

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par **UNIVERSITÉ MONTPELLIER I**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences chimiques  
et biologiques pour la santé  
Et de l'unité de recherche UMR – MD3

Spécialité : **Biologie santé**

Présentée par **Chung Thuy NGO**

**CAPACITÉ VECTORIELLE DES POPULATIONS  
D'ANOPHELES DANS LA CO-TRANSMISSION DE  
PLASMODIUM ET WUCHERERIA BANCROFTI ET  
BIODIVERSITÉ BACTÉRIENNE DE L'ESTOMAC  
DES MOUSTIQUES DU CENTRE-SUD VIETNAM**

Soutenue le 10 Janvier 2014 devant le jury composé de

M. Marc COSEMANS, Professeur, Institut de Médecine Tropicale Rapporteur d'Anvers (ITMA), Anvers, Belgique	
Mme. Estelle JUMAS-BLAK, Professeur des Universités, Université Examineur Montpellier I, France	
Mme. Sylvie MANGUIN, Directeur de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France	Directeur de thèse
M. Johan MICHAUX, Maître de Recherches FNRS, Université de Liège, Belgique	Rapporteur
M. Daniel PARZY, Professeur des Universités, Université Aix- Marseille, France	Président du jury
Mme. Véronique SINOÛ, Maître de Recherches, Université Aix- Marseille, France	Examineur

# UNIVERSITÉ MONTPELLIER I

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER I**

Discipline: Biologie Santé

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Par

**NGO Chung Thuy**

Capacité vectorielle des populations d'*Anopheles* dans la co-transmission de *Plasmodium* et *Wuchereria bancrofti* et biodiversité bactérienne de l'estomac des moustiques du centre-sud Vietnam

Soutenue le 10 Janvier 2014

**Directeur de thèse**  
**Dr. MANGUIN Sylvie**

### **MEMBRES DU JURY :**

#### **Rapporteurs :**

COOSEMANS MARC, Professeur, Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (IMTA), Anvers, Belgique

MICHAUX JOHAN, Maître de Recherches FNRS, Université de Liège, Belgique

#### **Examineurs :**

MANGUIN SYLVIE, Directeur de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

JUMAS-BILAK ESTELLE, Professeur des Universités, Université Montpellier I, France

PARZY DANIEL, Professeur des Universités, Université Aix-Marseille, France

SINOUE VERONIQUE, Maître de Recherches, Université Aix-Marseille, France

# RÉSUMÉ

Au Vietnam, malgré les succès du gouvernement dans la lutte contre le paludisme, cette maladie persiste en zones forestières, le long des frontières internationales, en particulier avec le Cambodge, et très peu de données sont disponibles sur la filariose lymphatique de Bancroft (FLB). Aucun vaccin n'étant actuellement disponible, la lutte antivectorielle ciblant les *Anopheles*, moustiques qui peuvent être vecteurs d'agents du paludisme et de la FLB, reste un des éléments clés pour mieux contrôler ces deux maladies. Toutefois, une meilleure connaissance des vecteurs présents en zones endémiques et l'étude de leur capacité vectorielle s'imposent compte tenu du manque d'information sur la transmission de ces 2 maladies dans la région centre-sud du Vietnam. La capacité vectorielle étant fortement liée à la flore bactérienne de l'estomac des moustiques, sa biodiversité a été estimée afin de mieux appréhender les familles bactériennes présentes chez les moustiques de terrain, en particulier la présence d'*Enterobacteriaceae* qui peut avoir une influence sur la résistance des anophèles au développement de *Plasmodium*, agent du paludisme. Ce champ d'investigation n'avait encore jamais été étudié chez les vecteurs du paludisme au Vietnam.

Cette thèse comporte sur 2 objectifs principaux : (1) l'évaluation de la capacité vectorielle des espèces d'*Anopheles* dans la co-transmission de *Plasmodium* spp. et de *Wuchereria bancrofti* (agent de la FLB) dans la Province de Dak Nong et de Binh Phuoc du centre-sud Vietnam (à la frontière avec le Cambodge) et (2) l'estimation de la biodiversité de la flore bactérienne de l'estomac de populations d'*Anopheles* du centre-sud Vietnam et l'évaluation de l'influence de certaines bactéries sur la capacité vectorielle des espèces d'*Anopheles*.

L'identification morphologique et moléculaire des spécimens d'*Anopheles* collectés dans les sites d'étude nous a permis d'appréhender et de mieux connaître la faune anophélienne du centre-sud Vietnam avec la présence de 24 taxa, dont des vecteurs primaires et secondaires. Les espèces dominantes sont *Anopheles dirus* (48,2%), *An. maculatus* (19,1%) et *An. minimus* (9,8%), trois vecteurs majeurs du paludisme et de la FLB. Pour la première fois au Vietnam, la présence d'*An. scanloni*, une des 8 espèces du Complexe Dirus et vecteur du paludisme en Thaïlande, a été montrée et confirmée après son identification par techniques moléculaires et séquençage. La relation taxonomique entre *An. crawfordi* et *An. dangi*, une espèce nommée de façon informelle au Vietnam en 1987, est clarifiée grâce à une étude phylogénétique qui nous a permis d'établir qu'*An. dangi* est un variant morphologique d'*An. crawfordi*.

Le taux d'infection parasitaire des anophèles a été analysé grâce à des approches PCR, en temps réel et conventionnelle, afin de déterminer la capacité vectorielle des espèces collectées. Parmi les 765 spécimens d'*Anopheles* étudiés, 2 spécimens dont 1 *An. dirus* et 1 *An. pampanai*, ont été trouvés infectés par *P. vivax*. Les taux d'infection à *P. vivax* sont de 0,26% (2/765) sur l'ensemble de l'échantillon, de 0,41% (2/486) pour la Province de Binh Phuoc et de 0,28% (1/361) chez *An. dirus* et 20% (1/5) chez *An. pampanai*. Aucun anophèle n'a été trouvé infecté dans la Province de Dak Nong, de même qu'aucun spécimen n'était infecté par *P. falciparum*, *P. knowlesi*, ni par *Wuchereria bancrofti*.

La flore bactérienne de l'estomac des anophèles a été analysée après application de 2 méthodes d'identification basées à la fois sur la culture et la PCR du gène 16S sur 200 abdomens d'anophèles de 11 espèces différentes. Les résultats montrent la présence de 116 genres bactériens, dont 18 genres communs, classés taxonomiquement dans 7 phyla dont *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* et *Synergistetes*. Le genre dominant des spécimens de Dak Nong était *Acinetobacter* et celui de Binh Phuoc était *Staphylococcus*. *Acinetobacter* est aussi dominant dans la communauté bactérienne de tous les spécimens d'*Anopheles* étudiés. Le genre *Enterobacter*, qui peut influencer le développement des *Plasmodium* chez les vecteurs, est présent à 1,7% dans le microbiome de nos spécimens comparativement à 39,2% pour le genre prédominant *Acinetobacter* qui était significativement associé à la présence de *Plasmodium vivax* dans nos échantillons d'*Anopheles*.

Les résultats de cette thèse nous permettent de conclure que la faune anophélienne au centre-sud du Vietnam est diverse et complexe et la flore bactérienne de l'estomac des spécimens d'*Anopheles* est particulièrement riche. Cette thèse ouvre des perspectives de recherche intéressantes, en particulier il serait important d'évaluer la capacité vectorielle d'un échantillon d'*Anopheles* plus important afin de mieux appréhender le rôle des vecteurs majeurs et secondaires dans la transmission du paludisme au centre-sud Vietnam. Il serait intéressant aussi d'approfondir l'analyse de la flore bactérienne chez les vecteurs et de la comparer entre spécimens infectés et non-infectés.

**Mots clés :** *Anopheles*, *Plasmodium*, *Wuchereria bancrofti*, flore bactérienne, culture, moléculaire, phylogénétique

# ABSTRACT

In Vietnam, despite the success of the Government in controlling malaria, the disease persists in forest areas along the international borders, especially with Cambodia, and very few data are available on the Bancroftian lymphatic filariasis (BLF). No vaccine is currently available to protect from these two diseases, then vector control of *Anopheles* mosquitoes, that may transmit both malaria and BLF agents, remains one of the key element to control these two diseases. As there is a real lack of information on the transmission of these two diseases in south-central region of Vietnam, it was necessary to apprehend the vectors occurring in endemic areas and to study their vectorial capacity. As bacterial flora in *Anopheles* midgut may have a strong influence on the vectorial capacity of the mosquito, its biodiversity was estimated in order to better understand bacterial families present in mosquitoes from the field, in particular the presence of *Enterobacteriaceae* that can have an influence on the development of *Plasmodium*, malaria agent. This field of investigation of bacteria has never been studied in malaria vectors of Vietnam.

This thesis focuses on two main objectives: (1) to evaluate the vectorial capacity of *Anopheles* species in the co-transmission of *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti* (BLF agent) in the Provinces of Dak Nong and Binh Phuoc in south-central Vietnam (near the border with Cambodia), and (2) to estimate the biodiversity of the bacterial flora in the midgut of *Anopheles* populations of south-central Vietnam and evaluate the influence of certain bacteria on the vectorial capacity of *Anopheles* species.

Morphological and molecular identification of *Anopheles* specimens collected in the study sites allowed us to apprehend and better understand the *Anopheles* fauna in south-central Vietnam composed of 24 taxa, including primary and secondary vectors. The dominant species were *Anopheles dirus* (48.2%), *An. maculatus* (19.1%) and *An. minimus* (9.8%), three major vectors of malaria and BLF. For the first time, *An. scanloni*, one of the 8 species of Dirus Complex and malaria vector in Thailand, was collected in Vietnam and confirmed by molecular and sequencing techniques. The relationship between *An. crawfordi* and *An. dangi*, a species informally named in Vietnam in 1987, was clarified through a phylogenetic study that allows us to establish that *An. dangi* is a morphological variation of *An. crawfordi*.

The parasites infection rate of *Anopheles* was investigated using both real-time PCR and conventional PCR to determine the vectorial capacity of the collected species. Of the 765

*Anopheles* specimens, 2 individuals, such as 1 *An. dirus* and 1 *An. pampanai*, were found infected by *P. vivax*. Then, the infection rates were of 0.26% (2/765) on the total sample, 0.41% (2/486) in Binh Phuoc, 0.28% (1/361) for *An. dirus*, and 20% (1/5) for *An. pampanai*. No *Anopheles* mosquito was found infected either in the Province of Dak Nong, or by *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *Wuchereria bancrofti* on the total sample.

The bacterial flora in *Anopheles* midguts was analyzed using 2 identification methods based on culture and 16S PCR-TTGE processed on 200 abdomens of 11 different *Anopheles* species. The results obtained showed the presence of 116 bacterial genera, including 18 common genera, belonging to 7 phyla such as *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, and *Synergistetes*. The dominant genus in Dak Nong was *Acinetobacter* and *Staphylococcus* in Binh Phuoc. *Acinetobacter* was dominant in the bacterial community of all studied *Anopheles*. The genus *Enterobacter*, which can influence the development of *Plasmodium*, represented a prevalence of 1.7% of the microbiome of our specimens compared to 39.2% for the predominant genus *Acinetobacter*. This latter genus was significantly associated to *Anopheles* infected with *Plasmodium vivax*.

The results of this thesis allow us to conclude that the *Anopheles* fauna in south-central Vietnam is diverse and complex, and the bacterial flora present in the *Anopheles* midguts is particularly rich. This thesis opens up interesting prospects for research, in particular it would be important to evaluate the vectorial capacity of larger samples of *Anopheles*, in order to better understand the role of major and secondary vectors in the transmission of malaria in south-central Vietnam. It would also be interesting to deepen the analysis of the bacterial flora in vectors and to compare infected and non-infected specimens.

