*-like en raison de ses caractéristiques morphologiques proches, l'espèce a été décrite à partir de 6 adultes et 3 larves qui se trouvent au British Natural History Museum à Londres (Service, communication personnelle). L'espèce n'a jamais été signalée ailleurs que dans sa localité type, Lokoja, au Nord du Nigéria. Pour déterminer la relation entre *An. rivulorum*-like et *An. brucei*, des investigations de terrain seraient donc nécessaires dans cette région difficile d'accès pour éventuellement trouver quelques *An. brucei*. Cet exemple illustre les difficultés de terrain que peut nécessiter la caractérisation moléculaire de chacune des espèces du groupe *Funestus*.

Toutefois, si ces difficultés techniques pouvaient être surmontées, les spécimens trouvés devraient être identifiés à l'aide des quelques critères morphologiques décrits dans la littérature et à l'aide des inversions chromosomiques discriminantes (Green, 1982; Green & Hunt, 1980). Les régions ITS2 devraient alors être séquencées pour inclure ces espèces dans le test PCR d'identification. Un tel outil permettrait de mieux connaître les aires de répartition de chacune des espèces du groupe. Les informations sur leur biologie et éventuelle capacité vectorielle sont quasiment inexistantes et pourraient alors être fournies.

D'après les critères morphologiques et génétiques, on peut considérer le taxon « *An. rivulorum*-like » comme une nouvelle espèce du groupe *Funestus*. Considérant l'isolement

reproductif comme étant le critère de définition de l'espèce (Mayr, 1942), il serait nécessaire de vérifier que les échanges génétiques entre *An. rivulorum*-like et les espèces les plus proches (génétiquement et morphologiquement) ne peuvent avoir lieu même en zone de sympatrie. Pour vérifier cela, des zones de sympatrie d'*An. rivulorum*-like avec *An. brucei* et avec *An. rivulorum* devraient être trouvées. De telles investigations nécessiteraient des prospections dans de nombreux pays, et la validation du statut d'espèce d'*An. rivulorum*-like ne justifie peut-être à ce jour pas une étude de telle ampleur. Ce questionnement s'applique à la plupart des espèces dans le groupe *Funestus*. Elles ont été décrites sur des critères morphologiques seulement et il semble bien trop lourd et parfois même impossible de confirmer l'isolement reproductif en trouvant des zones de sympatrie. Actuellement, 10 espèces sont décrites dans le groupe *Funestus* (considérant *An. lesoni* mais excluant *An. fluviatilis*). Il est probable que d'autres espèces, certainement non anthropophiles, existent. Cependant, leur recherche, bien que passionnante d'un point de vue de la systématique et de la phylogénie du groupe *Funestus*, n'apparaît pas comme une priorité de santé publique et sera difficile à mettre en œuvre.

Nous avons vu que la caractérisation des espèces n'appartient au seul domaine de la recherche fondamentale et qu'il existe des applications en termes de lutte contre le paludisme. Dans le groupe *Funestus* comme dans le complexe *An. gambiae*, il existe des exemples de mauvaises évaluations de l'efficacité de traitements insecticides à cause d'identifications erronées des espèces (De Meillon *et al.*, 1977; Green, 1981). Plus récemment, l'identification des espèces du groupe *Funestus* a mis en évidence que *An. parensis*, non vecteur, est quasiment la seule espèce trouvée dans les habitations humaines de villages Kenyan. Des pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides dans cette région ne cibleraient donc pas de vecteurs (Kamau *et al.*, 2003a). La caractérisation des espèces jumelles M et S dans le complexe *An. gambiae* a également permis de mieux comprendre la distribution de la mutation *kdr* ce qui est indispensable pour gérer l'expansion de la résistance aux insecticides (Chandre *et al.*, 1999). A plus long terme, d'autres applications sont envisageables. La comparaison d'espèces vectrices et non-vectrices phylogénétiquement proches permettra d'étudier les facteurs génétiques qui caractérisent un vecteur et éventuellement identifier des gènes impliqués dans la capacité vectorielle.

2.2. Statut taxonomique des formes chromosomiques d'*An. funestus* :

La structure génétique des populations d'*An. funestus* est complexe et aucune conclusion définitive ne peut être établie quant au statut taxonomique des formes chromosomiques. La distribution des inversions chromosomiques suggère un phénomène de spéciation en Afrique de l'Ouest mais pas en Afrique de l'Est et du Sud. Au Cameroun, en Afrique centrale, les deux types de situations sont observés dans deux localités distantes d'environ 130 km. Pour expliquer une telle structuration nous avons émis l'hypothèse d'une contre-sélection des hybrides dans certains environnements. La biologie des anophèles et le fait que les formes chromosomiques sont trouvées sympatriques à l'état adulte laisse supposer que la sélection des inversions chromosomiques aurait lieu au stade larvaire. La survie des hybrides dépendrait donc de la disponibilité d'un type de gîtes larvaires où ils ne seraient pas contre-sélectionnés.

Pour vérifier cette hypothèse des investigations de terrain sont nécessaires et devraient mettre en évidence des gîtes larvaires caractéristiques des formes chromosomiques. L'étude de la distribution des formes chromosomiques dans des gîtes larvaires de différentes caractéristiques pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse. Un tel travail comporte cependant de lourdes difficultés techniques, la première étant que les larves d'*An. funestus* sont réputées, à juste titre, difficiles à collecter de par la nature des gîtes et leur capacité à rester immergées longtemps. La seconde difficulté concerne l'élevage d'*An. funestus* et est certainement plus difficile à surmonter. En effet, la détection des inversions chromosomiques sur les chromosomes polytènes chez *An. funestus* se fait chez les femelles semi-gravidées fécondées. Les larves devraient donc être élevées et les femelles émergentes fécondées avant que leur karyotypes ne soient déterminés. Or l'élevage et la fécondation d'*An. funestus* en insectarium sont encore mal maîtrisés. A ce jour, une seule équipe a réussi à maintenir deux souches (M. Coetzee, communication personnelle). La caractérisation des karyotypes à partir de larves est donc particulièrement délicate. Chez *An. gambiae*, les chromosomes polytènes peuvent être obtenus à partir de glandes salivaires de larves de stade IV, bien que cette technique donne des préparations de chromosomes de moins bonne qualité et a été abandonnée. L'adaptation de cette technique sur *An. funestus* serait donc la plus pratique, mais est incertaine.

Le démantèlement du complexe *An. gambiae* a pris plusieurs décennies et est encore en cours. La relation entre l'adaptation à l'environnement et la spéciation n'est pas clairement

établie. La distribution des cytotypes en Afrique de l'Ouest montre que les conditions environnementales ont sélectionné des adaptations divergentes et seraient à l'origine de spéciation au sein d'*An. gambiae* s.s.. Des relations entre l'adaptation à l'environnement, les inversions chromosomiques et la spéciation ont été mises en évidence, mais ne sont pas directes. Ces relations sont d'autant plus difficiles à définir qu'on ne peut pas établir de limite franche entre adaptation à l'environnement et spéciation. Nous avons vu que la spéciation peut être une conséquence de l'adaptation à l'environnement mais il est aussi évident que toute adaptation environnementale ne provoque pas de spéciation. La divergence entre populations adaptées à des environnements différents, si elle ne touche que les gènes sélectionnés, peut être transitoire et réversible en fonction des variations environnementales.

Le cline de fréquence des inversions chromosomiques observé au Cameroun est en accord avec une adaptation différentielle des formes chromosomiques d'*An. funestus* à des environnements différents. Une divergence génétique doit exister sur des gènes impliqués dans l'adaptation, mais nos marqueurs microsatellite montre qu'elle n'atteint pas les parties du génomes non-sélectionnées. Si on ne peut pas exclure qu'un processus de spéciation soit en cours en Afrique de l'Ouest, il demeure certainement encore réversible et on ne peut pas s'avancer quant à son issue.

Le démantèlement du groupe *An. funestus* débute juste et pourrait nécessiter de très nombreuses études comme pour le complexe *An. gambiae*. Des études supplémentaires mettant en relation, marqueurs cytogénétiques, marqueurs moléculaires neutres et données écologiques sont absolument nécessaires. Certaines sont en cours sur des populations d'*An. funestus* de la Côte d'Ivoire, du Burkina Faso et de Madagascar dans le cadre de collaborations avec des équipes locales. Nous avons également entrepris une analyse de séquences neutres de l'ADN ribosomal et mitochondrial d'*An. funestus* karyotypés pour détecter d'éventuel marqueur de divergence génétiques entre les formes chromosomiques. Les résultats préliminaires ne révèlent aucune variabilité nucléotidique corrélable aux formes chromosomiques et renforcent donc les résultats obtenus à l'aide des microsatellites (Kengne, communication personnelle). A l'avenir, l'étude de la répartition de résistances à des insecticides sera certainement révélatrice de l'existence ou non de barrière de flux de gènes entre les formes chromosomiques d'*An. funestus* comme ça a été le cas pour *An. gambiae* (Chandre *et al.*, 1999; Fanello *et al.*, 2003).

2.3. Coévolution d'*An. funestus*-*P. falciparum*-*Homo sapiens*:

A ce jour, l'analyse des séquences du génome de *P. falciparum* est à l'origine de controverses concernant l'évolution de ce parasite (Hartl *et al.*, 2002). Des études sont en faveur d'ancêtres communs anciens qui seraient apparus et auraient coévolué avec l'homme (Escalante & Ayala, 1994, 1995; Hugues & Verra, 2002), alors que d'autres estiment que les populations contemporaines de *P. falciparum* auraient émergé à partir d'un petit nombre d'individus il y a moins de 10 000 ans (Joy *et al.*, 2003; Rich *et al.*, 1998; Volkman *et al.*, 2001). La compréhension des interactions du parasite avec l'hôte humain et le moustique vecteur pourrait aider à résoudre ce paradoxe. Une histoire de la coévolution entre l'homme, les populations anophéliennes et *P. falciparum* a été proposée récemment (Coluzzi, 1999, 2002; Hume *et al.*, 2003) et les connaissances sur le groupe *Funestus* viennent renforcer ces théories.

Le plus proche parent connu de *P. falciparum* est *P. reichenowi*, parasite des chimpanzés et des gorilles. Ces *Plasmodium* sont les seuls membres du sous-genre *Laverania*. Leur divergence daterait de 6 à 8 millions d'années et s'accorderait à celle entre les humains et les grands singes (Escalante & Ayala, 1994, 1995). Cependant, les données moléculaires sont contradictoires avec des régions du génome très variables et d'autres qui ont un faible polymorphisme et sont à l'origine des deux hypothèses concernant l'origine des populations de *P. falciparum*. De plus, la courte durée de vie chez ses hôtes humains, la gravité des manifestations cliniques qu'il déclenche suggère une origine récente du *P. falciparum* moderne. La génétique humaine témoigne également d'une pression de sélection récente due à *P. falciparum* avec l'apparition, il y a moins de 10 000 ans, de mutations conférant une meilleure résistance au parasite (allèles responsables de la déficience de la G6PDH, de la thalassémie et de la drépanocytose) (Tishkoff *et al.*, 2001; Currat *et al.*, 2002; Flint *et al.*, 1998). Le paradoxe sur l'origine de *P. falciparum* peut être expliqué par un changement majeur dans l'évolution du taxon « *falciparum* ». Les caractéristiques actuelles de l'espèce n'auraient pas émergé avant la révolution néolithique donc depuis moins de 10 000 ans. Auparavant, la transmission était conditionnée par un effectif réduit de populations d'hôtes, des groupes de chasseurs-cueilleurs nomades, qui ne permettaient qu'une transmission faible, et sporadique. La souche « ancestrale », pour être sélectionnées dans ces conditions, devait avoir une biologie proche de celle de l'actuel *P. malariae*, avec une survie à long-terme et des manifestations cliniques ne provoquant pas la mort de l'hôte. Les vecteurs devaient pouvoir se

gorger sur l'homme mais aussi sur d'autres animaux et leur biologie devait être comparable aux actuels *An. moucheti* et *An. nili*, des vecteurs secondaires forestiers et plutôt zoophiles.