**Key words:** *Anopheles*, *Plasmodium*, *Wuchereria bancrofti*, bacterial flora, culture, molecular, phylogenetic

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>7</b>
Figure 1 .....	10
Figure 2 .....	12
<b>PARTIE I: Les espèces d'<i>Anopheles</i> au Vietnam et les vecteurs impliqués dans la co-transmission de <i>Plasmodium</i> spp. et de <i>Wuchereria bancrofti</i> ....</b>	<b>14</b>
<b>I. Généralités .....</b>	<b>15</b>
1. <i>Plasmodium</i> et paludisme au Vietnam.....	15
Figure 3 .....	16
2. <i>Wuchereria bancrofti</i> et filarioses lymphatiques au Vietnam .....	18
Figure 4.....	20
Figure 5.....	20
3. Biodiversité des espèces d' <i>Anopheles</i> au Vietnam.....	22
Tableau 1 .....	25
<b>II. Variations morphologiques chez les espèces d'<i>Anopheles</i> et l'étude moléculaire et phylogénétique au sein du Groupe Hyrcanus .....</b>	<b>27</b>
1. Variations morphologiques des espèces d' <i>Anopheles</i> .....	27
2. Etude moléculaire et phylogénétique au sein du Groupe Hyrcanus.....	28
Article 1.....	29
<b>III. Diversité anophélienne dans les Provinces de Dak Nong et Binh Phuoc et capacité vectorielle des espèces .....</b>	<b>38</b>
Figure 6.....	41
Figure 7.....	42
Article 2.....	43
Figure 8.....	72
<b>PARTIE II: Biodiversité de la flore bactérienne de l'estomac d'<i>Anopheles</i> du centre-sud du Vietnam.....</b>	<b>75</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>76</b>
1. Flore bactérienne chez les espèces d' <i>Anopheles</i> du Vietnam .....	76

2. Rôle des bactéries des <i>Anopheles</i> dans le développement de parasites.....	77
Figure 9.....	79
3. Exploration moléculaire de la flore bactérienne .....	79
<b>II. Biodiversité de la flore bactérienne des espèces d'<i>Anopheles</i> de la Province de Dak Nong par culture et méthode moléculaire .....</b>	<b>81</b>
Article 3.....	82
<b>III. Biodiversité de la flore bactérienne d'espèces d'<i>Anopheles</i> de la Province de Binh Phuoc et lien entre bactéries, espèces d'<i>Anopheles</i> et <i>Plasmodium vivax</i> .....</b>	<b>108</b>
Article 4.....	108
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>130</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>132</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>136</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>137</b>



# **INTRODUCTION GENERALE**

Les moustiques peuvent être des vecteurs efficaces de parasites responsables de maladies à fort impact humain, comme le paludisme et les filarioses lymphatiques (FL). Ces 2 maladies, qui peuvent être transmises par les mêmes vecteurs du genre *Anopheles*, sont co-endémiques dans différentes régions tropicales [1]. Autour de la ceinture intertropicale mondiale, environ 250 et 130 millions de personnes sont respectivement affectées par le paludisme et les FL [2,3]. En Asie du Sud-est, le paludisme et la FL de Bancroft (FLB) sont essentiellement des maladies rurales avec une transmission en zones forestières situées le long des frontières internationales, en particulier le long du Cambodge et du Laos pour le Vietnam, du Myanmar, de la Malaisie et du Cambodge pour la Thaïlande.

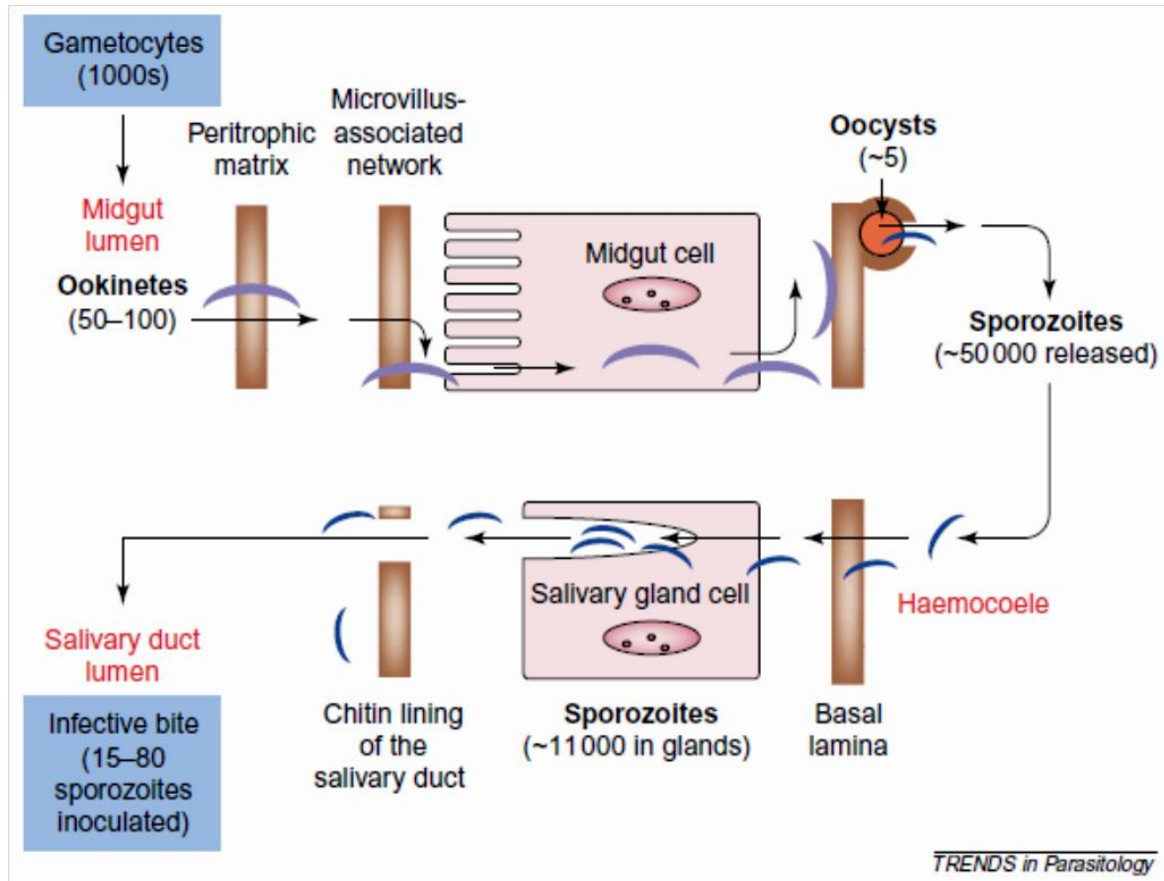
Les pathogènes responsables de ces 2 maladies infectieuses, *Plasmodium* spp. pour le paludisme et *Wuchereria bancrofti* pour la FLB, peuvent être transmis en zone rurale par des *Anopheles* vecteurs, en particulier certaines espèces des Complexes *An. dirus*, *An. minimus* et du Groupe *An. maculatus* [3]. Toutefois, le rôle de chaque espèce dans la transmission de ces parasites est encore mal appréhendé, voire inconnu pour les cas de *W. bancrofti* au Vietnam. En effet, les anophèles vecteurs en Asie du Sud-est appartiennent à des complexes d'espèces indifférenciables morphologiquement, mais dont le rôle dans la transmission de pathogènes peut être diamétralement opposé, allant de vecteurs majeurs à non vecteurs. Certaines espèces jumelles des Complexes Dirus (8 espèces) et Minimus (3 espèces) et du Groupe Maculatus (8 espèces) sont impliquées dans la transmission du paludisme et de la FLB, mais le rôle spécifique de chacune des espèces n'a jamais été étudié par manque de méthodes fiables d'identification des espèces qui ont récemment été développées [4].

Malgré de nombreux progrès dans le contrôle du paludisme et de la FLB, ces deux maladies, et principalement le paludisme, restent un problème majeur de santé publique dans les zones forestière du Sud-est Asiatique [5]. L'objectif de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est d'obtenir une réduction de 75% des cas de paludisme dans le monde d'ici 2015, par rapport aux niveaux de 2000 [6] et la FL est une des 6 maladies infectieuses considérée éradicable d'ici 2020 au travers de l'initiative GPELF (Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis) [7]. La situation générée par ces 2 maladies est d'autant plus préoccupante que *Plasmodium*, en particulier *P. falciparum* a développé des résistances aux médicaments et certaines espèces d'*Anopheles* aux insecticides [5,6,8]. De plus, il est fort à parier que les campagnes d'administration massive de médicaments (albendazole, ivermectin, diethylcarbamazine) contre la FL s'avèrent insuffisantes pour atteindre ce but si les vecteurs ne sont pas plus pris en considération [7]. Des stratégies de lutte antivectorielle intégrée ciblant les vecteurs impliqués dans la co-transmission de parasites du paludisme et de FL

seraient une approche très efficace qui permettrait la réduction simultanée de ces deux maladies [3,7].

Pour être pathogène chez l'homme, *Plasmodium* spp. et *W. bancrofti*, doivent réaliser obligatoirement une partie de leur cycle chez les moustiques vecteurs. Pourtant, les facteurs qui permettent à un agent pathogène de se développer chez un moustique et d'atteindre son stade infectant sont mal connus. Ainsi, sur les 539 espèces de moustiques répertoriées dans le genre *Anopheles* [9], seulement 70-80 sont capables de transmettre des parasites responsables de paludisme et de FL [3]. Dans les interactions vecteurs-parasites, l'estomac du moustique est le premier point de contact des parasites ingérés avec l'épithélium de l'insecte. Sur des dizaines de milliers de gamétocytes pouvant être ingérés lors du repas sanguin du moustique, seulement 50 à 100 ookinètes seront produits et généralement moins de cinq oocystes seront formés sur la paroi stomacale externe [10] (Figure 1). Avec l'immunité locale et la barrière muqueuse, la flore bactérienne joue un rôle qui peut aussi être protecteur pour l'hôte [11]. Des études récentes ont montré qu'un de ces facteurs concerne le rôle primordial joué par la flore bactérienne présente naturellement dans l'estomac du moustique. Les insectes possédant une flore microbienne importante et diverse sont plus résistants aux infections car la flore bactérienne a activé l'immunité basale du moustique comme montré chez *An. gambiae* [12]. En particulier, certaines bactéries telles que les entérobactéries ont un rôle inhibiteur partiel, voire total, de la formation des oocystes [12,13]. Les co-infections chez *Anopheles albimanus*, de la bactérie *Serratia marcescens* et du parasite *Plasmodium vivax*, ont montré un taux de développement d'oocystes de 1%, alors que ceux qui n'avaient pas de bactéries avaient un taux de 71% [14]. Cirimotich et al. [15] ont montré que les radicaux libres oxygénés produits par les bactéries Gram négative ont un effet anti-*Plasmodium* de 99% sur les oocystes et les sporozoïtes. La flore bactérienne, présente dans l'estomac des populations d'*Anopheles*, a donc une forte influence sur la transmission des parasites. Face aux difficultés rencontrées dans lutte contre le paludisme causées par la résistance de moustiques aux insecticides et des parasites aux antipaludiques, il est important d'analyser cette biodiversité bactérienne afin de mieux comprendre les phénomènes de variations des capacités vectorielles observées dans le temps et dans l'espace et d'une espèce d'anophèle à l'autre. Plusieurs études portant sur la caractérisation de la flore bactérienne des *Anopheles* sont actuellement disponibles [16-21], et cette étude représente la première faite sur la flore bactérienne de populations d'*Anopheles* du Vietnam.

**Figure 1** : Cycle du *Plasmodium* dans un *Anopheles* vecteur, indiquant les obstacles à franchir (épithélium cellulaire et matrices extracellulaires) et le nombre de parasites normalement trouvés à chaque stade de développement [10].



Le Vietnam est un pays d'Asie du Sud-est, qui partage ses frontières avec la Chine au nord, le Laos à l'ouest et le Cambodge au sud-ouest, et qui est bordé entièrement par la mer à l'est. Sa superficie est de 332 000 km<sup>2</sup>, dont 75% sont couverts de montagnes (au nord et au centre). La population du Vietnam est de 88,8 Million d'habitants pour lesquels la densité, le niveau de vie et l'éducation des habitants varient énormément selon les régions du pays [22]. Ces différences sont responsables des difficultés rencontrées dans la gestion de la santé publique au Vietnam.

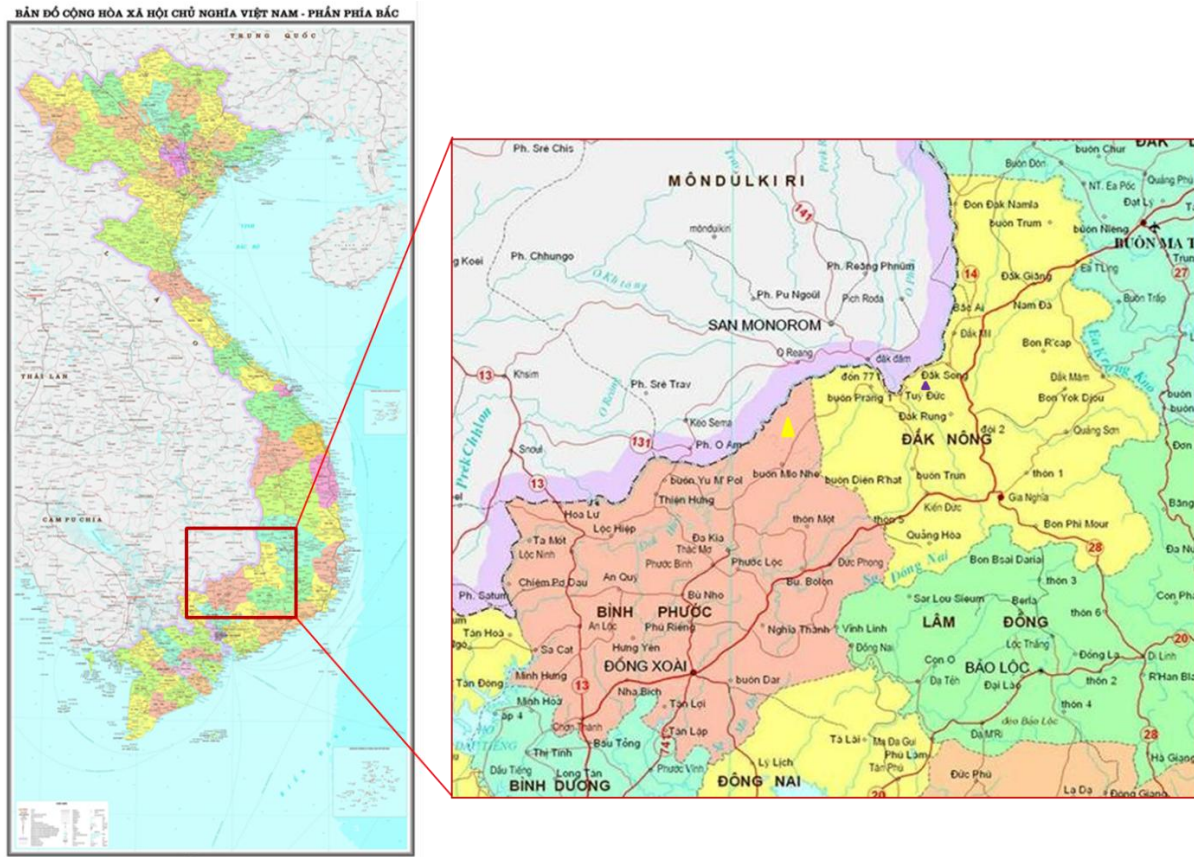
Comme ses pays voisins, le Vietnam se situe dans la zone à risque de paludisme avec des régions endémiques localisées principalement dans la région du centre du pays, le long des frontières avec le Cambodge et le Laos. Récemment, l'épidémie de paludisme la plus grave s'est déroulée en 1991-1992 avec 144 foyers épidémiques dans le pays, plus d'un million de cas et près de 5 000 décès [23]. Malgré le développement des mesures de surveillance et de

contrôle de la maladie et l'amélioration de la situation au nord du pays, le paludisme reste une priorité de santé publique au Vietnam avec 45% des provinces, soit 50% de la population totale, situées dans des zones endémiques. Le pathogène majeur est *Plasmodium falciparum* dont la prévalence au niveau national se situe à 66%, le reste des cas de paludisme est essentiellement dû à *Plasmodium vivax*, même si *Plasmodium malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* circulent aussi [6,24]. Les vecteurs majeurs des agents du paludisme au Vietnam sont les espèces appartenant aux Complexes *Anopheles minimus* et *An. dirus*, présentes dans les zones forestières du pays et *An. epiroticus* du Complexe *An. sundaicus* le long de la zone littorale sud (Delta du Mekong) [25-27].

Depuis l'arrêt de la transmission du paludisme dans le nord du pays, la maladie reste encore à des taux élevés le long des frontières avec le Cambodge et le Laos à cause, en particulier, des mouvements transfrontaliers de populations qui pratiquent le plus souvent des activités professionnelles nocturnes qui les exposent fortement aux piqûres d'anophèles (récolte du latex en forêts d'hévéa, exploitation des mines pour extractions illégales de pierres précieuses, etc.) [28,29]. Le long de ces mêmes frontières sévit aussi la FLB due à *Wuchereria bancrofti*, pour laquelle très peu de données sont disponibles. Ces 2 maladies partagent les mêmes vecteurs en région rurale et peuvent donc être étudiées simultanément et contrôlées conjointement.

Les deux provinces voisines de Dak Nong (11°59'N-107°42'E) et de Binh Phuoc (11°45'N-106°43'E) se trouvent à côté de la frontière avec le Cambodge (Figure 2). Dans cette région, le climat est tropical avec un très fort taux d'humidité, jusqu'à 90% et 94% pendant les mois d'Août et de Septembre 2011 [22], et 2 saisons distinctes : la saison sèche qui s'étend de novembre à avril et la saison des pluies qui s'échelonne de mai à octobre. La superficie de ces provinces est représentée à 49,1% par des forêts dont 95,5% de forêt primaire, les 4,5% restant étant couverts par des plantations comme l'hévéa, le caféier, le tabac, le manioc, la canne à sucre et le chanvre. La densité de population n'y est pas très élevée avec 79 et 132 personnes/km<sup>2</sup> pour Dak Nong et Binh Phuoc respectivement (Statistiques de 2011) [22]. Ces 2 provinces se situent le long de la frontière avec le Cambodge où le paludisme est endémique et la résistance du parasite aux antipaludiques installée [29]. L'information sur les filarioses lymphatiques est quasi-inexistante dans ces provinces. Toutefois, dans la province voisine de Khanh Hoa, une prévalence de 7,2% de microfilaries à *W. bancrofti* a été rapportée en 1998 dans la population des zones côtières et montagneuses [30]. De plus, la migration transfrontalière étant importante, le contrôle de ces maladies est particulièrement difficile à réaliser.

**Figure 2** : Carte du Vietnam avec la localisation des Provinces de Dak Nong et de Binh Phuoc dans le cadre rouge. La commune de Dak Ngo (Province de Dak Nong) et de Bu Gia Map (Province de Binh Phuoc) sont localisées par les triangles violet et jaune, respectivement.



Pour atteindre les objectifs du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) d'éliminer le paludisme à l'horizon 2020, les prérogatives sont de supprimer les zones d'hyperendémie, d'augmenter à 40 le nombre de provinces sans transmission de paludisme local, d'avoir 15 provinces en mode élimination et 8 provinces en phase de pré-élimination [29] et procéder à l'éradication de la FLB. Ces objectifs ne seront atteints que si des informations précises sur ces 2 maladies et leurs vecteurs sont obtenues pour la mise en place d'un programme simultané et efficace de prévention et de lutte contre le paludisme et la FLB au Vietnam. De plus, l'étude de la biodiversité de la flore bactérienne de l'estomac des *Anopheles* provenant de zones endémiques du centre-sud Vietnam et leur possible implication dans la transmission des agents pathogènes pourront nous aider à trouver de nouvelles voies pour lutter plus efficacement contre ces deux maladies infectieuses.

Ce travail de thèse a pour un double objectif : (1) d'évaluer le rôle vectoriel des espèces d'anophèles dans la co-transmission de *Plasmodium* spp., ainsi que *Wuchereria bancrofti*

dans les Provinces de Dak Nong et de Binh Phuoc, situées au centre-sud Vietnam, le long de la frontière avec le Cambodge ; et (2) d'estimer la biodiversité de la flore bactérienne des populations d'*Anopheles*, du centre-sud Vietnam puis, d'évaluer l'influence que certaines bactéries pourraient avoir sur la capacité vectorielle des espèces d'anophèles sur la base de la littérature existante.

**PARTIE I: Les espèces d'*Anopheles* au Vietnam et les vecteurs impliqués dans la co-transmission de *Plasmodium* spp. et de *Wuchereria bancrofti***



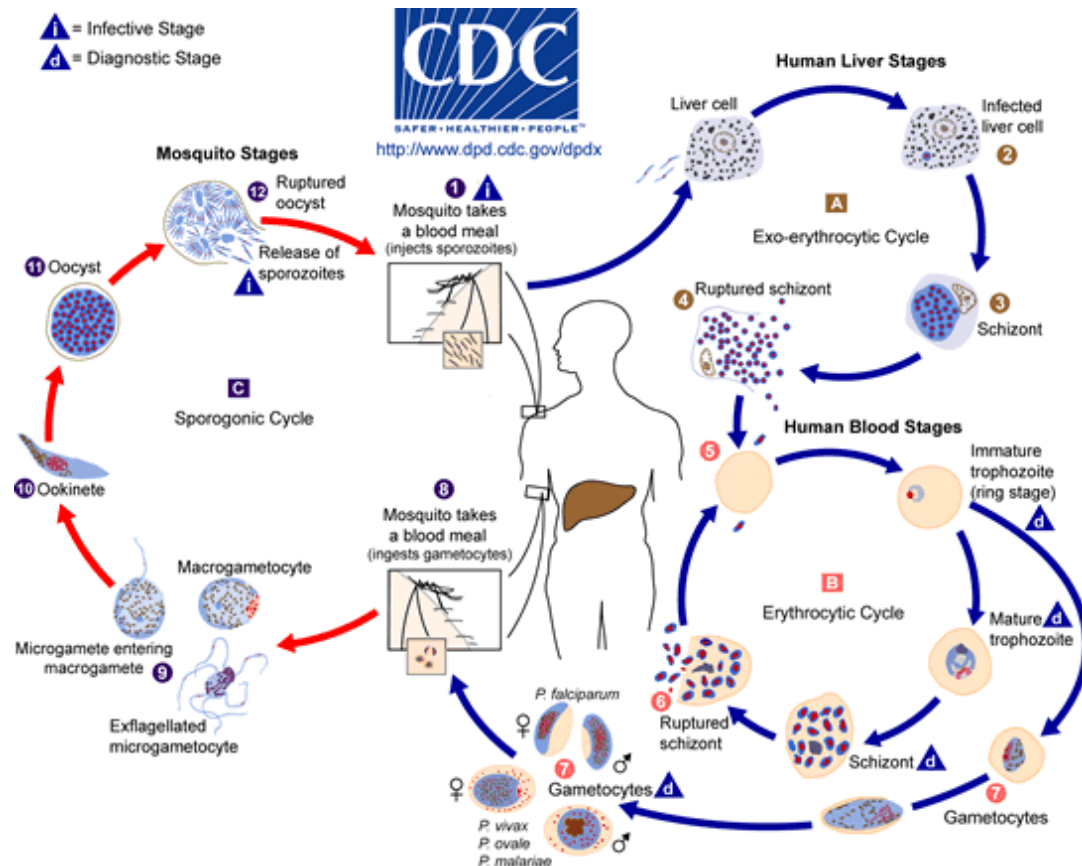
# I. Généralités

## 1. *Plasmodium* et paludisme au Vietnam

Les parasites du genre *Plasmodium* sont des protozoaires intracellulaires au cycle complexe qui exigent pour leur transmission d'un vertébré à l'autre, le passage obligatoire par un moustique du genre *Anopheles* chez lequel a lieu la reproduction sexuée. Le cycle des *Plasmodium* humains, tels que *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*, se décomposent en deux phases : une phase asexuée chez l'homme (hôte intermédiaire) et une phase sexuée qui débute chez l'homme par la formation des gamétocytes mâles et femelles et qui se réalise chez l'*Anopheles* (hôte définitif) [5] (Figure 3). *Plasmodium knowlesi* est responsable d'une zoonose particulièrement prévalente chez les singes, mais qui est également responsable de paludisme chez l'homme, ce qui a récemment attiré l'attention des chercheurs [31-33].

**Figure 3** : Cycle biologique de *Plasmodium* spp.

(source : [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm))



Au Vietnam, la situation du paludisme est compliqué avec la présence des quatre espèces de parasites humains et de *P. knowlesi* aussi signalé [24,34,35]. Les cas de paludisme sont principalement dus à *P. falciparum* (66 %), suivie par *P. vivax* (34 %), tandis que *P. malariae* et *P. ovale* sont rarement enregistrés [6,36]. *Plasmodium knowlesi* a été répertorié dans le centre-sud du Vietnam [24,37,38] et sa transmission est assurée par plusieurs espèces d'anophèles, surtout *Anopheles dirus* considéré comme le vecteur principal du paludisme au Vietnam [24,34].

Les deux pics de transmission du paludisme dans le pays où la prévalence est la plus élevée, sont observés : (1) de la fin de la saison des pluies au début de la saison sèche (septembre à janvier) et (2) de la fin de la saison sèche au début de la saison des pluies (mai à août). Les saisons sèche et pluvieuse peuvent être légèrement décalées d'une année sur l'autre et d'une région à l'autre, facteurs qui vont influencer l'intensité de la transmission du paludisme.

Après l'épidémie du 1991, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a été considéré comme la première priorité de santé publique et les activités de lutte intensive ont été mises en place pour aider à réduire la transmission du paludisme dans le pays. Le programme repose sur le traitement médicamenteux de masse basé sur différents dérivés d'artémisinine, tels que l'artesunate, le dihydroartémisinin-triméthoprim-piperaquine, l'artesunate-mefloquine, mais aussi la chloroquine combinée à la primaquine [39-43] dans les zones d'endémie élevées, associé à la lutte antivectorielle basée sur des aspersions intradomiciliaires d'insecticides et la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticide. Cette stratégie d'utilisation des insecticides et de traitements médicamenteux de masse ont été des mesures efficaces pour contrôler les vecteurs et la transmission du paludisme au Vietnam [42]. Les succès du PNLN ont été enregistrés dans de nombreuses régions, notamment dans les provinces du nord Vietnam où aucun cas de paludisme n'a été localement signalé et où le taux d'inoculation entomologique de *Plasmodium* a été rapporté comme tant nul depuis 2000 [44-47]. Fort de ce succès, le PNLN vise actuellement l'objectif d'éliminer le paludisme au Vietnam d'ici 2020 [6].