D'après Coluzzi (1999, 2002), le lien étroit entre l'homme et les populations de vecteurs est apparu en forêt alors que des communautés agraires sédentaires se seraient établies et auraient constitué une nouvelle source de repas sanguins pour les populations anophéliennes. Les troupeaux de bovins sont absents dans les régions forestières car sont décimés par la trypanosomiase et ne constituent donc pas des sources alternatives de repas de sang comme en savane. Le caractère anthropophile exclusif a donc été sélectionné chez certains vecteurs. Cet événement aurait eu lieu il y a environ 2500 ans alors qu'une période de savanisation aurait incité des populations Bantus d'Afrique centrale à s'établir dans les forêts précédemment impénétrables. Les méthodes d'exploitation agricole liées à l'abattage et aux brûlis ont offert de nouveaux types de gîtes larvaires. Ainsi, il aurait été créé une nouvelle niche écologique avec la disponibilité de gîtes larvaires et de populations humaines sédentaires. Ceci aurait permis à des vecteurs de savane, ancêtres d'*An. gambiae* et *An. funestus*, de s'établir en région forestière avec un comportement dépendant de l'homme. L'augmentation considérable de la transmissibilité liée à la densité de vecteurs anthropophiles et endophiles et la disponibilité d'hôtes humains auraient radicalement changé le type de pression de sélection sur la population parasitaire et auraient favorisé l'émergence d'un clone à croissance rapide, de caractère « agressif », responsable d'infections aiguës et de courte durée chez l'hôte humain. Ce *P. falciparum* « moderne », sélectionné et transmis par des anophèles anthropisés, aurait remplacé la souche ou l'espèce ancestrale et se serait ensuite disséminé rapidement sur tout le globe, tirant avantage de la diffusion des populations d'anophèles et l'expansion de la population humaine qui s'est produite à partir de la révolution agraire.

Les observations sur la biologie des membres du groupe *Funestus* corroborent cette histoire évolutive. Les espèces autres que *An. funestus s.s.* se développent en savane dans des environnements indépendant de l'homme. Nous avons par exemple trouvé *An. lesoni* et *An. rivulorum* dans des cours d'eau et leur quasi absence dans les habitations humaines souligne que leur gîte de repos ne sont pas nécessairement fabriqué par l'homme. Le groupe *Funestus* a donc une origine ancestrale dans la savane et indépendante de l'homme. *An. funestus* a par contre été trouvé dans la savane comme en région forestière et nous avons remarqué le caractère particulièrement dépendant de l'homme en zone de forêt. Les gîtes larvaires en forêt sont toujours liés à l'homme et nécessite une destruction de l'épaisse couverture végétale et de la couche d'humus couvrant le sol de la forêt. Le caractère particulièrement anthropique

d'*An. funestus* a donc très probablement été sélectionné en forêt avant de diffuser sur l'ensemble de l'Afrique. La diffusion récente des populations d'*An. funestus* et *An. gambiae* « modernes » en zone de savane serait à l'origine de nouvelles pressions de sélection et donc de nouvelles adaptations à l'environnement dont les inversions chromosomiques sont des marqueurs. Dans le cas de M et S chez *An. gambiae*, ces adaptations auraient provoqué une nouvelle spéciation en Afrique de l'Ouest, alors que chez *An. funestus* on ne peut pas exclure que le processus de spéciation soit en cours dans cette même région.

Cette histoire évolutive de la triade homme-anophèles-plasmodies en Afrique souligne l'impact de l'homme sur la transmission de *P. falciparum* et la connaissance de l'histoire évolutive et de la génétique des populations de ce parasite est importante pour envisager des réponses possibles aux médicaments et stratégies vaccinales.

2.4. La transmission et la lutte antivectorielle :

Les différentes études de transmission du paludisme en Afrique ont montré des situations très variées, selon les régions, les climats et les gîtes disponibles. Dans la plupart des régions, les vecteurs sont multiples. Ils peuvent se succéder au cours des saisons ou assurer la transmission en même temps. Au Sud du Cameroun par exemple, dans un rayon de quelques dizaines de kilomètres, la transmission peut-être essentiellement due à *An. funestus*, *An. gambiae*, *An. moucheti* ou *An. nili*. Cette diversité souligne le fait que des études du mode de transmission doivent être multipliées et que les moyens de lutte antivectorielle doivent être adaptés à chacune des situations entomologiques.

Dans le cas du village de Nkoteng où la transmission palustre a été suivie au cours de cette étude, nous avons vu que la transmission était due à *An. funestus* et *An. gambiae*, *An. funestus* était responsable de 88 % des piqûres infestantes et de la stabilité de la transmission du paludisme au cours des saisons. Si la lutte anti-larvaire est très complexe dans le cas d'*An. gambiae* dont les gîtes se composent de la moindre flaque d'eau, l'élimination de certains gîtes larvaires d'*An. funestus* est plus facilement envisageable.

A Nkoteng, le principal gîte larvaire d'*An. funestus* est une retenue d'eau artificielle due à l'urbanisation. L'assainissement du gîte par drainage ou le désherbage régulier de la retenue d'eau constituerait une mesure qui pourrait éviter une grande partie des infections. D'un autre côté, la transmission palustre, si elle n'était plus due qu'à *An. gambiae* deviendrait instable et l'immunisation des personnes serait plus lente. Un système de surveillance des épidémies et

l'accès aux soins des personnes deviendrait alors encore plus indispensable. Ce n'est qu'ainsi, en assurant une lutte intégrant les aspects entomologiques et cliniques que le contrôle du paludisme pourra se traduire en une baisse de mortalité et morbidité.

Les questions sur la biologie des vecteurs prennent une importance nouvelle actuellement avec l'inquiétude des pays « du Nord » de voir apparaître ou réapparaître les maladies à vecteurs dans leurs pays à cause des changements climatiques.

Les études sur les conséquences des changements climatiques sur la répartition du paludisme montrent un impact assez limité (Hays *et al.*, 2002a, 2002b; Kovats *et al.*, 1999; Rogers & Randolph, 2000) mais ceci est sujet à controverses (Patz *et al.*, 2002). Globalement, les changements climatiques vont très probablement déplacer les zones à risques épidémiologiques (Rogers & Randolph, 2000). La connaissance de la biologie des vecteurs est donc indispensable pour comprendre et anticiper les éventuelles modifications des populations vectrices.

2.5. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle :

Aujourd'hui, l'utilisation de moustiquaires imprégnées constitue une des méthodes privilégiées pour limiter le contact entre l'homme et le vecteur (Hougard *et al.*, 2002). Bien que son efficacité soit parfois discutée du fait que la réduction du taux de transmission ne se répercute pas forcément en termes de mortalité et morbidité (Snow & Marsh, 1995; Trape *et al.*, 2002; Trape & Rogier, 1996), l'utilisation de moustiquaires imprégnées s'est montrée efficace dans de nombreuses conditions épidémiologiques (Alonso *et al.*, 1993; Binka *et al.*, 1996; d'Allesandro *et al.*, 1995; d'Allesandro & Coosemans, 1997; Habluetzel *et al.*, 1997; Nevill *et al.*, 1996, Maxwell *et al.*, 2002, Schellenberg *et al.*, 2001). De plus, en l'absence de moyens alternatifs c'est actuellement la meilleure méthode de lutte contre les vecteurs en Afrique.

En raison de son comportement très anthropophile et endophile, *An. funestus* est une cible privilégiée des insecticides utilisés pour la pulvérisation des murs des habitations et pour l'imprégnation des moustiquaires. Les études sur la sensibilité d'*An. funestus* aux insecticides, encore peu nombreuses, montrent déjà plusieurs cas de résistance dans différentes familles d'insecticides : dieldrine, DDT (organochlorés), malathion, fenitrothion (organophosphorés) et perméthrine (pyréthrinoïdes) (Brooke *et al.*, 2001; Brown, 1986; Hargreaves *et al.*, 2000;

Toure, 1982). Les mécanismes qui confèrent ces résistances sont totalement inconnus chez *An. funestus* sauf dans le cas de la résistance aux pyréthrinoïdes, qui a été trouvée associée à l'augmentation de l'activité oxydase (Brooke *et al.*, 2001). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes de résistance aux insecticides et gérer l'extension de ces résistances dans les populations naturelles.

Cependant, l'élevage d'*An. funestus* en insectarium est très délicat. Seules deux souches de référence sensible et résistante sont pour l'instant maintenues en insectarium, en Afrique du Sud, et elles ne sont pas, à ce jour, mises à la disposition des autres équipes de recherche. La mise au point de l'élevage de différentes colonies d'*An. funestus* constitue donc la première étape nécessaire à l'étude de la résistance aux insecticides dans cette espèce.

2.6. Lutte antivectorielle par moustiques génétiquement modifiés :

L'utilisation de techniques génétiques pour la lutte contre le paludisme pourrait en théorie intervenir par deux moyens.

Le premier moyen cible la population de vecteurs en tentant de diminuer sa taille. Le lâcher de mâles stériles s'est montré efficace pour l'éradication d'insectes nuisibles dans quelques rares cas (Benedict & Robinson, 2003; Krafusur, 1998), mais la production de mâles stériles en masse pour lutter contre une endémie de l'ampleur du paludisme (en termes de taille et de diversité de populations vectrices et de l'étendue) est irréalisable. Plus récemment, une amélioration à la technique de l'utilisation de mâles stériles a été imaginée. Cette technique, nommée RIDL (Release of Insects carrying a Dominant Lethal), consiste en un lâcher de mâles transgéniques portant un gène dominant létal pour les femelles. La modélisation de cette technique montre une efficacité supérieure à celle du simple lâcher de mâles stériles (Thomas *et al.*, 2000). Cependant, elle semble encore ne pouvoir être applicable que dans le cas de populations de vecteurs de tailles limitées. Son efficacité dans le cadre de la lutte contre le paludisme dont les populations de vecteurs sont de très grande taille (Lehmann *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1993; 2001) est donc peu probable.

La seconde voie est beaucoup plus largement envisagée et fait l'objet de nombreuses études : le remplacement de populations compétentes par des populations génétiquement modifiées pour leur compétence vectorielle et ainsi devenues réfractaires pour les parasites. Dès 1968, Curtis proposait un contrôle génétique des maladies à vecteurs (Curtis, 1968). Cette technique nécessite quatre principaux pré-requis : (1) la transformation génétique de souches

de vecteurs, (2) l'identification de gènes cibles dont la modification pourra entraîner le blocage du développement parasitaire, (3) la diffusion du ou des gènes d'intérêt dans les populations naturelles de vecteurs et enfin (4) il faut s'assurer de l'innocuité et de l'acceptabilité d'une telle technique utilisant des organismes, vecteurs de parasites, génétiquement modifiés (Alphey *et al.*, 2002).