Cependant, après plusieurs décennies d'application d'insecticides, tels que le DDT, puis les pyréthriinoïdes comme la perméthrine, la deltaméthrine, l'alpha-cyperméthrin et la lambda-cyhalothrin [48] associés à l'utilisation de médicaments pour contrôler le paludisme, la double résistance des anophèles aux insecticides et des *Plasmodium* aux antipaludiques est apparue [41,48-53]. En outre, les modifications dans la stratégie d'utiliser le sol avec la déforestation, l'expansion des surfaces agricoles, le remplacement des rizières par l'aquaculture et principalement l'élevage de crevettes, ont introduit des changements spectaculaires dans les habitats de moustiques, représentant de nouveaux défis pour les stratégies de lutte contre le paludisme au Vietnam. Bien que des efforts considérables ont été investis dans l'application du PNLN dans le nord du pays, cette maladie reste un problème de santé publique important dans le sud et le centre, particulièrement dans les zones de collines forestières, le long des frontières internationales avec le Cambodge et le Laos où se produisent des mouvements fréquents de population humaine [54,55]. La population la plus à risque d'infection est celle située dans ces régions collinaires peuplées en particulier par des minorités ethniques qui ont un faible niveau de vie et d'éducation. Leurs activités professionnelles comprennent l'exploitation de la jungle et la pratique des cultures sur brûlis [5,28,56]. De plus, dans les forêts mises en culture et les zones de forêts exploitées, beaucoup d'ouvriers, pendant leurs activités, vivent dans des huttes ou abris rudimentaires qui n'assurent aucune protection contre les moustiques. Les mouvements de populations, ainsi que les conditions de vie

généralement pauvres, exposent les habitants de ces régions à un risque élevé de paludisme, ainsi ces populations souffrent cinq fois plus de paroxysmes de paludisme que les autres populations vietnamiennes [56,57].

Le terme « paludisme de forêt – *forest malaria* » est défini dans un contexte spécifique de l'épidémiologie, la transmission et implique plusieurs vecteurs sylvestres tel que *Anopheles dirus* [24,28,45,55]. En effet, les facteurs sociaux et écologiques, y compris ceux liés à la vie en régions isolées et les difficultés dans la mise en œuvre logistique des efforts de lutte contre les vecteurs, favorisent la transmission du paludisme [28,58-61].

Les rapports de l'OMS de 2010 et 2011 ont montré qu'au Vietnam, il y avait respectivement 36% et 18% de la population vivant encore dans des zones définies à transmission élevée, tandis que 54% à 20% ont été exposés à une faible transmission et 10% à 63% vivaient dans les régions exemptes de paludisme, dont de nombreuses régions urbanisées [6,62]. En 2012, 18 202 cas de paludisme (7 décès) ont été rapportés dans les régions centrales et les hauts plateaux du Vietnam [63]. La prévalence du paludisme et le taux d'inoculation entomologique ont été rapportés dans plusieurs provinces du sud et centre du Vietnam, telles que Binh Thuan, Ninh Thuan, Khanh Hoa, Quang Binh, Binh Phuoc, Dak Nong, Dak Lak, Bac Lieu, Binh Phuoc, Quang Tri [24,34,41,45,55,56,63-65].

Au contraire des provinces du centre-sud, aucun cas paludisme local n'a été signalé dans le nord du Vietnam depuis 1998, la transmission du paludisme n'est apparemment pas réapparue malgré la présence de vecteurs [45,66,67]. Cependant, Erhart et al. [68] ont posé la question de l'exactitude des données saisies par le système d'information de santé pour la surveillance du paludisme au Vietnam. Ces auteurs ont, entre autre, montré qu'il y avait probablement une sous-estimation des cas de paludisme signalés depuis les dernières décennies. En appliquant des outils d'analyse spatio-temporelle pour déterminer l'association entre les aspects sociaux, les facteurs environnementaux et les risques de paludisme au Vietnam, Bui et al. [61] ont soupçonné que la transmission du paludisme se produisait encore dans certaines régions du nord du Vietnam. Par conséquent, il serait important de maintenir les activités de surveillance du paludisme et de renforcer la capacité de contrôle des vecteurs afin de prévenir ou/et répondre à la réintroduction du paludisme dans les zones réceptives.

## **2. *Wuchereria bancrofti* et filarioses lymphatiques au Vietnam**

*Wuchereria bancrofti* est l'une des trois espèces de nématode parasite pouvant infecter le système lymphatique humain. Les deux autres espèces sont *Brugia malayi* et *Brugia timori*. *Wuchereria bancrofti* est l'agent pathogène de la filariose lymphatique de Bancroft (FLB), qui

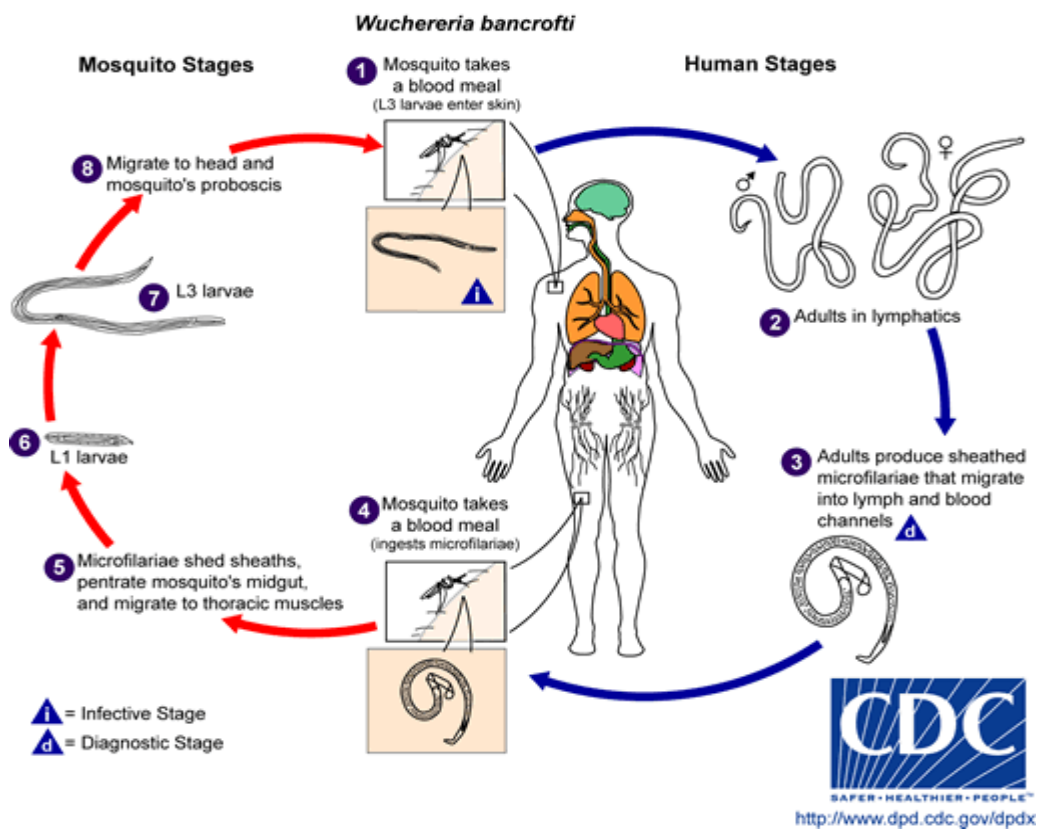
peut être transmis par des espèces de moustiques pouvant appartenant à 6 genres différents dont certaines espèces du genre *Anopheles*. Ce nématode peut être présent dans les régions rurales comme urbaines [69] et cause environ 90% des cas de FL [3].

Le cycle de vie de *W. bancrofti* est bi-phasique. Ses larves (L1 à L3) doivent se développer chez le moustique (hôte intermédiaire) jusqu'au stade infectant (L3). Les larves infectantes sont déposées sur la peau de l'homme (hôte définitif) pendant le repas sanguin et la L3 entrera dans l'hôte par une plaie ou par la piqûre du moustique, puis elles passeront au stade adulte (mâle ou femelle) [70] (Figure 4).

La filariose lymphatique est une maladie particulièrement débilitante, répandue dans la ceinture tropicale [2,3,7,30,71,72]. En raison des perspectives prometteuses du programme de contrôle basé sur la chimioprophylaxie de masse avec la diéthylcarbamazine (DEC), la FL a été reconnue comme l'une des six maladies infectieuses éradicables [73]. Le GPELF (Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis) a été lancé par l'OMS en 2000 pour entreprendre des activités visant à éliminer cette maladie à l'horizon de 2020. Les activités de ce programme sont bien définies (Figure 5). Dix ans après le lancement du programme (fin 2011), l'OMS a rapporté que 53 des 73 pays endémiques ont mis en œuvre l'administration massive de médicaments, parmi lesquels 12 sont passés en phase de surveillance dont le Vietnam [7].

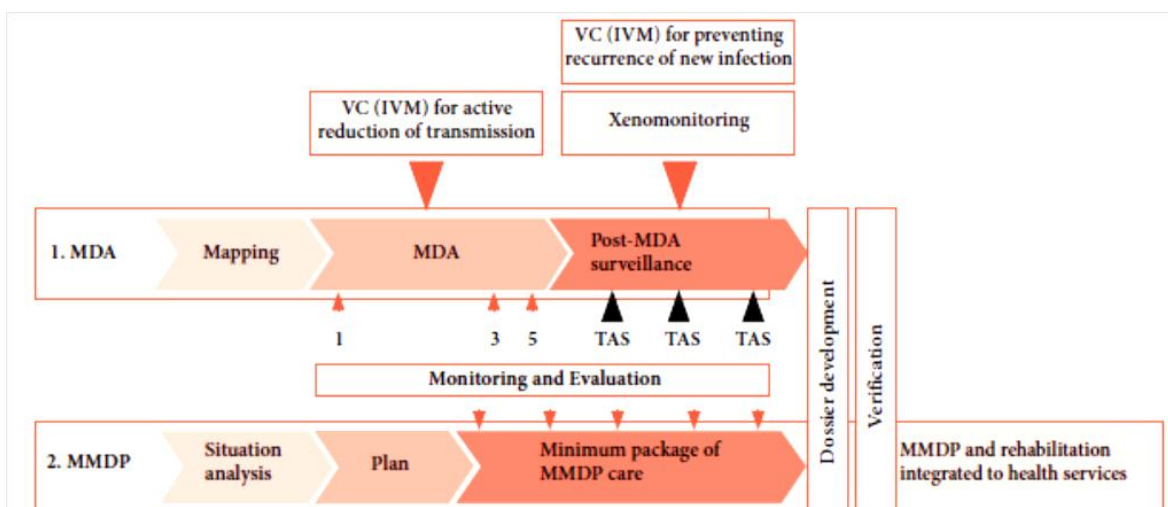
**Figure 4** : Cycle biologique de *Wuchereria bancrofti*

(Source : [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Filariasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Filariasis_il.htm))



**Figure 5** : Activités du GPELF et étapes séquentielles recommandées par l'OMS.

(Source : OMS 2013 [7])



IVM, integrated vector management; MDA, mass drug administration; MMDP, morbidity management and disability prevention; TAS, transmission assessment survey; VC, vector control

Les premiers cas de FL ont été révélés au début de XIX<sup>ème</sup> siècle, et depuis, des cas de FL ont été rapportés dans plusieurs régions du Vietnam, surtout dans les régions de basse altitude (e.g. Delta du Fleuve Rouge), et plus fréquemment en zones rurales qu'urbaines [30,69,74].

Mak [69] a résumé les résultats d'étude de la FL réalisés avant 1970 et montré des foyers d'endémie dans le Delta du Fleuve Rouge, Hanoï (nord), et les provinces de Minh Thanh, Hon Quan, Song Be, Bu Dop (actuel Binh Duong, Binh Phuoc, Lam Dong, Dak Nong - au sud et centre). Des cas de FL causés par *Brugia malayi* ont été localisés seulement dans le Delta du Fleuve Rouge, alors que dans le reste du pays, le pathogène est *Wuchereria bancrofti*. Le taux de prévalence de microfilaires à *Brugia malayi* à périodicité nocturne varie de 0,62 à 19,6%, celui de *W. bancrofti* va de 0 à 23,9% pour le nord et 5 à 22% pour le sud du Vietnam.

Ultérieurement, Meyrowitsch et al. [30] ont publié les résultats de la surveillance conduite par l'IMPE de Hanoï (Institute of Malariology, Parasitology and Entomology) durant 3 décades (à partir du 1960). Ils ont confirmé la situation de la FL dans la région du Delta du Fleuve Rouge (4 anciennes provinces qui sont actuellement divisées en 7 provinces : Ha Nam, Nam Dinh, Ninh Binh, Hai Duong, Hung Yen, Thai Binh et Ha Noi) avec une prévalence pour les périodes de 1960–1975, 1976–1983 et 1986–1990, respectivement allant de 4,9% à 13,4%, 0,9% à 5,5% et 4,3%. Durant ces périodes, la Province de Quang Binh (nord Vietnam) et Khanh Hoa (sud Vietnam) étaient aussi des foyers d'endémie avec les taux de microfilaires de 11,7% pour Quang Binh et de 7,2% pour Khanh Hoa. L'auteur a aussi montré que certains cas de FL au nord du pays sont causés par *Brugia malayi*, et *Wuchereria bancrofti* était l'agent pathogène de tous les cas FL au sud du Vietnam. Cette maladie était aussi présente dans des provinces des régions collinaires (Bac Ninh, Bac Giang, Ha Tay, Hoa Binh, Bac Kan, Thai Nguyen, Vinh Phuc, Phu Tho, Quang Ninh, Nghe An, Ha Tinh) et montagneuses (Ha Giang, Tuyen Quang) avec des taux de microfilaires faibles. Dans 5 communes des Provinces de Hai Hung et Ha Noi, où la surveillance a été répétée après 10 et 20 ans, une diminution importante des taux de prévalence de FL a été observée malgré l'absence d'intervention et cette diminution est expliquée par l'amélioration des conditions de vie et une meilleure protection de la population contre les piqûres de moustiques, tels qu'*Anopheles* spp. et *Culex quinquefasciatus*, vecteurs primaires de *W. bancrofti* en zones rurales et urbaines respectivement.