Les deux premiers points ne devraient pas constituer des barrières majeures à l'utilisation de moustiques transgéniques puisque déjà des souches stables de moustiques transformées ont été obtenues (Catteruccia *et al.*, 2000; Coates *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2001). De nombreux gènes de l'immunité chez les anophèles sont à présent identifiés et certains d'entre eux pourraient constituer des cibles bien que le caractère réfractaire soit probablement multigénique (Barillas-Murry *et al.*, 2000; Dimopoulos *et al.*, 2000, 2001; Dimopoulos, 2003; Foy *et al.*, 2002; Oduol *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 1997). Le gène SM1 (Salivary gland and Midgut binding peptide 1) a par exemple déjà été identifié comme étant une cible judicieuse puisqu'une souche transgénique d'*An. stephensi* pour laquelle ce gène a été introduit et surexprimé se montre effectivement moins susceptible à l'infection par *P. berghei* (Ito *et al.*, 2002).

Le troisième pré-requis à l'efficacité d'une telle approche génétique pour la lutte contre le paludisme étant la diffusion du transgène dans les populations naturelles, il constitue une étape beaucoup plus difficile à franchir. En effet, un gène à transmission mendélienne ne pourrait diffuser dans les populations naturelles qu'à condition de procurer un avantage sélectif aux populations transformées. Or, il a été montré, dans l'unique étude publiée à ce jour, que la transformation des moustiques provoque au contraire une baisse de la fitness (Catteruccia *et al.*, 2003). Dans de telles conditions, le gène serait très vite contre sélectionné et disparaîtrait. L'association du gène d'intérêt à un transposon faisant intervenir une transmission horizontale par des systèmes viraux (Daniels *et al.*, 1990; Handler, 2002; Hurst *et al.*, 1992; Robertson, 1993) procure un avantage sélectif pour le transposon par rapport aux gènes transmis de façon mendélienne (Kidwell & Ribeiro, 1992; Ribeiro & Kidwell, 1994). Le transgène associé au transposon pourrait diffuser comme un agent infectieux dans la totalité de la population vectrice. Il a également été envisagé que la diffusion du transgène soit assurée par des souches modifiées du genre *Wolbachia*, microorganisme intracellulaire répandu chez les insectes et dont l'infection peut procurer un avantage sélectif (Benedict & Robinson, 2003; Dobson, 2003; Curtis & Sinkins, 1998). La diffusion du transgène dans la population naturelle dépend de trois facteurs essentiels : (1) le bénéfice de l'acquisition du

caractère réfractaire ainsi que (2) son coût pour le moustique et (3) la capacité de diffusion du vecteur génétique (transposons ou *Wolbachia* transformés, par exemple).

Le bénéfice à acquérir une immunité (et donc le coût de l'infection) a été montré (Anderson *et al.*, 1999; Ferguson, 2002; Hogg & Hurd, 1995a, 1995b, 1997; Hopwood *et al.*, 2001; Jahan & Hurd, 1998; Koella, 2002), mais parallèlement, le coût de la réponse immunitaire, elle-même, a aussi été mis en évidence (Kraaijeveld & Godfray, 1997; McKean & Nunnery, 2001; Moret & Schmid-Hempel, 2000). Le fait que les *Plasmodium* soient très rarement mélanisés dans la nature (Schwartz & Koella, 2002) suggère un coût élevé de ce type de réponse immunitaire par rapport au coût de l'infection pour le moustique ce qui n'est pas en faveur d'une diffusion pour un transgène. Concernant la capacité de diffusion des transposons, la souche transformée pour le gène SM1 à l'aide du transposon *Minos* montre une transmission mendélienne du caractère réfractaire (Catteruccia, 2000), il ne serait donc pas capable, tel quel, de diffuser en condition naturelle. Enfin, un modèle développé par Boëte & Koella (2002) montre que si l'étape fondamentale de la diffusion du gène conférant la résistance aux parasites était surpassée, la technique ne serait efficace que dans le cadre d'un profil de transmission palustre modérée et que si le gène introduit confère une réponse immune d'une efficacité proche de 100 %.

Le dernier pré-requis est d'assurer l'innocuité d'une telle technique. Or, de nombreuses questions restent sans réponse. Quels effets auront les conditions environnementales naturelles sur l'expression du transgène ? Est ce que la capacité de transmission des autres pathogènes que ceux ciblés sera modifiée ? La variabilité et la plasticité génétique étant caractéristiques des *Plasmodium* (Gardern *et al.*, 2002; Rich *et al.*, 2000), il faut s'attendre à une réponse face à la nouvelle pression de sélection conférée par ces moustiques « réfractaires ». Des parasites résistants aux moustiques modifiés apparaîtront certainement et on ne peut rien prévoir quant à leur nouvelles caractéristiques et surtout leur virulence (Scott *et al.*, 2002; de Roode & Read, 2003). Dans ces conditions et dans un climat général de méfiance vis-à-vis des organismes génétiquement modifiés, l'acceptabilité des moustiques transgéniques semble impossible.

La perspective d'une lutte antivectorielle à l'aide de moustiques génétiquement modifiés est donc encore lointaine. En l'état actuel des connaissances, elle ne pourrait être éventuellement efficace que contre une seule population de vecteurs. Or, au cours de nombreux travaux, dont ce travail de thèse, il a été clairement montré que la transmission du paludisme est due à plusieurs espèces et qu'au sein des espèces peuvent se trouver des

populations structurées. L'introduction de gènes d'intérêt n'engendrerait donc pas nécessairement une diffusion dans l'ensemble des populations de vecteurs et n'aurait alors pas d'impact majeur sur la transmission palustre.

2.7. Identification de gènes d'intérêt

Le séquençage du vecteur *An. gambiae* est à l'origine d'une accélération de la compréhension génétique de nombreux mécanismes. L'identification d'une mutation responsable de la résistance aux insecticides de type organophosphorés et carbamates (Acétylcholine estérase) en est un des premiers exemples (Weill *et al.*, 2003).

La disponibilité du génome d'*An. gambiae* et son annotation pourront apporter beaucoup d'informations génétiques y compris pour les autres vecteurs du paludisme, dont *An. funestus*. L'identification de gènes chez *An. gambiae* servira à identifier certains gènes d'*An. funestus* par homologie, et la comparaison des génomes permettra une vision plus globale de la génétique chez les anophèles. La connaissance des gènes de résistance aux insecticides est un exemple, mais d'autres domaines présentent de grand intérêt comme l'identification des gènes impliqués dans l'immunité contre les parasites, les gènes associés à la capacité vectorielle (gènes de l'anthropophilie, d'adaptation à certains environnements...).

L'identification de ce type de gènes peut présenter un intérêt en termes de lutte contre le paludisme par plusieurs voies. La caractérisation de la résistance aux insecticides peut orienter la recherche de nouveaux insecticides pour « contourner » une résistance, ou la compréhension des mécanismes d'action des insecticides peuvent suggérer des méthodes de gestions de la résistance en utilisant les insecticides de la manière la plus ciblée et la plus efficace. La compréhension des mécanismes de l'immunité des moustiques face aux parasites pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles perspectives de « blocage » de la transmission palustre. En stimulant la réaction immunitaire des moustiques infectés, la barrière déjà sélective entre l'estomac du moustique et les glandes salivaires pourrait éventuellement devenir totalement imperméable et empêcher la transmission. Enfin la caractérisation des gènes liés à la capacité vectorielle comme le choix de l'hôte pour le repas sanguin pourrait aider à déterminer de nouvelles stratégies de lutte pour détourner le moustique de l'homme.

Ces applications encore lointaines ne seront pas toutes réalisables, mais elles doivent être à ce jour toutes considérées pour que les voies les plus judicieuses soient déterminées.

D'une manière générale, notre étude souligne la complexité du système vectoriel en Afrique, les principaux vecteurs eux-mêmes étant encore imparfaitement connus. La transmission n'est que rarement assurée par une seule espèce et la lutte antivectorielle doit donc considérer l'ensemble des vecteurs. Les avancées rapides actuelles et futures sur la connaissance d'*An. gambiae* ne doivent pas masquer l'importance des autres vecteurs et il faut prendre en compte que la lutte contre une seule population n'aurait aucun impact à grande échelle.

Nous avons vu que, quel que soit le moyen de lutte contre le paludisme envisagé, la connaissance du profil de transmission est indispensable. En particulier le fait de limiter la transmission palustre et passer d'un niveau de transmission stable à instable, entraînant le ralentissement de l'acquisition de la prémunition, peut avoir pour seul effet de différer la mortalité des enfants vers un âge plus élevé. La lutte contre le paludisme doit donc intégrer l'ensemble des données épidémiologiques et considérer l'ensemble des moyens à disposition que ce soit au niveau de la lutte antivectorielle, la prophylaxie, le traitement des accès palustres et éventuellement plus tard la vaccination.

Références bibliographiques

- Alonso, P.L., Lindsay, S.W., Armstrong Schellenberg, J.R., *et al.* (1993) A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, west Africa. 6. The impact of the interventions on mortality and morbidity from malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87 Suppl 2**, 37-44.
- Alphey, L., Beard, C.B., Billingsley, P., *et al.* (2002) Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science* **298**, 119-121.
- Alvarez, G., Zapata, C. (1997) Conditions for protected inversion polymorphism under supergene selection. *Genetics* **146**, 717-722.
- Anderson, R.A., Koella, J.C., Hurd, H. (1999) The effect of *Plasmodium yoelii* nigeriensis infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **266**, 1729-1733.
- Angers, B., Bernatchez, L. (1997) Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Mol Biol Evol* **14**, 230-238.
- Antonio-Nkondjio, C., Awono-Ambene, P., Toto, J.C., *et al.* (2002) High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J Med Entomol* **39**, 350-355.
- Arens, P., Odinet, P., van Heusden, A.W., Lindhout, P., Vosman, B. (1995) GATA- and GACA-repeats are not evenly distributed throughout the tomato genome. *Genome* **38**, 84-90.
- Arnold, M.L., Bennett, B.D. (1993) Natural hybridization in Louisiana irises: genetic variation and ecological determinants. In: *Hybrid zones and the evolutionnary process* (ed. Harrison RG), Oxford University Press, Oxford, pp. 115-139.
- Asmussen, M.A. (1986) The dynamics of interlocus associations in the three locus hitchhiking model. 1. The three-way linkage disequilibrium function. *J Math Biol* **23**, 285-304.
- Aultman, K.S., Beaty, B.J., Walker, E.D. (2001) Genetically manipulated vectors of human disease: a practical overview. *Trends Parasitol* **17**, 507-509.
- Barillas-Mury, C., Wizel, B., Han, Y.S. (2000) Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 429-442.
- Barton, N.H., Halliday, R.B., Hewitt, G.M. (1983) Rare electrophoretic variants in a hybrid zone. *Heredity* **50**, 139-146.

- Beebe, N.W., 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.
- Behe, M.J. (1987) The DNA sequence of the human beta-globin region is strongly biased in favor of long strings of contiguous purine or pyrimidine residues. *Biochemistry* **26**, 7870-7875.
- Behe, M.J. (1995) An overabundance of long oligopurine tracts occurs in the genome of simple and complex eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **23**, 689-695.
- Beier, J.C., Perkins, P.V., Wirtz, R.A., *et al.* (1988) Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol* **25**, 9-16.
- Bell, C.J., Ecker, J.R. (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.
- Benedict, M.Q., Robinson, A.S. (2003) The first release of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol* **19**, 349-355.
- Benkman, C.W. (1993) Adaptation to single resources and the evolution of crossbill (*Loxia*) diversity. *Ecol monog* **63**, 305-325.
- Besansky, N.J., Krzywinsky, J., Lehmann, T., *et al.* (2003) Semipermeable species boundaries between *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*: evidence from multilocus DNA sequence variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10818-10823.
- Binka, F.N., Kubaje, A., Adjuik, M., *et al.* (1996) Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop Med Int Health* **1**, 147-154.
- Black, W.C.t., Lanzaro, G.C. (2001) Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.: introgressive hybridization, adaptive inversions, or recent reproductive isolation? *Insect Mol Biol* **10**, 3-7.
- Blanquer-Maumont, A., Crouau-Roy, B. (1995) Polymorphism, monomorphism, and sequences in conserved microsatellites in primate species. *J Mol Evol* **41**, 492-497.
- Boccolini, D., Carrara, G.C., Cani, P.J., Costantini, C. (2002) Preliminary data on *Anopheles funestus* chromosomal polymorphism in a peri-urban site of Western Angola. *Parassitologia* **44**, 22.

- Boccolini, D., Sabatini, A., Sanogo, E., Sagnon, N., Coluzzi, M., Costantini, C. (1994) Chromosomal and vectorial heterogeneities in *Anopheles funestus* from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* **36**, 20.
- Boccolini, D., Sagnon, N., Touré, Y.T. (1998) Chromosomal polymorphism in *Anopheles funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia* **40**, 14.
- Boëte, C., Koella, J.C. (2002) A theoretical approach to predicting the success of genetic manipulation of malaria mosquitoes in malaria control. *Malar J* **1**, 3.
- Bossart, J.L., Pashley Prowell, D. (1998) Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *T.R.E.E.* **13**, 202-206.
- Brooke, B.D., Kloke, G., Hunt, R.H., *et al.* (2001) Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* **91**, 265-272.
- Brown, A.W. (1986) Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc* **2**, 123-140.
- Bryan, J.H., Di Deco, M.A., Petrarca, V., Coluzzi, M. (1982) Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.s. in The Gambia, West Africa. *Genetica* **59**, 167-176.
- Burkot, T.R., Williams, J.L., Schneider, I. (1984) Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* **33**, 783-788.
- Bush, G. (1992) Host race formation and sympatric speciation in *Rhagoletis* fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Psyche* **99**, 335-358.
- Bush, G.L. (1969) Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution* **23**, 237-251.
- Caceres, M., Barbadilla, A., Ruiz, A. (1999) Recombination rate predicts inversion size in Diptera. *Genetics* **153**, 251-259.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., *et al.* (1993) Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am J Hum Genet* **52**, 922-927.
- Carnevale, P., Le Goff, G., Toto, J.C., Robert, V. (1992) *Anopheles nili* as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon. *Med Vet Entomol* **6**, 135-138.
- Catteruccia, F., Godfray, H.C., Crisanti, A. (2003) Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science* **299**, 1225-1227.

- Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T.G., *et al.* (2000) Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**, 959-962.
- Cavalié, P., Mouchet, J. (1961) Les campagnes expérimentales d'éradication du paludisme dans le Nord de la république du Cameroun. Première partie. Les vecteurs de l'épidémiologie du paludisme dans le Nord-Cameroun. *Med Trop* **21**, 847-870.
- Chandre, F., Manguin, S., Brengues, C., *et al.* (1999) Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* **41**, 319-322.
- Charlwood, J., Thompson, R., Madsen, H. (2003) Observations on the swarming and mating behaviour of *Anopheles funestus* from southern Mozambique. *Malar J* **2**, 2.
- Charlwood, J.D., Smith, T., Lyimo, E., *et al.* (1998) Incidence of *Plasmodium falciparum* infection in infants in relation to exposure to sporozoite-infected anophelines. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 243-251.
- Charlwood, J.D., Vij, R., Billingsley, P.F. (2000) Dry season refugia of malaria-transmitting mosquitoes in a dry savannah zone of east Africa. *Am J Trop Med Hyg* **62**, 726-732.
- Coates, C.J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L., James, A.A. (1998) Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3748-3751.
- Coene, J. (1993) Malaria in urban and rural Kinshasa: the entomological input. *Med Vet Entomol* **7**, 127-137.
- Cohuet, A., Simard, F., Berthomieu, A., Raymond, M., Fontenille, D., Weill, M. (2002) Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes* **2**, 498-500.
- Cohuet, A., Simard, F., Toto, J.C., Kengne, P., Coetzee, M., Fontenille, D. (2003) Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 200-205.
- Collins, F., Besansky, N.J., Paskewitz, S.M. (1994) Peut-on espérer interrompre la transmission du paludisme par des vecteurs génétiquement modifiés? *Annales de l'Institut Pasteur* **5**, 324-329.
- Collins, F.H., Besansky, N.J. (1994) Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science* **264**, 1874-1875.
- Collins, F.H., Kamau, L., Ranson, H.A., Vulule, J.M. (2000) Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bull World Health Organ* **78**, 1412-1423.

- Collins, F.H., Mendez, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besansky, N.J., Finnerty, V. (1987) A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg* **37**, 37-41.
- Collins, F.H., 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.
- Coluzzi, M. (1982) Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes. In: *Mechanisms of Speciation* (ed. Barigozzi C), Alan Liss Inc, New York, pp. 143-153.
- Coluzzi, M. (1984) Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull World Health Organ* **62**, 107-113.
- Coluzzi, M. (1999) The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypothesis and interferences about origin, spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia* **41**, 277-283.
- Coluzzi, M. (2002) *Plasmodium falciparum* en Afrique subsaharienne. In: *Susceptibilité aux maladies infectieuses.*, Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
- Coluzzi, M., Petrarca, V., Di Deco, M.A. (1985) Chromosomal inversion intergradation in incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.* **52**, 45-63.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., della Torre, A., Di Deco, M.A., Petrarca, V. (2002) A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science Express Report*, 2002 Oct 2003, published online.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V., Di Deco, M.A. (1979) Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **73**, 483-497.
- Cornel, A.J., Porter, C.H., 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**, 109-116.
- Costantini, C., Li, S.G., della Torre, A., Sagnon, N., Coluzzi, M., Taylor, C.E. (1996) Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. *Med Vet Entomol* **10**, 203-219.
- Costantini, C., Sagnon, N., Ilboudo-Sanogo, E., Coluzzi, M., Boccolini, D. (1999) Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* **41**, 595-611.

- Crow, J.F., Kimura, M. (1970) *An introduction to population genetics theory* Harper and Row, New York, Evanston and London.
- Currat, M., Trabuchet, G., Rees, D., *et al.* (2002) Molecular analysis of the beta-globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the beta(S) Senegal mutation. *Am J Hum Genet* **70**, 207-223.
- Curtis, C., Sinkins, S. (1998) *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parasitology* **116**, 111-115.
- Curtis, C.F. (1968) Possible use of translocations to fix desirable genes in insect pest populations. *Nature* **218**, 368-369.
- Curtis, C.F., Pates, H.V., Takken, W., *et al.* (1999) Biological problems with the replacement of a vector population by *Plasmodium*-refractory mosquitoes. *Parassitologia* **41**, 479-481.
- d'Alessandro, U., Coosemans, M. (1997) Concerns on long-term efficacy of an insecticide-treated bednet programme on child mortality. *Parasitol Today* **13**, 124-125.
- d'Alessandro, U., Olaleye, B.O., McGuire, W., *et al.* (1995) Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *Lancet* **345**, 479-483.
- Daniels, S.B., Peterson, K.R., Strausbaugh, L.D., Kidwell, M.G., Chovnick, A. (1990) Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. *Genetics* **124**, 339-355.
- De Meillon, B. (1936) *Studies on insects of medical importance in South Africa- III*. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- De Meillon, B., Van Eeden, G., Coetzee, L., *et al.* (1977) Observations on a species of the *Anopheles funestus* subgroup, a suspected exophilic vector of malaria parasites in North-Eastern Transvaal, South Africa. *Mosq news* **37**, 657-661.
- de Roode, J.C., Read, A.F. (2003) Evolution and ecology, after the malaria genomes. *TREE* **18**, 60-61.
- della Torre, A., Costantini, C., Besansky, N.J., *et al.* (2002) Speciation within *Anopheles gambiae*-the glass is half full. *Science* **298**, 115-117.
- della Torre, A., Fanello, C., Akogbeto, M., *et al.* (2001) Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae s.s.* in West Africa. *Insect Mol Biol* **10**, 9-18.

- Depaulis, F., Brazier, L., Veuille, M. (1999) Selective sweep at the *Drosophila melanogaster* *Suppressor of Hairless* locus and its association with the In(2L)t inversion polymorphism. *Genetics* **152**, 1017-1024.
- Di Deco, M.A., Petrarca, V., Villani, F., Coluzzi, M. (1980) Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di *Anopheles* allevati in laboratorio. *Parassitologia* **22**, 304-306.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3166-3170.
- Dia, I., Boccolini, D., Antonio-Nkondjio, C., Costantini, C., Fontenille, D. (2000b) Chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* from forest villages of South Cameroon. *Parassitologia* **42**, 227-229.
- Dia, I., Diop, T., Rakotoarivony, I., Kengne, P., Fontenille, D. (2003) Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean Zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol* **40**, 279-283.
- Dia, I., Lochouart, L., Boccolini, D., Costantini, C., Fontenille, D. (2000a) Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* **7**, 179-184.
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., et al. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**, 152-154.
- Dietrich, W.F., Miller, J., Steen, R., et al. (1996) A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**, 149-152.
- Dimopoulos, G. (2003) Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol* **5**, 3-14.
- Dimopoulos, G., Casavant, T.L., Chang, S., et al. (2000) *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6619-6624.
- Dimopoulos, G., Muller, H.M., Levashina, E.A., Kafatos, F.C. (2001) Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Curr Opin Immunol* **13**, 79-88.
- Dobson, S.L. (2003) Reversing *Wolbachia*-based population replacement. *Trends Parasitol* **19**, 128-133.

- Dobzhansky, T. (1951) *Genetics and the origin of species* Columbia University Press, New York.
- Donnelly, M.J., Simard, F., Lehmann, T. (2002) Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends Parasitol* **18**, 75-80.
- Elissa, N., Karch, S., Bureau, P., *et al.* (1999) Malaria transmission in a region of savanna-forest mosaic, Haut-Ogooue, Gabon. *J Am Mosq Control Assoc* **15**, 15-23.
- Escalante, A.A., Ayala, F.J. (1994) Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11373-11377.
- Escalante, A.A., Ayala, F.J. (1995) Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5793-5797.
- Estoup, A., Cornuet, J.M. (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. In: *microsatellites, Evolution and Applications* (eds. Goldstein DB, Schlötterer C), Oxford University Press, New York, pp. 49-65.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (1995a) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* **140**, 679-695.
- Estoup, A., Solignac, M., Harry, M., Cornuet, J.M. (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res* **21**, 1427-1431.
- Estoup, A., Tailliez, C., Cornuet, J.M., Solignac, M. (1995b) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol Biol Evol* **12**, 1074-1084.
- Evans, A. (1938) *Mosquitoes of the Ethiopian Region.II*. British Museum of Natural History.
- Evans, A., Garnham, C. (1936) The *funestus* series of *Anopheles* at Kisumu and the coastal locality in Kenya. *Ann Trop Med Parasit* **30**, 511-513.
- Evans, A., Leeson, H. (1937) Notes on variation in *Anopheles rivulorum* Leeson in East Africa, with description of a new variety. *Ann Trop Med Parasit* **31**.
- Fagerberg, A.J., Fulton, R.E., Black, W.C. (2001) Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **10**, 225-236.
- Fanello, C., Petrarca, V., Della Torre, A., *et al.* (2003) The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae s.s.* *Insect Mol Biol* **12**, 241-245.