Les résultats d'une étude réalisée pendant 3 ans (2003 – 2005) sur la caractéristique de la FL dans le District de Khanh Vinh, Province de Khanh Hoa [75], ont montré une prévalence de la FLB de 4,64%, la minorité ethnique de Ra-glai étant infectée à plus de 5,28% et la fréquence

de la maladie est plus importante chez l'homme que la femme. *Wuchereria bancrofti* est le seul agent pathogène à Khanh Vinh. Dix-sept espèces de moustiques, dont 4 du genre *Anopheles* (*An. annularis*, *An. aconitus*, *An. nivipes* et *An. vagus*), ont été collectées dans les sites d'étude. Parmi de 144 spécimens d'*An. vagus*, aucun moustique n'a été trouvé infecté par les microfilaires, de même pour les autres espèces de moustiques [75].

A partir d'une revue basée sur les données obtenues en 2006, l'OMS a montré que jusqu'en 2006, le Vietnam était encore un pays où la FL était endémique avec 675 000 personnes vivant dans les zones à risque (6 districts situés dans le Delta du Fleuve Rouge et la Province de Quang Binh) [74].

Pour atteindre le but de l'éradication de la FL fixé par le Programme National d'Élimination de la Filariose Lymphatique et le GPELF, les activités de surveillance de la FL et le contrôle des vecteurs se poursuivent dans le pays, particulièrement dans les foyers d'endémie connus [76].

### **3. Biodiversité des espèces d'*Anopheles* au Vietnam**

Les moustiques du genre *Anopheles* (Diptera : Culicidae) sont les seuls à transmettre les pathogènes responsables du paludisme humain et quelques espèces de ce genre peuvent aussi transmettre *Wuchereria bancrofti*, responsable de la FLB [1,3]. Seuls les moustiques femelles piquent et sont ainsi responsables de la transmission des agents du paludisme et de la FLB chez l'homme car elles ont besoin de sang pour assurer la maturation de leurs œufs.

Le cycle de développement des anophèles se compose de deux phases : (i) une phase aquatique à partir de l'œuf duquel sortira une larve de 1<sup>er</sup> stade (L1), puis successivement de stades 2 à 4 (L2-L4), et se termine par la nymphe dans laquelle s'effectuera la métamorphose en adulte ; et (ii) une phase aérienne qui débute par l'émergence de l'adulte mâle ou femelle de sa nymphe. Quelques heures après l'émergence des adultes, les femelles cherchent leur premier hôte pour prendre leur premier repas sanguin et aussi un mâle avec lequel s'effectuera l'accouplement. Le repas de sang est alors suivi d'une phase de repos pendant laquelle la femelle digère le sang, alors que ses ovocytes grossissent et mûrissent. Lorsque les œufs sont prêts à être pondus, la femelle part à la recherche d'un gîte aquatique propice à la ponte, puis reprendra sa quête d'un nouvel hôte pour effectuer un autre repas de sang et cela toutes les 48 heures. La longévité moyenne d'un anophèle femelle est d'environ 3-4 semaines [5].

Le genre *Anopheles* contient actuellement de 539 espèces [9], dont 61 espèces répertoriées dans les clés d'identification des anophèles du Vietnam, y compris les membres des Groupes



Maculatus et Hyrcanus, ainsi que ceux des complexes d'espèces Minimus, Dirus, Sundaicus et Gigas [77]. La présence de groupes et de complexes chez les *Anopheles* d'Asie du Sud-est génère des problèmes d'identification au niveau de l'espèce qui ne peut être réalisée sur la seule base des caractéristiques morphologiques, ce qui introduit des difficultés dans l'évaluation du rôle spécifique de chaque espèce dans la transmission des parasites [25,78-81]. Selon leur implication dans la transmission d'agents du paludisme, les espèces d'*Anopheles* au Vietnam se divisent en 3 catégories : (i) les vecteurs primaires qui comprennent les 4 espèces du Complexe Dirus (*An. dirus*), Complexe Minimus (*An. minimus*, *An. harrisoni*) et Complexe Sundaicus (*An. epiroticus*) ; (ii) les vecteurs secondaires ou vecteurs opportunistes qui incluent des espèces des Groupes Maculatus (*An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, *An. rampae*) et Hyrcanus (*An. sinensis*), *An. aconitus*, *An. jeyporiensis*, *An. subpictus*, *An. pampanai*, *An. vagus*, *An. indefinitus* ; et (iii) les vecteurs potentiels dont *An. interruptus*, *An. campestris*, *An. lesteri* et *An. nimpe* (Groupe Hyrcanus). Donc, 18 espèces (30 %) sont considérées comme ayant un rôle dans la transmission du paludisme dans le pays [78,82].

A part *An. epiroticus* et *An. subpictus*, vecteurs restreints au littoral côtier dû à leurs habitats larvaires constitués d'eau saumâtre [83], les autres vecteurs primaires du Vietnam (*An. minimus*, *An. dirus*) semblent présents dans toutes les régions du nord au sud du pays [46,67,84,85]. Les 2 espèces du Complexe Minimus présentes au Vietnam se trouvent normalement dans les collines boisées associées aux canaux et ruisseaux d'eau douce. Toutefois, *An. minimus* a également été trouvé dans les étangs ensoleillés et ombragés ou des rizières [86,87]. Dans la banlieue de Hanoï, le long du Fleuve Rouge, la présence d'*An. minimus* dans des conteneurs d'eau domestique à côté des habitations a été observée sans pour autant de transmission de paludisme [86-88]. Alors qu'*An. dirus* est aussi associé aux collines boisées, cette espèce est particulièrement inféodée aux forêts tropicales primaires et secondaires comme les plantations d'hévéa ou d'arbres fruitiers qui fournissent une ombre dense. Ces forêts sont les lieux privilégiés de ses habitats larvaires [24,55,60,64].

La biologie des vecteurs secondaires et vecteurs potentiels reste encore mal étudiée et leur rôle dans la transmission du paludisme est fort probablement sous-estimé [46,55,60,64].

Le PNLP au Vietnam a eu beaucoup de succès et le rôle des insecticides utilisés pour contrôler les vecteurs y a participé [42]. Cependant, la résistance des vecteurs aux insecticides a fait son apparition, ce qui risque d'affaiblir les moyens du PNLP [48,51,89] et aussi causer des changements d'habitat et de distribution de certaines espèces d'anophèle [25,46,64,90]. De plus, les changements environnementaux importants générés par l'homme, comme la

déforestation, le reboisement, l'agriculture, l'aquaculture (élevage de poissons et de crevettes en bassins) remplaçant la riziculture, la construction de routes, de barrages, les pratiques de cultures sur brûlis, ont une incidence sur l'habitat, la diversité et la distribution des vecteurs et donc sur la transmission du paludisme [28]. En milieu urbain et rural, l'expansion de l'électricité aux villages montagneux et isolés encourage les résidents à rester plus longtemps à l'extérieur pendant la nuit, ce qui augmente le risque chez cette population non protégée de se faire piquer par les anophèles, notamment *An. dirus* qui est plus susceptible d'être exophage et exophile [28,46,55,65]. La construction de logements a aussi des implications sur la transmission du paludisme, les maisons avec des ouvertures (par exemple, des murs inachevés ou des planches non ajustées, pas de porte, etc) sont autant de voies d'entrée pour les vecteurs anthropophiles qui pourront piquer facilement les habitants [46]. Le développement de l'économie et l'augmentation du niveau de vie dans le pays conduiront donc à l'amélioration de l'habitat rendant plus difficile le contact homme-vecteur.

Récemment, de nombreuses études ont contribué à améliorer la connaissance sur la biologie, le comportement et la distribution des espèces d'*Anopheles* au Vietnam, certaines de ces recherches se sont particulièrement concentrées sur les régions du centre et du sud, où la transmission du paludisme est endémique [24,25,46,55,60,64,65]. La distribution de 35 des 61 espèces d'*Anophèles* au Vietnam récemment publiée est présentée dans le tableau 1. Ces résultats montrent que la présence des espèces d'anophèle, considérés comme des vecteurs majeurs et secondaires ou suspectés d'être vecteur, est observée presque dans tous les sites d'études. Ces publications récentes montrent aussi que les vecteurs primaires d'agent du paludisme sont encore bien présents dans les provinces forestières du nord Vietnam [46,67,85], même si aucun cas de paludisme n'a été rapporté dans les régions nord du pays après l'année 1998 [26,45].

**Tableau 1** : Distribution des espèces d'anophèles du Vietnam basée sur la littérature publiée pendant la période 2005 – 2013. Les noms de 15 provinces du Vietnam = Hoa Binh, Son La, Ha Giang, Quang Ninh, Thanh Hoa, Nghe An, Lang Son, Lao Cai, Quang Nam, Gia Lai, Quang Tri, Phu Yen, Kon Tum, Binh Duong, Binh Thuan, sont détaillés dans trois publications [26,91,92]

<b>Espèces</b>	<b>Provinces</b>	<b>Références</b>
<i>An. aconitus</i>	Khanh Hoa, Ninh Thuan, Quang Binh, 4 zones forestières du nord du Vietnam, 15 provinces du Vietnam.	[26,46,55,60,64,85,91,92]
<i>An. annandalei</i>	Binh Thuan	[55]
<i>An. annularis</i> s.l.	Binh Thuan, Ninh Thuan, Quang Binh, Hoa Binh, 7/15 provinces du Vietnam	[26,46,55,60,64,91,92]
<i>An. argyropus</i>	Binh Thuan	[55]
<i>An. barbirostris</i>	Quang Binh, 7/15 provinces du Vietnam	[26,46,55,64,91,92]
<i>An. barbumbrosus</i>	Binh Thuan, Bac Lieu, Dak Nong	[46,55,93]
<i>An. campestris</i>	Bac Lieu, Binh Duong	[26,46,91,92]
<i>An. crawfordi</i>	Binh Thuan, Khanh Hoa, Quang Binh, Dak Nong	[46,55,64,93,94]
<i>An. dirus</i>	Binh Thuan, Khanh Hoa, Ninh Thuan, Quang Binh, les 4 zones forestières du nord du Vietnam, Gia Lai, Phu Yen, Dak Nong	[24,26,46,60,64,85,91-93]
<i>An. donaldi</i>	4 zones forestières du nord du Vietnam	[85]
<i>An. epiroticus</i>	Bac Lieu	[46]
<i>An. gigas</i>	Quang Binh, Dak Nong	[64,93]
<i>An. harrisoni</i>	Quang Binh, Khanh Hoa, 7/15 province du Vietnam	[25,26,46,64,91,92]
<i>An. jamesii</i>	Binh Thuan, Quang Binh, Gia Lai, Binh Duong	[26,55,64,91,92]
<i>An. jeyporiensis</i>	Binh Thuan, Quang Binh, quatre zones forestières du nord du Vietnam, 12/15 provinces du Vietnam	[26,46,55,64,85,91,92]
<i>An. karwari</i>	Binh Thuan, Ha Giang, Nghe An, Kon Tum, Dak Nong	[26,46,91,92]
<i>An. kochi</i>	Ninh Thuan, Quang Binh, 13/15 provinces du Vietnam.	[26,46,55,60,64,91,92]
<i>An. maculatus</i> s.l	Ninh Thuan, Quang Binh, 4 zones forestières du nord du Vietnam, 15 provinces du Vietnam, Dak Nong	[26,46,55,60,64,85,91-93]

<i>An. minimus</i> s.l/ <i>An. minimus</i> s.s	Ninh Thuan, Quang Binh, 4 zones forestières du nord du Vietnam, 15 provinces du Vietnam (sauf Kon Tum)	[25,26,46,60,64,65,67,85,91,92]
<i>An. monstrosus</i>	Binh Thuan	[55]
<i>An. nigerrimus</i>	Binh Thuan	[55]
<i>An. nimpe</i>	Bac Lieu	[46]
<i>An. nivipes</i>	Quang Binh, 6/15 province du Vietnam	[26,46,55,64,91,92]
<i>An. pampanai</i>	Binh Thuan,	[26,46,55,91,92]
<i>An. peditaeniatus</i>	Binh Thuan, Khanh Hoa, Ninh Thuan, Quang Binh, Ha Giang, Phu Yen, Binh Duong	[26,46,55,60,64,91,92]
<i>An. philippinensis</i>	Ninh Thuan, Quang Binh, 14/15 province du Vietnam (sauf Son La)	[26,46,55,60,64,91,92]
<i>An. sawadwongporni</i>	Quang Binh	[64]
<i>An. separatus</i>	Quang Binh	[64]
<i>An. sinensis</i>	Bac Lieu, Ninh Thuan, Quang Binh, quatre zones forestières du nord du Vietnam, 14/15 provinces du Vietnam (sauf Phu Yen)	[26,46,55,60,64,85,91,92]
<i>An. splendidus</i>	11/15 provinces du Vietnam	[26,46,55,91,92]
<i>An. subpictus</i>	Bac Lieu, 4 zones forestières du nord du Vietnam	[46,85]
<i>An. tessellatus</i>	Binh Thuan, Bac Lieu, Khanh Hoa, Quang Binh, 9/15 provinces du Vietnam	[26,46,55,64,91,92]
<i>An. umbrosus</i>	Quang Binh	[64]
<i>An. vagus</i>	Ninh Thuan, Quang Binh, 13/15 provinces du Vietnam (sauf Quang Ninh et Quang Tri)	[26,46,55,60,64,91,92]
<i>An. varuna</i>	Binh Thuan	[55]

## II. Variations morphologiques chez les espèces d'*Anopheles* et l'étude moléculaire et phylogénétique au sein du Groupe Hyrcanus

### 1. Variations morphologiques des espèces d'*Anopheles*

La réussite du contrôle du paludisme dépend en grande partie de l'efficacité de la lutte antivectorielle qui repose sur l'identification correcte des vecteurs impliqués dans la transmission du parasite, ainsi la précision des méthodes d'identification des espèces d'anophèle est cruciale. Le genre *Anopheles* présente de nombreuses espèces au Vietnam (n=61) et les vecteurs appartiennent à des complexes ou des groupes d'espèces qui sont morphologiquement très proches, voire indifférenciables. De plus, les caractères morphologiques des anophèles peuvent être sous l'influence de plusieurs facteurs, y compris les conditions environnementales, le lieu géographique ou les changements climatiques [80,87,95-99]. Ces variations peuvent introduire des erreurs d'identification d'espèces qui mettent en péril les programmes de lutte antivectorielle. Des études ont montré qu'*An. varuna*, *An. pampanai* et *An. aconitus*, considérés comme non-vecteurs ou vecteurs opportunistes du paludisme, ont été faussement identifiés comme étant *An. minimus*, un vecteur primaire en Asie du Sud-est [79,100]. *Anopheles minimus* a aussi été identifié comme *An. fluviatilis s.l.* dans la Province d'Assam (Inde) [98] et Foley et al. [101] ont constaté qu'il y avait 7% d'*Anopheles flavirostris*, le vecteur principal de la transmission du paludisme aux Philippines, qui appartenaient à *An. filipinae*, une espèce non-vectrice.

Ainsi les variations morphologiques parmi les espèces d'*Anopheles* peuvent avoir une implication négative sur les stratégies de lutte contre le paludisme car l'identification des espèces d'anophèles basée sur les caractères morphologiques reste actuellement encore une méthode largement appliquée, malgré son manque de fiabilité largement reconnue pour les complexes d'espèces [80]. La taxonomie moléculaire basée sur différentes techniques de Polymerase Chain Reaction (PCR) est considérée comme l'approche la plus fiable pour différencier les espèces, en particulier les espèces jumelles de complexe ou de groupe d'*Anopheles*. Elle est évidemment la solution la plus fiable d'identification des espèces, palliant par exemple aux problèmes des variations morphologiques. En plus, cette méthode ne

demande pas beaucoup de matériel biologique, la PCR d'identification des espèces jumelles et les PCR/qPCR de détection des différents parasites peuvent être faites à partir d'une seule extraction d'ADN, ce qui facilite un diagnostic rapide des espèces et de leur capacité vectorielle permettant la mise en place d'un programme de lutte antivectorielle ciblée et efficace.

## **2. Etude moléculaire et phylogénétique au sein du Groupe Hyrcanus**

Le Groupe Hyrcanus est le groupe le plus riche en espèces au sein de la Série Myzorhynchus du Genre *Anopheles* (Sous-genre *Anopheles*) avec 26 espèces actuellement reconnue [9]. Toutefois, la classification interne au groupe est controversée car elle comprend des espèces ayant des caractères morphologiques très variables, et d'autres qui partagent des caractères morphologiques avec des espèces étroitement apparentées [102,103]. Le groupe est largement répandu dans en régions Paléarctique et Orientale, dont l'Asie du Sud-est [104] et il comprend plusieurs espèces connues pour être des vecteurs du paludisme humain et de FLB [105-107]. Par exemple, quelques espèces du groupe ont récemment été incriminées comme étant des vecteurs principaux dans la transmission de *Plasmodium vivax* en Corée [103,108-111]. La distribution large et les variations morphologiques des espèces du Groupe Hyrcanus ont causé des difficultés dans leur identification et l'évaluation de leur rôle vecteur dans la transmission des parasites [99,112-115].

Les onze espèces du groupe Hyrcanus (sur 26 espèces décrites) nommées dans les clés d'identification des *Anopheles* du Vietnam sont : *An. argyropus*, *An. nimpe*, *An. sinensis* ; les 5 espèces du sous-groupe *Lesteri* : *An. crawfordi*, *An. lesteri*, *An. paraliae*, *An. peditaeniatus*, *An. vietnamiensis* ; et 3 des 4 espèces du sous-groupe *Nigerrimus* : *An. nigerrimus*, *An. nitidus*, *An. pursati*, dont certaines espèces décrites à l'origine au Vietnam, tels qu'*An. nimpe* et *An. vietnamiensis*. Parmi ces espèces, *An. lesteri* et *An. sinensis* sont des vecteurs capables de co-transmettre *Plasmodium* spp. et *W. bancrofti* [3]. Cependant, il existe encore des erreurs dans la taxonomie des espèces du Groupe Hyrcanus au Vietnam [64].

Depuis 1987, les entomologistes vietnamiens ont identifié une nouvelle espèce, *Anopheles dangi*. L'illustration morphologique de la clé d'identification des *Anopheles* du Vietnam montre que cette espèce est très proche d'*An. crawfordi*. Les adultes de ces deux espèces ne se différencient que par la présence (*An. crawfordi*) ou l'absence (*An. dangi*) d'écailles blanches sur la base de costa allaire [77,116]. Cette nouvelle espèce décrite qu'au Vietnam n'a jamais fait l'objet d'une description formelle et internationalement reconnue.

Avec pour objectif de clarifier la relation entre ces deux espèces et de pouvoir vérifier l'existence d'*Anopheles dangi*, nouvelle espèce non répertoriée, nous avons réalisé une étude pour évaluer la relation taxonomique entre ces deux espèces.

Les moustiques anophèles étudiés ont été collectés dans la Province de Dak Nong (centre-sud du Vietnam). Sur le terrain, les femelles de ces deux espèces ont été différenciées morphologiquement l'une de l'autre et des autres espèces en utilisant les clés d'identification des *Anopheles* au Vietnam, illustrées par l'IMPE – Institute of Malariology, Parasitology et Entomology du Vietnam [77,116]. En France, au laboratoire, les spécimens suspectés appartenant à *An. crawfordi* ou *An. dangi* ont été examinés une seconde fois afin de vérifier leur identification morphologique sur la base de la présence ou absence des écailles blanches sur la costa alaire. Les spécimens confirmés ont alors été comparés morphologiquement avec les spécimens type d'*An. crawfordi* disponibles au Musée d'Histoire Naturelle de Londres (UK) sous la supervision du Dr. R.E. Harbach.

Après l'analyse morphologique, l'étude moléculaire des spécimens a porté sur l'analyse des séquences des gènes D3 de l'ADN ribosomal, et des Cytochromes I (COI), II (COII) et b (Cyt-b) de l'ADN mitochondrial. Les arbres phylogénétiques construits en utilisant les méthodes de maximum de vraisemblable et analyse Bayésienne via le logiciel MEGA version 5 [117], ont montré qu'*An. dangi* n'est qu'une variation morphologique d'*An. crawfordi*. Nos résultats corroborent l'abandon définitif de l'espèce *An. dangi* qui tombe en synonymie avec *An. crawfordi*. Cette étude et les résultats obtenus sont détaillés et discutés dans l'article 1 (ci-dessous).

**Article 1:** Taxonomic assessment of *Anopheles crawfordi* and *An. dangi* of the Hyrcanus Group of subgenus *Anopheles* in Vietnam.

#### Résumé de l'article 1:

*Anopheles dangi* a été présenté comme une nouvelle espèce du Groupe Hyrcanus, sous-genre *Anopheles*, dans la clé dichotomique d'identification des moustiques du genre *Anopheles* du Vietnam, illustrée et publiée en 1987 par le NIMPE (National Institute of Malariology, Parasitology & Entomology, Hanoi, Vietnam). Cette espèce se différencie d'*Anopheles crawfordi* par la seule présence d'une tâche blanche composée d'écailles blanches sur la base de la costa alaire. Toutefois, ce caractère morphologique a aussi été occasionnellement trouvé chez *An. crawfordi*. Pour déterminer si *An. dangi* est une espèce distincte d'*An. crawfordi*, à partir de spécimens d'*An. dangi* et *An. crawfordi* collectés au centre-sud Vietnam et identifiés

sur la base de la présence ou l'absence, respectivement, d'une tâche blanche sur la base de la costa alaire, une analyse des séquences des gènes COI, COII et Cyt-b de l'ADN mitochondrial et du gène D3 de l'ADN ribosomal, a été réalisée. Les analyses en maximum de vraisemblable et Bayésienne des séquences ont montré une faible distance génétique en moyenne de 0,004 pour les spécimens identifiés comme *An. crawfordi* et 0,008 pour ceux identifiés comme *An. dangi*. La distance génétique moyenne entre les deux espèces nominales était de 0,006, comparée à 0,077 entre l'une ou l'autre de ces espèces et les exo-groupes *Anopheles dirus* et *Anopheles minimus*, ce qui montre que les spécimens des deux espèces se regroupent en un seul clade fortement soutenu. En conséquence, *An. dangi* est un variant morphologique d'*An. crawfordi* et définit à présent comme étant un synonyme de cette espèce nominale.

**Mots clés :** *Anopheles crawfordi*, *Anopheles dangi*, Hyrcanus Group, Vietnam, analyse phylogénétique.





## Taxonomic assessment of *Anopheles crawfordi* and *An. dangi* of the Hyrcanus Group of subgenus *Anopheles* in Vietnam



Chung Thuy Ngo<sup>a,b</sup>, Ralph E. Harbach<sup>c</sup>, Claire Garros<sup>d,e</sup>, Daniel Parzy<sup>f</sup>,  
Hong Quang Le<sup>g</sup>, Sylvie Manguin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UPMC, UMR-MD3, Faculté de Pharmacie, F-34093 Montpellier, France

<sup>b</sup> National Institute of Veterinary Research, Hanot, Vietnam

<sup>c</sup> Department of Life Sciences, Natural History Museum, London SW7 5BD, UK

<sup>d</sup> Cirad, UMR15 CMAEF, F-34398 Montpellier, France

<sup>e</sup> INRA, UMR1309 CMAEF, F-34398 Montpellier, France

<sup>f</sup> UMR-MD3/IRBA, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université, F-13385 Marseille, France

<sup>g</sup> Military Preventive Medicine Centre, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 June 2013

Received in revised form 6 September 2013

Accepted 7 September 2013

Available online 17 September 2013

#### Keywords:

*Anopheles dangi*

*Anopheles crawfordi*

Hyrcanus Group

Vietnam

Phylogenetic analysis

### ABSTRACT

*Anopheles dangi*, introduced as a new species of the Hyrcanus Group of subgenus *Anopheles* in an illustrated dichotomous key for the identification of the *Anopheles* mosquitoes of Vietnam published in 1987, was distinguished from *Anopheles crawfordi* based on the presence of a humeral pale spot on the base of the costal vein of the wing. However, this character has been known to occur occasionally in *An. crawfordi*. To determine whether *An. dangi* is distinct from *An. crawfordi*, we analyzed nucleotide sequences of the *COI*, *COII* and *Cyt-b* genes of mtDNA and the *D3* gene of rDNA obtained from specimens collected in south-central Vietnam that were identified as *An. dangi* and *An. crawfordi* based on the presence or absence, respectively, of a humeral pale spot. Maximum Likelihood and Bayesian analyses of the sequences showed a low mean genetic distance of 0.004 for specimens identified as *An. crawfordi* and 0.008 for those identified as *An. dangi*. The mean genetic distance between the two nominal species was 0.006, compared with 0.077 for any group versus the outgroup taxa *Anopheles dirus* and *Anopheles minimus*, and the specimens of the two forms clustered in a single strongly supported clade. Consequently, *An. dangi* is merely a morphological variant of *An. crawfordi* and is deemed to be a synonym of that nominal species.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The genus *Anopheles* currently includes 467 formally named species (Harbach, 2013), but only 60–70 species are considered to be involved in the transmission of malarial protozoa (Manguin et al., 2008). Improved knowledge about the vector capacity of the *Anopheles* species that transmit malarial parasites is needed for appropriate malaria control programmes in endemic countries, especially in Southeast Asia where the vectors are members of sibling species complexes or morphologically similar groups and populations of humans continue to be burdened by the disease.