- Favia, G., della Torre, A., Bagayoko, M., *et al.* (1997) Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* **6**, 377-383.
- Feder (1998) The apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*. In: *Endless forms, species and speciation* (eds. Howard DJ, Berlocher SH), Oxford University Press, Oxford, pp. 130-144.
- Feldman, M.W., Bergman, A., Pollock, D.D., Goldstein, D.B. (1997) Microsatellite genetic distances with range constraints: analytic description and problems of estimation. *Genetics* **145**, 207-216.
- Ferguson, H.M. (2002) Why is the impact of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? *Trends Parasitol* **18**, 256-261.
- Field, D., Wills, C. (1998) Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1647-1652.
- Flint, J., Harding, R.M., Boyce, A.J., Clegg, J.B. (1998) The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* **11**, 1-51.
- Fontenille, D., Lochouarn, L. (1999) The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia* **41**, 267-271.
- Fontenille, D., Lochouarn, L., Diagne, N., *et al.* (1997a) High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* **56**, 247-253.
- Fontenille, D., Lochouarn, L., Diatta, M., *et al.* (1997b) Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**, 647-652.
- Fontenille, D., Meunier, J.Y., Nkondjio, C.A., Tchuinkam, T. (2001) Use of circumsporozoite protein enzyme-linked immunosorbent assay compared with microscopic examination of salivary glands for calculation of malaria infectivity rates in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Cameroon. *J Med Entomol* **38**, 451-454.
- Fontenille, D., Rakotoarivony, I. (1988) Reappearance of *Anopheles funestus* as a malaria vector in the Antananarivo region, Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **82**, 644-645.

- Fontenille, D., Wanji, S., Djouaka, R., Awono-Ambene, P. (2000) *Anopheles hancocki*, vecteur secondaire du paludisme au Cameroun. *Bull liais doc OCEAC* **33**, 23-26.
- Foote, C.J., Larkin, P.A. (1988) The role of male choice in the assortative mating of anadromous and non-anadromous sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Behaviour* **106**, 43-62.
- Foy, B.D., Killen, G.F., Magalhaes, T., Beier, J.C. (2002) Immunological targeting of critical insect antigens. *Am Entomol* **48**, 150-158.
- Fritz, G.N., Conn, J., Cockburn, A., Seawright, J. (1994) Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol* **11**, 406-416.
- Gaggiotti, O.E., Lange, O., Rassmann, K., Gliddon, C. (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol Ecol* **8**, 1513-1520.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498-511.
- Garza, J.C., Freimer, N.B. (1996) Homoplasy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Res* **6**, 211-217.
- Gilles, H.M., Warrell, D.A. (1980) *Bruce-Chwatt's essential malariology* Edward Arnold.
- Gillies, M., Coetzee, M. (1987) *A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara* The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Gillies, M., De Meillon, B. (1968) *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region)*, 2^o Ed. edn. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (1999) *Microsatellites, Evolution and Applications* Oxford University Press, New York.
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeus, T., Rousset, F. (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**, 1933-1940.
- Grant, B.R., Grant, P.R. (1993) Evolution of Darwin's finches caused by rare climatic event. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **251**, 111-117.
- Grant, B.R., Grant, P.R. (1996) High survival of Darwin's finch hybrid: effect of beak morphology and diets. *Ecology* **77**, 500-509.

- Green, C., Hunt, R. (1980) Interpretation of variation in ovarian polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *Anopheles parensis* Gillies and *Anopheles aruni*? *Genetica* **51**, 87-195.
- Green, C.A. (1970) Identifications of member species of the *Anopheles gambiae* complex in the Zambesi valley. *Cent Afr J Med* **16**, 207-209.
- Green, C.A. (1971) The practical problem of identifying members of the *Anopheles gambiae* complex in autecological studies. *Parassitologia* **13**, 421-427.
- Green, C.A. (1972) Cytological maps for the practical identification of females of the three freshwater species of the *Anopheles gambiae* complex. *Ann Trop Med Parasitol* **66**, 143-147.
- Green, C.A. (1981) Malaria epidemiology and anophelines cytogenetics. In: *Cytogenetics and genetics of vectors*, Pal R., Kitzmiller J.B. & Kanda T., pp. 1-29.
- Green, C.A. (1982) Cladistic analysis of mosquito chromosome data (*Anopheles* (*Cellia*) *Myzomyia*). *J Hered* **73**, 2-11.
- Greenwood, B., Mutabingwa, T. (2002) Malaria in 2002. *Nature* **415**, 670-672.
- Greenwood, B.M. (1997) What's new in malaria control? *Ann Trop Med Parasitol* **91**, 523-531.
- Grimaldi, M.C., Crouau-Roy, B. (1997) Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences. *J Mol Evol* **44**, 336-340.
- Grossman, G.L., Rafferty, C.S., Clayton, J.R., Stevens, T.K., Mukabayire, O., Benedict, M.Q. (2001) Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Mol Biol* **10**, 597-604.
- Guelbeogo, W., Boccolini, D., Besansky, N.J., Sagnon, N.F., Costantini, C. (2002) Temporal variability in chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* from two villages near Ouagadougou, Burkina Faso (West Africa). *Parassitologia* **44**, 86.
- Guerin, G., Ollivier, L., Sellier, P. (1979) The "hitch-hiking" effect of a selected gene and gamete combination (linkage disequilibrium): the example of 2 closely linked loci in the swine, Hal (halothane sensitivity) and PHI (phosphohexose isomerase). *C R Seances Acad Sci D* **289**, 153-156.
- Gwadz, R. (1996) Anopheline mosquitoes and the agents they transmit. In: *The biology of Disease Vectors* (ed. Colorado UPO).
- Habluetzel, A., Diallo, D.A., Esposito, F., et al. (1997) Do insecticide-treated curtains reduce all-cause child mortality in Burkina Faso? *Trop Med Int Health* **2**, 855-862.

- Hackett, B.J., Gimnig, J., Guelbeogo, W., *et al.* (2000) Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol* **9**, 369-374.
- Haddow, A.J., Davies, C.W., Walker, A.J. (1960) O'nyong-nyong fever; an epidemic virus disease in East Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **54**, 517.
- Hamon, J. (1963) Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo Dioulasso (République de Haute-Volta). Cycles d'agressivité et variations saisonnières. *An Soc Entomol Fr* **132**, 85.
- Hamon, J., Adam, J., Grjebine, A. (1956) Observations sur la répartition et le comportement des anophèles de l'Afrique équatoriale française, du Cameroun et de l'Afrique occidentale. *Bull OMS* **15**, 549-591.
- Hancock, J.M. (1999) Microsatellites and others simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites, Evolution and Applications*. (eds. Goldstein DB, Schlötterer C), Oxford University Press, New York.
- Handler, A.M. (2002) Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1211-1220.
- 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.
- Hargreaves, K., Koekemoer, L.L., Brooke, B.D., Hunt, R.H., Mthembu, J., Coetzee, M. (2000) *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* **14**, 181-189.
- Harrison, B.A. (1980) The *Myzomyia* Series of the *Anopheles* (*Cellia*) in Thailand, with emphasis on intra-interspecific variations (Diptera: Culicidae). In: *Contributions of the American Entomological Institut (Ann Arbor)*.
- Hartl, D.L. (1994) *Génétique des populations*. Flammarion, Paris.
- Hartl, D.L., Volkman, S.K., Nielsen, K.M., *et al.* (2002) The paradoxical population genetics of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **18**, 266-272.
- Hay, S.I., Cox, J., Rogers, D.J., *et al.* (2002a) Climate change and the resurgence of malaria in the East African highlands. *Nature* **415**, 905-909.
- Hay, S.I., Rogers, D.J., Randolph, S.E., *et al.* (2002b) Hot topic or hot air? Climate change and malaria resurgence in East African highlands. *Trends Parasitol* **18**, 530-534.

- Hervy, J.P., le Goff, G., Geoffroy, B., Herve, J.P., Manga, L., Brunhes, J. (1998) *Logiciel d'identification et d'enseignement "Les anophèles de la région afro-tropicale"*. ORSTOM, Paris.
- Hill, W.C., Robertson, A. (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genetics* **38**, 226-231.
- Hogg, J.C., Hurd, H. (1995a) Malaria-induced reduction of fecundity during the first gonotrophic cycle of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Med Vet Entomol* **9**, 176-180.
- Hogg, J.C., Hurd, H. (1995b) *Plasmodium yoelii nigeriensis*: the effect of high and low intensity of infection upon the egg production and bloodmeal size of *Anopheles stephensi* during three gonotrophic cycles. *Parasitology* **111** (Pt 5), 555-562.
- Hogg, J.C., Hurd, H. (1997) The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae s. l.* in north east Tanzania. *Parasitology* **114** (Pt 4), 325-331.
- Holm, S. (1979) A simple sequential rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* **6**, 65-70.
- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129-149.
- Hopwood, J.A., Ahmed, A.M., Polwart, A., Williams, G.T., Hurd, H. (2001) Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. *J Exp Biol* **204**, 2773-2780.
- Hougard, J.M., Fontenille, D., Chandre, F., Darriet, F., Carnevale, P., Guillet, P. (2002) Combating malaria vectors in Africa: current directions of research. *Trends Parasitol* **18**, 283-286.
- Hugues, L.A., Verra, F. (2002) Extensive polymorphism and ancient origin of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **18**, 348-351.
- Hume, J.C., Lyons, E.J., Day, K.P. (2003) Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **19**, 144-149.
- Hunt, R.H. (1973) A cytological technique for the study of *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* **15**, 137-139.
- Hurst, G.D., Hurst, L.D., Majerus, M.E. (1992) Evolutionary genetics. Selfish genes move sideways. *Nature* **356**, 659-660.
- Huxley, J. (1942) *Evolution, the modern synthesis*. Allen and Unwin, London.

- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L.A., Wimmer, E.A., Jacobs-Lorena, M. (2002) Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* **417**, 452-455.
- Jahan, N., Hurd, H. (1998) Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Haemosporidia: Plasmodiidae) on *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) vitellogenesis. *J Med Entomol* **35**, 956-961.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *T.R.E.E.* **11**, 424-429.
- Jepson, W.F., Moutia, A., Courtois, C. (1947) The malaria problem in Mauritius: the bionomics of Mauritian anophelines. *Bull World Health Organ* **38**, 177.
- Jin, L., Chakraborty, R. (1995) Population structure, stepwise mutations, heterozygote deficiency and their implications in DNA forensics. *Heredity* **74** (Pt 3), 274-285.
- Joy, D.A., Feng, X., Mu, J., *et al.* (2003) Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science* **300**, 318-321.
- Jurka, J., Pethiyagoda, C. (1995) Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *J Mol Evol* **40**, 120-126.
- Kamau, L., Hawley, W.A., Lehmann, T., *et al.* (1998b) Use of short tandem repeats for the analysis of genetic variability in sympatric populations of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Heredity* **80**, 675-682.
- Kamau, L., Hunt, R., Coetzee, M. (2002) Analysis of the population structure of *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from western and coastal Kenya using paracentric chromosomal inversion frequencies. *J Med Entomol* **39**, 78-83.
- Kamau, L., Koekemoer, L.L., Hunt, R., Coetzee, M. (2003a) *Anopheles parensis*: the main member of the *Anopheles funestus* group found resting inside human dwelling in mwea area of central Kenya toward the end of the rainy season. *J Am Mosq Control Assoc* **19**, 130-133.
- Kamau, L., Lehmann, T., Hawley, W.A., Orago, A.S., Collins, F.H. (1998a) Microgeographic genetic differentiation of *Anopheles gambiae* mosquitoes from Asembo Bay, western Kenya: a comparison with Kilifi in coastal Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **58**, 64-69.
- Kamau, L., Mukabana, W.R., Hawley, W.A., *et al.* (1999) Analysis of genetic variability in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* using microsatellite loci. *Insect Mol Biol* **8**, 287-297.