The Hyrcanus Group of the subgenus *Anopheles* is a complex assemblage of species in the Oriental and southern Palaearctic

regions (Nguyen et al., 2000). It is the largest group of the Myzorhynchus Series, with 27 species, nine of which are placed in subgroups, the Lesteri (5 species) and Nigerrimus (4 species) Subgroups (Harbach, 2013). Several species of the group have been implicated as vectors of human malarial protozoa (Ponçon et al., 2007a,b; Ponçon et al., 2008). In Vietnam, national researchers have confirmed the status of *Anopheles sinensis* as a vector of *Plasmodium malariae* (Do et al., 2010) and *Anopheles nimpe* as a vector of both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in southern Vietnam (Do et al., 2010; Nguyen et al., 2000; Nguyen, 1993). *Anopheles sinensis*, the main malaria vector species of the group, plays an important role in malaria transmission in the Ganghwa-do malaria-endemic area in the Republic of Korea (Oh et al., 2010). Prakash et al. (2004) indicated that several species of *Anopheles* previously considered to be unimportant in the epidemiology of malaria, including members of the Hyrcanus Group, are actually important vectors in the foothills of Assam State in northeastern India. Ponçon et al. (2007b) reported that *Anopheles hyrcanus*, based on its abundance and anthropophilic behaviour, seems to be the only species that is likely to play a role in malaria transmission in the Camargue in southeastern France, which is currently a malaria-free country.

\* Corresponding author. Tel.: +33 411759484; fax: +33 411759546.

E-mail addresses: [thuy\\_ngo1712@yahoo.com](mailto:thuy_ngo1712@yahoo.com) (C.T. Ngo), [r.harbach@nhm.ac.uk](mailto:r.harbach@nhm.ac.uk) (R.E. Harbach), [claire.garros@cirad.fr](mailto:claire.garros@cirad.fr) (C. Garros), [daniel.parzy@univ-amu.fr](mailto:daniel.parzy@univ-amu.fr) (D. Parzy), [lehongquangspmc@yahoo.com.vn](mailto:lehongquangspmc@yahoo.com.vn) (H.Q. Le), [sylvie.manguin@ird.fr](mailto:sylvie.manguin@ird.fr) (S. Manguin).

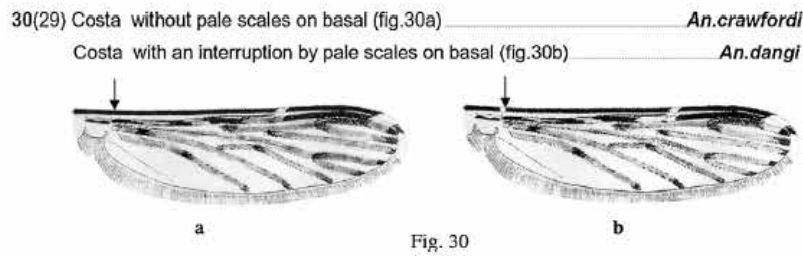


Fig. 1. Morphological characters that supposedly distinguish *Anopheles crawfordi* and *An. dangi* (reproduced from NIMPE, 2008).

Species of the Hyrcanus Group have received relatively little attention but it is now recognized that members of the group cannot be identified with certainty based on morphological characteristics. This adds to the difficulties of characterizing the ecology, distribution, and behaviour of members of the group because they can only be reliably identified by use of PCR-based assays (Kim et al., 2007). Consequently, much additional taxonomic work needs to be done to differentiate the species, determine their distributions, and establish the phylogenetic relationships within the group.

Molecular analyses have proven to be useful in taxonomic and phylogenetic studies. Such methods, for example, have been used successfully to distinguish members of the *Funestus* Group (*Myzomyia* Series of subgenus *Cellia*), which includes 31 species variously distributed in Asia and Africa (Garros et al., 2005). Within the *Dirus* Complex (*Leucosphyrus* Group, *Pyrethrophorus* Series, subgenus *Cellia*) in Southeast Asia, a new species, informally designated *Anopheles* aff. *takasagoensis*, was recently discovered in northern Vietnam based on mitochondrial DNA sequence polymorphism (Takano et al., 2010). Molecular studies of mosquitoes have been used primarily to reveal and identify morphologically indistinguishable sibling species (Scott et al., 1993). However, molecular markers have also been used to determine phylogenetic relationships (Besansky et al., 1994), including divergence times and population structure. The nucleotide sequences of the internal transcribed spacer 2 (*ITS2*) and the third domain (*D3*) of ribosomal DNA have frequently been used in studies involving the identification of *Anopheles* species, as well as phylogeny reconstruction, particularly for members of the Hyrcanus Group (Garros et al., 2005; Hwang et al., 2006, 2004; Li et al., 2005; Ree et al., 2005; Wilkerson et al., 2003; Ma and Xu, 2005). Mitochondrial genes such as cytochrome oxidase subunits 1 (*COI*) and 2 (*COII*) and cytochrome B (*Cyt-b*) have also been used to identify species of the Hyrcanus Group, as well as species of other species groups and complexes of Asian *Anopheles* (Dusfour et al., 2004; Garros et al., 2005; Paredes-Esquivel et al., 2011; Yang et al., 2011).

In 1987 and 2008, government entomologists in Vietnam included a purportedly new species of the Hyrcanus Group, *Anopheles dangi* sp. n., in publically available, illustrated dichotomous keys for the identification of the *Anopheles* mosquitoes of Vietnam (IMPE, 1987; NIMPE, 2008). As the name of the proposed new species, when first published in 1987, was subject to and meets the criteria of availability set forth in the third edition of the *International Code of Zoological Nomenclature* (1985), specifically Articles 11 and 13, it is deemed to have been formally established. Article 13(a)(i) is particularly applicable as it states that to be available a scientific name must be "accompanied by a description or definition that states in words characters that are purported to differentiate the taxon". In this case, the key feature that distinguishes *An. dangi* from *Anopheles crawfordi* is both illustrated and stated in words: a humeral pale spot is present on the wing of *An. dangi* and absent in *An. crawfordi* (IMPE, 1987; NIMPE, 2008). However, Harrison and Scanlon (1975) noted that a humeral pale spot may also be present in some

adults of *An. crawfordi*, more frequently in males than females. The identification of species of the Hyrcanus Group is difficult due to intraspecific variation and interspecific similarity of key characters (Hwang et al., 2004). Consequently, the presence or absence of a humeral pale spot is not diagnostic for either *An. dangi* or *An. crawfordi*, respectively.

To determine whether *An. dangi* is distinct from *An. crawfordi*, we conducted molecular analyses of four gene sequences obtained from mosquitoes collected in south-central Vietnam that were identified as *An. dangi* and *An. crawfordi* based on the presence or absence, respectively, of a humeral pale spot (Fig. 1).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Morphological analysis

Morphological studies were conducted on 26 *Anopheles* adults (Table 1), collected in Dak Nong Province (12°02' N–107°20' E) where the average temperature is 24 °C, the rainy season lasts from May to October, and the dry season from November to April. Samples were collected in November 2011 during the transition from the rainy to the dry season. The mosquitoes were collected resting around a pig enclosure, near a shelter used by forest workers, during five consecutive nights using mouth aspirators.

Table 1  
Specimens and associated groups of *An. crawfordi*, *An. dangi* and outgroups collected in the Province of Dak Nong (Vietnam).

Specimen no.	Taxon <sup>a</sup>	Group <sup>b</sup>
130	<i>An. dangi</i>	Group 1
266	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
283	<i>An. dangi</i>	Group 2
285	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
286	<i>An. dangi</i>	Group 1
290	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
1.2	<i>An. dangi</i>	Group 2
3.6	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
165	<i>An. dangi</i>	Group 1
261	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
262	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
263	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
269	<i>An. dangi</i>	Group 1
280	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
281	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
282	<i>An. dangi</i>	Group 2
284	<i>An. dangi</i>	Group 2
289	<i>An. dangi</i>	Group 2
3.4	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
295	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
302	<i>An. crawfordi</i>	Group 2
303	<i>An. crawfordi</i>	Group 1
MA	<i>An. mintimus</i>	Outgroup
DA	<i>An. dirus</i>	Outgroup

<sup>a</sup> Indicates morphological identification in the field.

<sup>b</sup> Indicates morphological examination in London and France.

Morphological identification was initially done in the field by Vietnamese entomologists using the keys published by the National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology (NIMPE) (IMPE, 1987; NIMPE, 2008). A detailed morphological study of the specimens, including comparison with the type specimens of *An. crawfordi*, was conducted in 2012 at the Natural History Museum, London. Two morphospecies were distinguished, based primarily on the presence/absence of a humeral pale spot on one or both wings. One mosquito of each morphological group was retained as a voucher specimen at the Laboratory of Comparative Molecular Immuno-Physiopathology (LIPMC), Institute of Research for Development (IRD), Montpellier (France).

## 2.2. Molecular analysis

Twenty-four dried adult mosquitoes were each separated into two parts: (1) head-thorax, with their appendages, and (2) the abdomen. Genomic DNA was extracted from head-thorax samples using the Qiagen DNeasy Kit (Qiagen Ltd., Sussex, England). The manufacturer's protocol was followed to obtain a final volume of 50  $\mu$ L. Abdomens were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and used for DNA extraction if needed.

The *D3* fragment of ribosomal DNA was amplified using the pair of primers of Sharpe et al. (2000). The pair of primers described in Simon et al. (1994) was used to amplify the *COI* sequences, and two other mitochondrial genes, *COII* and *Cyt-b*, were amplified using the primers of Yang et al. (2011).

Standard protocols were used for all PCR amplifications. Each 50  $\mu$ L PCR reaction contained 5  $\mu$ L of 1X AccuPrime *Pfx* reaction mix, 1.5  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ L of AccuPrime *Pfx* DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu$ L), and 4  $\mu$ L of template DNA. Thermal cycling conditions consisted of an initial denaturation step at  $95^{\circ}\text{C}$  for 2 min, then 40 cycles each consisting of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s, annealing at  $50^{\circ}\text{C}$  for *COI*, *COII*, and *Cyt-b* and  $63^{\circ}\text{C}$  for *D3* for 30 s, and extension at  $68^{\circ}\text{C}$  for 45 s with final extension at  $68^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The PCR products were kept at  $4^{\circ}\text{C}$  and checked by electrophoresis in 1.5% agarose gels, containing gel red 1 $\times$  at final concentration. Successfully amplified products were purified using the NucleoSpin DNA purification kit (Macherey Nalgen, Germany). Direct sequencing of the products in both directions was done with an ABI 377 automated sequencer (PE Applied BioSystems, Warrington, England).

## 2.3. Phylogenetic analysis

Each gene was analyzed separately using both maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BP) methods. Sequences were aligned using ClustalW. The ML analyses were carried out with MEGA version 5 (Tamura et al., 2011), incorporating best fit models of sequence evolution determined using the Akaike Information Criterion and employing 1000 bootstrap replications to determine node reliabilities. Summary sequence statistics were generated using MEGA version 5. Bayesian analyses were performed using MrBayes with the following settings: the ML model employed two substitution types ("nst-2"), with rate variation across sites modelled using a gamma distribution (rates = "gamma"); Markov Chain Monte Carlo searches were done with four chains for 500,000 generations, with trees sampled every 100 generations (the first 1000 trees were discarded as "burnin"). *Anopheles minimus* and *Anopheles dirus* from the same collection sites in Vietnam were used as outgroup taxa. Estimates of average evolutionary divergence over sequence pairs within and between groups were made using the Maximum Composite Likelihood model for the *COI* sequences.

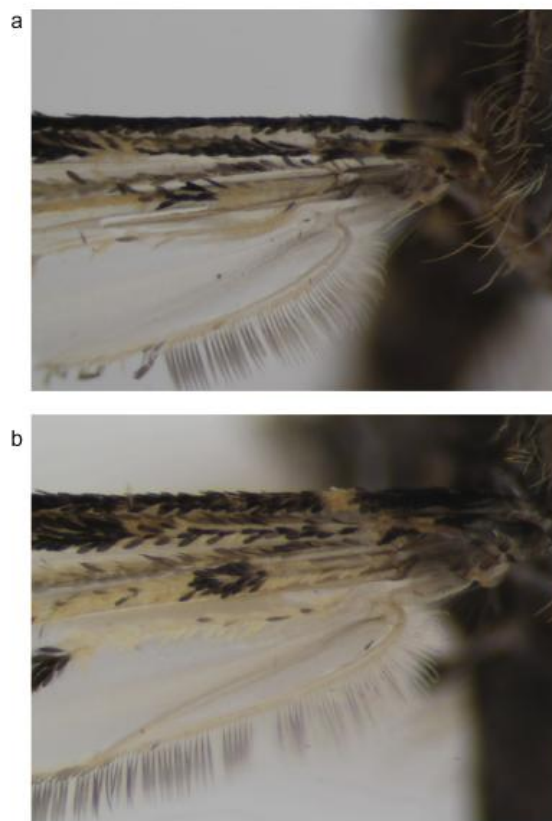


Fig. 2. Base of costa of *Anopheles* specimens: (a) entirely dark-scaled; (b) with humeral pale spot.