- Kamau, L., Munyekenye, G.O., Koekemoer, L.L., Hunt, R.H., Coetzee, M. (2003b) A survey of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group from 10 sites in Kenya with special emphasis on population genetic structure based on chromosomal inversion karyotypes. *J Med Entomol* **40**, 664-671.
- Kartman, L., Newcomb, E.H., Campau, E.J., Morrison, F.D. (1947) Mosquitoes collected in Dakar, French West Africa, incidental to army malaria surveys. *Mosq News* **7**, 110.
- Kengne, P., Awono-Ambene, P., Nkondjio, C.A., Simard, F., Fontenille, D. (2003) Molecular identification of the *Anopheles nili* group of African malaria vectors. *Med Vet Entomol* **17**, 67-74.
- Kidwell, M.G., Ribeiro, J.M.C. (1992) Can transposable element be used to drive disease refractoriness genes into vector populations? *Parasitol Today* **8**, 325.
- Kimura, M. (1953) "Stepping stone" model of populations. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan* **3**, 62-63.
- Kimura, M. (1956) A model of genetic system which leads to closer linkage by natural selection. *Evolution* **10**, 278-287.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Kimura, M., Crow, J.F. (1964) The number of alleles that can maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-738.
- Kimura, M., Ohta, T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2868-2872.
- Knight, K.L., Stone, A. (1977) *A catalog of the mosquitoes of the world*. The Thomas Say Foundation.
- Koekemoer, L.L., Coetzee, M., Hunt, R.H. (1998) HpaII endonuclease distinguishes between two species in the *Anopheles funestus* group. *Insect Mol Biol* **7**, 273-277.
- Koekemoer, L.L., Kamau, L., Hunt, R.H., 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**, 804-811.
- Koekemoer, L.L., Lochouarn, L., Hunt, R.H., Coetzee, M. (1999) Single-strand conformation polymorphism analysis for identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *J Med Entomol* **36**, 125-130.
- Koella, J.C. (2002) Stage-specific manipulation of a mosquito's host seeking behavior by malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behav Ecol Sociobiol*.

- Kovats, R.S., Haines, A., Stanwell-Smith, R., Martens, P., Menne, B., Bertollini, R. (1999) Climate change and human health in Europe. *Bmj* **318**, 1682-1685.
- Kraaijeveld, A.R., Godfray, H.C. (1997) Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **389**, 278-280.
- Krafsur, E.S. (1998) Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect populations: 55 years and counting. *J Agric Entomol* **15**, 303-317.
- Krafsur, E.S., Garrett-Jones, C. (1977) The survival in nature of *Wuchereria*-infected *Anopheles funestus* Giles in North-eastern Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **71**, 155-160.
- Krzywinski, J., Besansky, N.J. (2003) Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annu Rev Entomol* **48**, 111-139.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. (2001) MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
- Lande, R. (1979) Effective deme sizes during long-term evolution estimated of chromosomal rearrangement. *Evolution* **33**, 234-251.
- Lanzaro, G.C., Toure, Y.T., Carnahan, J., *et al.* (1998) Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14260-14265.
- Lanzaro, G.C., Zheng, L., Toure, Y.T., Traore, S.F., Kafatos, F.C., Vernick, K.D. (1995) Microsatellite DNA and isozyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **4**, 105-112.
- Le Goff, G., Toto, J.C., Nzeyimana, I., Gouagna, L.C., Robert, V. (1993) Les moustiques et la transmission du paludisme dans un village traditionnel du bloc forestier sud-Cameroun. *Bull liais doc OCEAC* **26**.
- Leeson, H. (1935) Another anopheline of the *funestus* series from Southern Rhodesia. *Ann Trop Med Parasit* **29**.
- Lehmann, T., Hawley, W.A., Collins, F.H. (1996) An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics* **144**, 1155-1163.
- Lehmann, T., Hawley, W.A., Grebert, H., Collins, F.H. (1998) The effective population size of *Anopheles gambiae* in Kenya: implications for population structure. *Mol Biol Evol* **15**, 264-276.
- Lehmann, T., Licht, M., Elissa, N., *et al.* (2003) Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *J Hered* **94**, 133-147.

- Levins, R. (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull Entomol Soc Am* **15**, 237-240.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987a) High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **15**, 5323-5338.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987b) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* **4**, 203-221.
- Lewontin, R.C., Kojima, K. (1960) The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* **14**, 458-472.
- Lochouarn, L., Dia, I., Boccolini, D., Coluzzi, M., Fontenille, D. (1998) Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**, 607-612.
- Logan, J.A. (1953) *The sardinian project: an experiment in the eradication of an indigenous Malarious vector*. The John Hopkins press, Baltimore.
- Lounibos, L.P., Wilkerson, R.C., Conn, J.E., Hribar, L.J., Fritz, G.N., Danoff-Burg, J.A. (1998) Morphological, molecular, and chromosomal discrimination of cryptic *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae) from South America. *J Med Entomol* **35**, 830-838.
- Manga, L., Bouchite, B., Toto, J.C., Froment, A. (1997a) *Anopheles* species and the transmission of malaria in the forest/savannah transition zone in central Cameroon. *Bull Soc Path Ex* **90**, 128-130.
- Manga, L., Toto, J.C., Carnevale, P. (1995) Malaria vectors and transmission in an area deforested for a new international airport in southern Cameroon. *Ann Soc Bel Med Trop* **75**, 43-49.
- Manga, L., Toto, J.C., Le Goff, G., Brunhes, J. (1997b) The bionomics of *Anopheles funestus* and its role in malaria transmission in a forested area of southern Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**, 387-388.
- Maxwell, C.A., Msuya, E., Sudi, M., Njunwa, K.J., Carneiro, I.A., Curtis, C.F. (2002) Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania. *Trop Med Int Health* **7**, 1003-1008.
- Mayr, E. (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. (1963) *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge.

- Mbogo, C.N., Kabiru, E.W., Muiruri, S.K., *et al.* (1993) Bloodfeeding behavior of *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus* in Kilifi District, Kenya. *J Am Mosq Control Assoc* **9**, 225-227.
- McKean, K.A., Nunney, L. (2001) Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7904-7909.
- Mendis, C., Jacobsen, J.L., Gamage-Mendis, A., *et al.* (2000) *Anopheles arabiensis* and *An. funestus* are equally important vectors of malaria in Matola coastal suburb of Maputo, southern Mozambique. *Med Vet Entomol* **14**, 171-180.
- Meunier, J.Y., Safeukui, I., Fontenille, D., Boudin, C. (1999) Malaria transmission in an area of future vaccination in equatorial forest of south Cameroon. *Bull Soc Path Ex* **92**, 309-312.
- Molineaux, L., Gramiccia, G. (1980) The Garki Project. Research on Epidemiology and Control of Malaria in the Sudan Savannah of West Africa. *World Health Org.*
- Morel, C.M. (2001) Present and future control of malaria. *Science* **291**, 435-436.
- Moret, Y., Schmid-Hempel, P. (2000) Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**, 1166-1168.
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., *et al.* (1993) Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers santé* **3** (4), 220-238.
- Mouchet, J., Gariou, J. (1961) Répartition géographique et écologique des anophèles au Cameroun. *Bull Soc Path Ex* **54**, 102-108.
- Mukabayire, O., Boccolini, D., Lochouarn, L., Fontenille, D., Besansky, N.J. (1999) Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol* **8**, 289-297.
- Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T., Ben-Sasson, S.A. (1996) Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6470-6475.
- Nagel, L.M., Schluter, D. (1998) Body size, natural selection, and speciation in sticklebacks. *Evolution* **52**, 209-218.
- Nanda, I., Deubelbeiss, C., Guttenbach, M., Epplen, J.T., Schmid, M. (1990) Heterogeneities in the distribution of (GACA)_n simple repeats in the karyotypes of primates and mouse. *Hum Genet* **85**, 187-194.
- Nauta, M.J., Weissing, F.J. (1996) Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics* **143**, 1021-1032.

- Navarro, A., Betran, E., Barbadilla, A., Ruiz, A. (1997) Recombination and gene flux caused by gene conversion and crossing over in inversion heterokaryotypes. *Genetics* **146**, 695-709.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press, New York.
- Nei, M., Li, W. (1973) Linkage Disequilibrium in subdivided populations. *Genetics* **75**, 213-219.
- Nevill, C.G., Some, E.S., Mung'ala, V.O., *et al.* (1996) Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health* **1**, 139-146.
- Njan Nloga, A., Robert, V., Toto, J.C., Carnevale, P. (1993) *Anopheles moucheti*, vecteur principal du paludisme au sud-Cameroun. *Bull liais doc OCEAC* **26**.
- Oduol, F., Xu, J., Niare, O., Natarajan, R., Vernick, K.D. (2000) Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11397-11402.
- Ohta, T., Kimura, M. (1969) Linkage disequilibrium due to random genetic drift. *Genet Res* **13**, 47-55.
- Olivry (1986) *Fleuves et rivières du Cameroun* Edition de l'ORSTOM, Bondy.
- Onyabe, D.Y., Conn, J.E. (2001) Genetic differentiation of the malaria vector *Anopheles gambiae* across Nigeria suggests that selection limits gene flow. *Heredity* **87**, 647-658.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2766-2770.
- Pape, T. (1992) Cladistic analyses of mosquito chromosome data in *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* **24**, 1-11.
- Paskewitz, S.M., Wesson, D.M., Collins, F.H. (1993) The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Mol Biol* **2**, 247-257.
- Patz, J.A., Hulme, M., Rosenzweig, C., *et al.* (2002) Climate change: Regional warming and malaria resurgence. *Nature* **420**, 627-628.
- Persiani, A., Di Deco, M.A., Petrangeli, G. (1984) Osservazioni di laboratorio su polimorfismi da inversioni originati da incroci tra popolazioni diversi di *Anopheles gambiae* s.s..

- Petrarca, V., Nugud, A.D., Elkarim, A., Haridi, A.M., Di Deco, M.A., Coluzzi, M. (2000) Cytogenetics of the *Anopheles gambiae* complex in Sudan, with special reference to *An. arabiensis*: relationship with East and West African populations. *Med Vet Entomol* **14**, 149-164.
- Petrarca, V., Petrangeli, G., Rossi, P., Sabatinelli, G. (1986) Etude chromosomique d'*Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* à Ouagadougou, Burkina Faso, et dans quelques villages voisins. *Parassitologia* **28**, 41-61.
- Petrarca, V., Vercruyse, J., Coluzzi, M. (1987) Observation on the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal River Bassin, West Africa. *Med Vet Entomol* **1**, 303-312.
- Porter, C.H., Collins, F.H. (1991) Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera:Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* **45**, 271-279.
- Price, M.V., Waser, N.M. (1979) Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. *Nature* **277**, 294-297.
- Proft, J., Maier, W.A., Kampen, H. (1999) Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol Res* **85**, 837-843.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., Hugues, C.R. (1993) Microsatellites and kinship. *T.R.E.E.* **8**, 285-288.
- Ratcliffe, L.M., Grant, P.R. (1983) Species recognition in Darwin's finches (*Geospiza*, Gould). I. Discrimination by morphological cues. *Animal Behaviour* **31**, 1139-1153.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995) GENEPOP Version 1.2. A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **26**, 248-249.
- Reid, J.A. (1968) *Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo.*, Kuala Lumpur.
- Reid, J.A., Knight, K.L. (1961) Classification within the subgenus *Anopheles* (Diptera, Culicidae). *An Trop Med Parasitol* **55**, 474-488.
- Reiseberg, L.H. (2001) Chromosomal rearrangement and speciation. *T.R.E.E.* **16**, 351-358.
- Ribeiro, J.M., Kidwell, M.G. (1994) Transposable elements as population drive mechanisms: specification of critical parameter values. *J Med Entomol* **31**, 10-16.
- Rice, W.R., Hostert, E.E. (1993) Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* **47**, 1637-1653.
- Rich, S.M., Ferreira, M.U., Ayala, F.L. (2000) The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* **16**, 390-396.

- Rich, S.M., Licht, M.C., Hudson, R.R., Ayala, F.J. (1998) Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4425-4430.
- Robert, V., Petrarca, V., Carnevale, P., Ovazza, L., Coluzzi, M. (1989) Analyse cytogénétique du complexe *Anopheles gambiae* dans la région de Bobo Dioulasso (Burkina Faso). *Ann Parasitol Hum Com* **64**, 290-311.
- Robert, V., van den Broek, A., Stevens, P., *et al.* (1992) Mosquitoes and malaria transmission in irrigated rice-fields in the Benoue valley of northern Cameroon. *Acta Tropica* **52**, 201-204.
- Robertson, H.M. (1993) The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature* **362**, 241-245.
- Rodhain, F., Perez, C. (1985) *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire* Maloine, Paris.
- Rogers, D.J., Randolph, S.E. (2000) The global spread of malaria in a future, warmer world. *Science* **289**, 1763-1766.
- Rongnoparut, P., Yaicharoen, S., Sirichotpakorn, N., Rattanarithikul, R., Lanzaro, G.C., Linthicum, K.J. (1996) Microsatellite polymorphism in *Anopheles maculatus*, a malaria vector in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **55**, 589-594.
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F-statistics* under isolation by distance. *Genetics* **145**.
- Schellenberg, J.R., Abdulla, S., Nathan, R., *et al.* (2001) Effect of large-scale social marketing of insecticide-treated nets on child survival in rural Tanzania. *Lancet* **357**, 1241-1247.
- Schluter, D. (1998) Ecological causes of speciation. In: *Endless forms, species and speciation* (eds. Howard DJ, Berlocher SH), Oxford University Press, Oxford, pp. 114-129.
- Schluter, D., Price, T. (1993) Honesty, perception and population divergence in sexually selected traits. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **253**, 117-122.
- Schug, M.D., Mackay, T.F., Aquadro, C.F. (1997) Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **15**, 99-102.
- Schug, M.D., Wetterstrand, K.A., Gaudette, M.S., Lim, R.H., Hutter, C.M., Aquadro, C.F. (1998) The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* **7**, 57-70.
- Schwartz, A., Koella, J.C. (2002) Melanization of *Plasmodium falciparum* and C-25 sephadex beads by field-caught *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from southern Tanzania. *J Med Entomol* **39**, 84-88.

- Scott, J.A., Brogdon, W.G., Collins, F.H. (1993) Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **49**, 520-529.
- Scott, T.W., Takken, W., Knols, B.G., Boëte, C. (2002) The ecology of genetically modified mosquitoes. *Science* **298**, 117-119.
- Searle, J.B. (1993) Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In: *Hybrid zones and the evolutionnary process*. (ed. Harrison RG), Oxford University Press, Oxford, pp. 309-352.
- Searle, J.B. (1998) Speciation, chromosomes, and genomes. *Genome Res* **8**, 1-3.
- Service, M. (1960) A new species and variety of *Anopheles* from Nigeria, with notes on *Anopheles flavicosta* Edwards and *Aedes Wendyae* Service. *Proc R Ent Soc lond* **29**, 85-90.
- Severini, C., Fontenille, D., Ramiakajato, M.R. (1990a) The importance of *Anopheles funestus* in the transmission of malaria in the hamlet of Mahitsy, in Tananarive, Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* **83**, 114-116.
- Severini, C., Fontenille, D., Ramiakajato, M.R. (1990b) Preliminary study on malaria transmission at the end of the rainy season in Mahitsy near Tananarive. *Arch Inst Pasteur Madagascar* **57**, 323-333.
- Sharakhov, I.V., Braginets, O., Grushko, O.G., *et al.* (2003) A microsatellite physical map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. *J Hered*, In press.
- Sharakhov, I.V., Braginets, O., Mbogo, C.N., Guiyun, Y. (2001b) Isolation and characterization of trinucleotide microsatellites in African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Mol Ecol Notes* **1**, 289-292.
- Sharakhov, I.V., Serazin, A.C., Grushko, O.G., *et al.* (2002) Inversions and gene order shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Science* **298**, 182-185.
- Sharakhov, I.V., Sharakhova, M.V., Mbogo, C.M., Koekemoer, L.L., Yan, G. (2001a) Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics* **159**, 211-218.
- Sharpe, R.G., Hims, M.M., Harbach, R.E., 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**, 265-273.
- Shields, W.M. (1982) *Philopatry, inbreeding and the evolution of sex*. State University of New York Press, New York.

- Shililu, J.I., Maier, W.A., Seitz, H.M., Orago, A.S. (1998) Seasonal density, sporozoite rates and entomological inoculation rates of *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in a high-altitude sugarcane growing zone in Western Kenya. *Trop Med Int Health* **3**, 706-710.
- Simpson, G.G. (1953) *The major features of evolution*. Columbia University Press, New York.
- Sinkins, S.P., Hackett, B.J., Costantini, C., *et al.* (2000) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology* **9**, 490-492.
- Slatkin, M. (1985) Rare alleles as indicator of gene flow. *Evolution* **39**, 53-65.
- Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**, 457-462.
- Slatkin, M., Barton, N.H. (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* **43**, 1349-1368.
- Smith, A. (1955) The transmission of bancroftian filariasis on Ukara Island, Tanganyika. I. A geographical and ecological description of the island with an annotated list of mosquitoes and other arthropods of medical importance. *Bull Entomol Res* **46**, 495.
- Smith, G.P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191**, 528-535.
- Snow, R.W., Marsh, K. (1995) Will reducing *Plasmodium falciparum* transmission alter malaria mortality among African children. *Parasitol Today* **11**, 188-190.
- Soper, F.L. (1945) Paris green in the eradication of *Anopheles gambiae*: Brazil 1940, Egypt, 1945. *Mosq news* **26**, 470-476.
- Spirito, F. (1998) The role of chromosomal change in speciation. In: *Endless forms, species and speciation* (eds. Howard DJ, Berlocher SH), Oxford University Press, Oxford, pp. 320-329.
- Sutherland, G.R., Richards, R.I. (1995) Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3636-3641.
- Sved, J.A. (1968) The stability of linked systems of loci with a small population size. *Genetics* **59**, 543-563.
- Taylor, C., Toure, Y.T., Carnahan, J., *et al.* (2001) Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* **157**, 743-750.

- Taylor, C.E., Toure, Y.T., Coluzzi, M., Petrarca, V. (1993) Effective population size and persistence of *Anopheles arabiensis* during the dry season in west Africa. *Med Vet Entomol* **7**, 351-357.
- Temu, E.A., Minjas, J.N., Coetzee, M., Hunt, R.H., Shift, C.J. (1998) The role of four anopheline species (Diptera: Culicidae) in malaria transmission in coastal Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**, 152-158.
- Thomas, D.D., Donnelly, C.A., Wood, R.J., Alphey, L.S. (2000) Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* **287**, 2474-2476.
- Thomson, G. (1977) The effect of a selected locus on linked neutral loci. *Genetics* **85**, 753-788.
- Tishkoff, S.A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N., *et al.* (2001) Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science* **293**, 455-462.
- Toure, Y. (1982) Study of *Anopheles funestus* and *Anopheles gambiae s.l.* susceptibility to insecticides in a rural area of Sudan savanna in Mali. *Cahiers ORSTOM, série Entomologie Médicale et Parasitologie* **20**, 125-131.
- Toure, Y., Petrarca, V., Coluzzi, M. (1984) The *Anopheles gambiae* complex in Mali. *Proc XI Inter Congr Trop Medicine and Malaria, Calgary, Canada*, 157.
- Toure, Y., Petrarca, V., Coluzzi, M. (1987) Patterns of geographical and seasonal distribution of the "Mopti" karyotypes of *Anopheles gambiae* in Mali. *Proc 3rd Inter Conf Malaria and Babesiosis, Annecy, France.*, 172.
- Toure, Y.T., Dolo, G., Petrarca, V., *et al.* (1998a) Mark-release-recapture experiments with *Anopheles gambiae s.l.* in Banambani Village, Mali, to determine population size and structure. *Med Vet Entomol* **12**, 74-83.
- Toure, Y.T., Petrarca, V., Traore, S., *et al.* (1994) Ecological studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* in Mali, West Africa. *Genetica* **94**, 213-223.
- Toure, Y.T., Petrarca, V., Traore, S.F., *et al.* (1998b) The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* **40**, 477-511.
- Trape, J.F., Pison, G., Spiegel, A., Enel, C., Rogier, C. (2002) Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol* **18**, 224-230.
- Trape, J.F., Rogier, R. (1996) Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol today* **12**, 236-240.

- Tripet, F., Toure, Y.T., Dolo, G., Lanzaro, G.C. (2003) Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* females revealed by DNA analysis of transferred sperm. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 1-5.
- Valle, G. (1993) TA-repeat microsatellites are closely associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III. *Yeast* **9**, 753-759.
- Van Bortel, W., Trung, H.D., Roelants, P., Harbach, R.E., Backeljau, T., Coosemans, M. (2000) Molecular identification of *Anopheles minimus s.l.* beyond distinguishing the members of the species complex. *Insect Mol Biol* **9**, 335-340.
- Viard, F., Franck, P., Dubois, M.P., Estoup, A., Jarne, P. (1998) Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *J Mol Evol* **47**, 42-51.
- Volkman, S.K., Barry, A.E., Lyons, E.J., *et al.* (2001) Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science* **293**, 482-484.
- Wang, R., Kafatos, F.C., Zheng, L. (1999) Microsatellite markers and genotyping procedures for *Anopheles gambiae*. *Parasitol today* **15**, 33-37.
- Wang, R., Zheng, L., Toure, Y.T., Dandekar, T., Kafatos, F.C. (2001) When genetic distance matters: measuring genetic differentiation at microsatellite loci in whole-genome scans of recent and incipient mosquito species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10769-10774.
- Wanji, S., Tanke, T., Atanga, S.N., Akjonina, C., Nicholas, T., Fontenille, D. (2003) *Anopheles* species of the mount Cameroon region: biting habits, feeding behaviour and entomological inoculation rates. *Trop Med Int Health* **8**, 643-649.
- Waser, N.M. (1993) Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperm. In: *The natural history of inbreeding and outbreeding* (ed. Thornhill NH), Chicago University Press, Chicago, pp. 173-199.
- Weber, J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**, 524-530.
- Wehrhahn, C.F., Powell, R. (1987) Electrophoretic variation, regional differences, and gene flow in the coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*) of southern British Columbia. *Can J Fish Aquat Sci* **44**, 822-831.
- Weill, M., Chandre, F., Brengues, C., *et al.* (2000) The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae s.s.* through introgression. *Insect Mol Biol* **9**, 451-455.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., *et al.* (2003) Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* **423**, 136-137.

- Weir, B., Cockerham, C. (1984) Estimating *F-statistics* for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wesson, D.M., Porter, C.H., Collins, F.H. (1992) Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol* **1**, 253-269.
- White, M.J.D. (1973) *Animal cytology and Evolution* Cambridge, University Press, Cambridge.
- Wilkes, T.J., Matola, Y.G., Charlwood, J.D. (1996) *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol* **10**, 108-110.
- Wirtz, R.A., Zavala, F., Charoenvit, Y., *et al.* (1987) Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ* **65**, 39-45.
- Wondji, C., Simard, F., 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**, 11-19.
- Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Ann. Eugen* **15**, 323-354.
- Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**, 395-420.
- Xu, J.N., Qu, F.Y. (1997) Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. *Med Vet Entomol* **11**, 134-138.
- Zheng, L., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Collins, F.H., Kafatos, F.C. (1996) An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics* **143**, 941-952.
- Zheng, L., Cornel, A.J., Wang, R., *et al.* (1997) Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science* **276**, 425-428.

Annexes

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNr : Acide Désoxyribo-Nucléique ribosomal
ADNc : Acide Désoxyribo-Nucléique complémentaire
CSP : CircumSporozoïte Protein
DDT : Dichloro Diphényl Trichloroéthane
EIR : Entomological Inoculation Rate
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization
G6PDH : Glucose 6 Phosphate DésHydrogénase
IAM : Infinite Allele Model
IGS : Inter-Genic Spacer
ITS : Internal non-coding Transcribed Spacer
KAM : k Allele Model
KDR : Knock-Down Resistance
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
QTL : Quantitative Trait Loci
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RIDL : Release of Insects carrying a Dominant Lethal
SE : Standard Error
SM1 : Salivary gland and Midgut binding peptide 1
SMM : Stepwise Mutation Model
SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism
SSM : Slipped Strand Mispairing
TPM : Two Phase Model
UCO : Unequal Crossing-Over

Liste des figures

Introduction & Matériel biologique :

Figure 1 : Schéma de la structure de l'ADN ribosomal.

Figure 2 : Schéma d'amplification des fragments PCR diagnostics des espèces du groupe *Funestus*.

Figure 3 : Amplification d'allèles microsatellites.

Figure 4 : Relation entre formes chromosomiques (Bamako, Savanna, Forest, Mopti et Bissau) et formes moléculaires (M et S) d'*An. gambiae*.

Figure 5 : Principales inversions chromosomiques connues chez *An. funestus*.

Figure 6 : Diagramme de l'algorithme employé pour assigner les spécimens d'*An. funestus* aux formes chromosomiques.

Figure 7 : Recombinaisons méiotiques avec inversion paracentrique, dans le cas d'un double (7a) ou simple (7b) crossing-over dans l'inversion.

Figure 8 : Localisation géographique des pays de collecte.

Figure 9 : Caractéristiques géographiques du Cameroun, répartition de la population (9a), relief (9b), climat (9c), pluviométrie (9d) et végétation (9e).

Figure 10 : Sites de capture d'*An. funestus* au Cameroun et hydrographie.

Figure 11 : Précipitations moyennes au Sénégal et localités d'échantillonnage.

Première Partie :

Article 1 :

Figure 1 : Aligment of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences of *An. lesoni*.

Figure 2 : Aligment of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences of *An. rivulorum*.

Figure 3 : Amplified fragments using the species-specific polymerase chain reaction for the identification of members of the *Anopheles funestus* group.

Figure 4 : Amplification of hybrid DNA between members of the *Anopheles funestus* group.

Article 2 :

Figure 1 : Rainfall and indoor human biting rates for malaria vector species in Nkoteng, from February 1999 to October 2000.

Seconde Partie :

Article 4 :

Figure 1 : FISH performed on the chromosome of *An. funestus*.

Figure 2 : Location of microsatellite loci and inversions with respect to the photomap of *An. funestus* polytene chromosomes.

Figure 3 : Microphotographs of polymorphic inversions of *An. funestus* collected from Burkina Faso and Kenya.

Troisième partie :

Article 5 :

Figure 1 : Localities sampled for *An. funestus* across Cameroon and clinal distribution of chromosomal inversions.

Figure 2 : Chromosomal inversions of *An. funestus* in Cameroon, and location of microsatellites loci.

Figure 3 : Correlation between $Fst / (1 - Fst)$ and logarithm of distance (in kilometres) for pairwise comparisons of 10 *An. funestus* populations from Cameroon at the 10 microsatellite loci analysed.

Article 6 :

Figure 1 : Map of Senegal showing the 4 study sites.

Figure 2 : Chromosomal inversions of *An. funestus* in Senegal, and location of microsatellite loci.

Figure 3 : Correlation between $Fst/(1-Fst)$ and logarithm of distance (in km) for pairwise comparisons of 4 *Anopheles funestus* populations from Senegal genotyped at 9 microsatellite loci.

Liste des illustrations :**Introduction & Matériel biologique :**

Illustration 1 : Dessin d'*Anopheles funestus*.

Illustration 2 : Exemples de gîtes larvaires d'*An. funestus* s.s.

Illustration 3 : Répartition géographique des espèces du groupe Funestus.

Illustration 4 : Chromosome 2 d'*An. funestus*.

Illustration 5 : Méthodes de captures d'anophèles utilisées.

Liste des tableaux :

Introduction & Matériel biologique :

Tableau 1 : Génotypes et fréquences associées pour des croisements au hasard dans le cas d'un locus à deux allèles.

Tableau 2 : Association gamétique entre deux allèles de deux loci différents, montrant les fréquences gamétiques attendues quand les allèles sont en équilibre de liaison.

Première Partie :

Article 1 :

Table 1 : Pairwise nucleotide distance between species in the D3 and the internal transcribed spacer 2 regions in *Anopheles* mosquitoes.

Table 2 : Polymerase chain reaction primers and sizes of the amplified products for species diagnostic within the *Anopheles funestus* group.

Article 2 :

Table 1: Number of Anophelines collected from February 1999 to October 2000 in Nkoteng village by three methods.

Table 2 : Monthly circumsporozoïte protein rate and entomological inoculation rate for *An. funestus* and *An. gambiae* in Nkoteng from February 1999 to October 2000.

Seconde partie :

Article 3 :

Table 1 : Characteristics of 14 microsatellite loci of *Anopheles funestus*.

Article 4 :

Table 1 : Chromosomal locations of the reference set of *An. funestus* microsatellite loci.

Troisième Partie :

Article 5 :

Table 1 : Karyotypes and inversions frequencies of *An. funestus*.

Table 2 : Pairwise linkage disequilibrium for 10 microsatellite loci and four chromosomal inversions for pooled *An. funestus* populations.

Table 3 : Genetic variability and significance level for goodness of fit tests to Hardy-Weinberg equilibrium within *Anopheles funestus* populations from 10 localities in Cameroon.

Table 4 : Measure of genetic differentiation (F_{st}) and geographical distance between *An. funestus* populations from Cameroon.

Article 6 :

Table 1 : Genetic variability and significance level for goodness of fit tests to Hardy-Weinberg equilibrium within *Anopheles funestus* populations from 4 localities in Senegal.

Table 2 : Genetic differentiation (F_{st}) between *Anopheles funestus* populations from Senegal.

Table 3 : Chromosomal arrangements and inversions frequencies (f) in 42 *Anopheles funestus* individuals from Kouvar, analysed both for chromosomal inversions and microsatellite genotypes.

Biologie et génétique des populations d'*Anopheles funestus*, vecteur du paludisme en Afrique.

Résumé : *Anopheles funestus* est un des principaux vecteurs du paludisme en Afrique sub-saharienne. Il appartient à un groupe d'espèces très proches morphologiquement. Afin de bien cibler la lutte antivectorielle, une identification simple et rapide des espèces est nécessaire. Une étude au Cameroun, a permis de caractériser une nouvelle espèce du groupe *Funestus*, temporairement nommée *Anopheles rivulorum*-like et une PCR spécifique d'espèces a été développée permettant l'identification des principales espèces du groupe. *An. funestus* a été largement négligé par rapport aux vecteurs membres du complexe *Anopheles gambiae*, cependant il peut avoir localement une importance majeure en termes de transmission. Nous montrons ici qu'il est le vecteur principal et assure un haut niveau de transmission du paludisme tout au long de l'année dans une localité d'importance agricole de la zone de transition savanne-forêt du Cameroun.

Des données de cytogénétiques basées sur la distribution d'inversions chromosomiques paracentriques au Burkina Faso et au Sénégal ont révélé un haut niveau de structuration au sein des populations d'*An. funestus* et ont permis de caractériser deux formes chromosomiques « Folonzo » et « Kiribina » qui pourraient être en cours de spéciation. Nous avons entrepris une étude à l'aide des marqueurs cytogénétiques et de marqueurs microsatellites afin d'appréhender la structure génétique de ces formes chromosomiques. Nos résultats montrent un flux de gènes entre les formes chromosomiques et favorisent l'hypothèse que la pression de sélection environnementale exercée sur les inversions chromosomiques serait le principal facteur influant sur leur distribution dans les populations sauvages d'*An. funestus*.

Mots clés : *Anopheles funestus*, paludisme, identification moléculaire, structure des populations, microsatellites, inversions chromosomiques, Cameroun, Sénégal.

Bionomics and population genetics of *Anopheles funestus*, a malaria vector in Africa.

Abstract : *Anopheles funestus* is one of the most important human malaria vectors in sub-Saharan Africa. It belongs to a group of species morphologically very similar and for suitable vector control measures, the rapid and simple identification of species is required. An investigation in Cameroon led to characterize a new member of the *Funestus* group, temporarily named *An. rivulorum*-like. A species-specific PCR assay was developed allowing the identification of the principal species of the group. *An. funestus* was largely neglected compared to the vector members of the *An. gambiae* complex, however it can locally have a major importance in term of transmission. We showed here that it is the main vector and it ensures a high level of malaria transmission throughout the year in a locality of agricultural importance in a zone of savannah-forest transition in Cameroon.

Data of cytogenetics based on the distribution of paracentric chromosomal inversions in Burkina Faso and Senegal revealed a high level of structuring within the *An. funestus* populations and led characterizing two chromosomal forms, "Folonzo" and "Kiribina", which could be incipient species. We undertook a study using the cytogenetic markers and microsatellite markers in order to shed light on the genetic structure of the chromosomal forms. Our results showed a gene flow between chromosomal forms and this favours the hypothesis that differential environmental selection pressure acting on inversions should be considered a major factor in shaping their distribution in wild *An. funestus* populations.

Keywords : *Anopheles funestus*, malaria, molecular identification, population structure, microsatellites, chromosomal inversions, Cameroon, Senegal.

Discipline : Biologie des organismes

Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), IRD, 911 av. Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 05.