## 3. Results

### 3.1. Morphological data

Using the keys of NIMPE (2008) and Harrison and Scanlon (1975), 26 adult female mosquitoes were identified as one or other of two groups: group 1 with 19 specimens identified as *An. crawfordi* and group 2 with seven specimens identified as *An. dangi*. Specimens of both groups exhibit the diagnostic features of the Hyrcanus Group (Harrison and Scanlon, 1975) and the following key characters: costa divided by pale spots into fewer than four dark areas; anteprenotal scales present; maxillary palpi with pale bands; humeral crossvein bare or with few grey scales (no black scales); costa without presector pale spot; no pale scales between subcostal and preapical pale spots on vein R1; apical fringe spot beginning at vein R2 and extending to a point beyond vein R4+5; postbasal dark spot on vein CuP shorter than basal pale spot, separated by own length or more from dark spot on middle of anal vein; hindfemur without subapical pale band and apical scale-tuft; hindtarsi with only apical pale bands; sternum VII with tuft of black scales (Harrison and Scanlon, 1975; IMPE, 1987; NIMPE, 2008).

Members of group 2 differed from those of group 1 only by the presence of a humeral pale spot (Fig. 2). This difference is only used in the Vietnamese keys (Fig. 1) (IMPE, 1987; NIMPE, 2008). Harrison and Scanlon (1975) noted that the basal third of the costa is

**Table 2**

GenBank accession numbers for the specimens analyzed during the study (see Table 1 for species and group affiliations).

Specimen no.	COI	COII	D3	Cyt-b
130	KF431861	KF431885	KF431915	KF431906
266	KF431862	KF431886	KF431916	–
283	KF431863	KF431887	KF431917	KF431907
285	KF431864	KF431888	KF431918	–
286	KF431865	KF431889	KF431919	KF431908
290	KF431866	KF431890	KF431920	KF431909
1.2	KF431867	KF431891	KF431921	–
3.6	KF431868	KF431892	KF431922	KF431910
165	KF431869	KF431893	KF431923	–
261	KF431870	KF431894	KF431924	–
262	KF431871	KF431895	KF431925	KF431911
263	KF431872	–	KF431926	–
269	KF431873	KF431896	KF431927	–
280	KF431874	KF431897	KF431928	KF431912
281	KF431875	–	KF431929	–
282	KF431876	–	KF431930	–
284	KF431877	KF431898	KF431931	–
289	KF431878	KF431899	KF431932	–
3.4	KF431879	KF431900	KF431933	–
295	KF431880	KF431901	KF431934	–
302	KF431881	KF431902	KF431935	–
303	KF431882	KF431903	KF431936	–
MA	KF431883	KF431904	KF431937	KF431913
DA	KF431884	KF431905	KF431938	KF431914

MA, *Anopheles mnimus*; DA, *Anopheles ditrus*.

usually entirely dark-scaled, but the “humeral area may have a small humeral spot or 1–3 pale scales on one wing”.

### 3.2. Molecular phylogeny

DNA was extracted and amplified from 24 specimens. *COI* and *D3* sequences were obtained from 22 of the specimens, *COII* from 19 and *Cyt-b* from seven. The GenBank accession numbers for the sequences are listed in Table 2, including those of two specimens of each outgroup species.

Sequences aligned for analysis included a 501-bp fragment of the *COI* locus, 788 bp of the *COII* gene, 398 bp of *D3*, and 508 bp of *Cyt-b*. The mean genetic distance was estimated at 0.004 for group 1 (*An. crawfordi*) and 0.008 for group 2 (*An. dangi*). The mean distance between the two groups was 0.006 compared to 0.077 for any group versus the outgroup taxa. The optimal models of nucleotide evolution inferred at each gene and used in the ML analyses are recorded in Table 3. In all phylogenies, regardless of gene and method of reconstruction (data not shown for *D3*, *COII*, and *Cyt-b*), specimens from the two groups clustered in a single strongly supported clade (Fig. 3).

## 4. Discussion

Intraspecific variation of morphological characters within *Anopheles* species is common and results in misidentifications that may jeopardize vector control programmes. The wing markings provide important characters for anopheline identification, but they are highly variable in some groups. Consequently, identifiers should anticipate intraspecific variation when attempting to identify specimens to species (Harrison and Scanlon, 1975).

The effect of environmental conditions on the expression of morphological characters observed in *Anopheles* mosquitoes has been suggested by several authors. Le Sueur and Sharp (1991) and Le Sueur et al. (1992), working on *Anopheles merus* of the Gambiae Complex in Africa, concluded that melanism was correlated with season, with darker specimens being more dominant during colder months. Similarly, *An. minimus* of the Funestus Group exhibits an increase of hypermelanic traits at more northerly

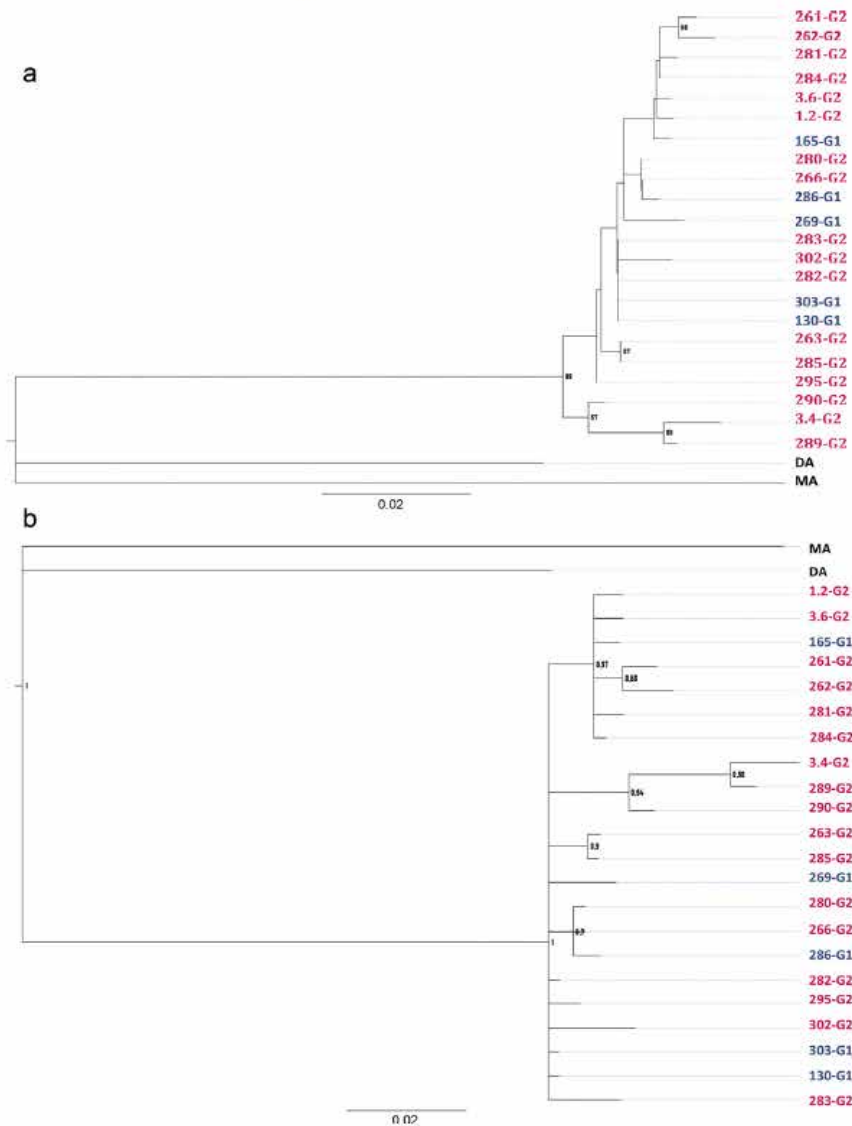
**Table 3**

Summary of optimal nucleotide substitution models and rates estimated at *COI*, *COII*, *Cyt-b*, and *D3* alignment for sequences and outgroup sequences.

		COI	COII	Cyt-b	D3
Model		T92+G	TN93+I	HKY+G	T92+I
Base frequencies	A	0.332	0.357	0.320	0.200
	C	0.168	0.143	0.184	0.300
	G	0.168	0.122	0.114	0.300
	T	0.332	0.377	0.382	0.200
	+I	NA	0.64	NA	0.51
	+G	0.20	NA	1.09	NA
Rates of base substitution	AT	0.062	0.055	0.071	0.041
	AC	0.031	0.021	0.034	0.062
	AG	0.105	0.032	0.071	0.176
	TA	0.062	0.052	0.060	0.041
	TC	0.105	0.160	0.115	0.176
	TG	0.031	0.018	0.021	0.062
	CA	0.062	0.052	0.060	0.041
	CT	0.208	0.422	0.239	0.118
	CG	0.031	0.018	0.021	0.062
	GA	0.208	0.095	0.201	0.118
GT	0.062	0.055	0.071	0.041	
GC	0.031	0.021	0.034	0.062	

latitudes (Harrison, 1980; Singh et al., 2010). The occurrence of certain morphotypes within species of the Minimus Complex in relation to wet and cool dry seasons was noted by Harrison (1980), Van Bortel et al. (1999), and Singh et al. (2010). Sungvornyothin et al. (2006) concluded that variation makes patterns of wing spots unreliable and/or unsuitable as diagnostic characters for distinguishing *An. minimus* and *Anopheles harrisoni*, which are principle malaria vectors in Southeast Asia. On a wider geographic scale, identification of *An. minimus* is complicated by the existence of morphological variants that share characters with *Anopheles fluviatilis*, another major malaria vector, as well as with *Anopheles varuna* and *Anopheles aconitus* (Harrison, 1980). As a consequence, *An. minimus* has often been misidentified as *An. fluviatilis* (Chen et al., 2002; Harrison, 1980; Singh et al., 2010). Wing fringe spots are key characters used to distinguish members of the Barbirostris Subgroup of subgenus *Anopheles*, but in other species such characters sometimes exhibit seasonal variation (Hwang et al., 2004) or are otherwise unreliable for species identification (Beebe et al., 2001). Similarly, variation in the pattern of dark scaling on the wings, a character previously used to differentiate *Anopheles pullus* and *Anopheles yatsushiroensis* (now considered to be a synonym of *An. pullus*) in Korea, was attributed to seasonal variation (Park et al., 2003). Ayala et al. (2011) recently showed that changes in morphometric traits are under natural selection and contribute to local adaptation in *Anopheles funestus* populations in Cameroon. The same has been shown to affect hindtarsal markings in *Anopheles darlingi*, the principle malaria vector in Latin America (Harbach et al., 1993). Aside from environmental and genetic effects on morphological expression, the loss or effacement of characters that are crucial for an accurate identification is likely to result in the misidentification of specimens, especially those of closely related species that exhibit overlapping features and are otherwise extremely similar in overall habitus (Paredes-Esquivel et al., 2009). Therefore, one could estimate the overall phenotypic variation covering the geographic distribution as well as seasonal dynamics when assessing the validity of a key character.

The internal classification of the Hyrcanus Group is problematic because it includes species with highly variable morphological characters that are shared by closely related species (Hwang, 2007; Ma and Xu, 2005). Reid (1953) noted that adults of *Anopheles sineroides* have two pale marks towards the base of the costa that are rarely present in other members of the group, the outer clypeal setae (seta 2-C) of the larva have fewer branches (8–25) than usual



**Fig. 3.** Phylogenetic trees reconstructed for *COI* sequences using (a) Maximum Likelihood (ML) and (b) Bayesian phylogenetic (BP). ML phylogram from *COI* sequences. Terminal labels indicate specimen codes. Scale bar–0.02 substitution per site. Node values indicate bootstrap support ( $N=500$  replications). MrBayes 50% majority rule consensus tree inferred from *COI*. Terminal labels indicate specimen codes (blue for group 1, pink for group 2). Scale bar–0.02 substitution per site. Node values indicate Bayesian posterior probabilities estimated from 3751 samples trees. Outgroups: DA, *Anopheles dirus*; MA, *Anopheles minimus*. (For interpretation of the references to color in this text, the reader is referred to the web version of the article.)

(30–90) and the leaflets of the male aedeagus are equally long and not separated. *Anopheles belenrae* and *Anopheles kleini* were only recently recognized and distinguished from the closely related *An. sinensis* (Li et al., 2005; Rueda, 2005). In a study of the Barbirostris Group, Paredes-Esquivel et al. (2009) found that field workers had misidentified mosquitoes of the Hyrcanus Group as *Anopheles barbirostris*. This discrepancy came to light only after analyzing sequences of the *COI* and *ITS2* loci, and subsequent re-examination of specimens revealed the presence of patches of dark scales on either side of the clypeus, an important diagnostic feature of the

Hyrcanus Group (Harrison and Scanlon, 1975). *Anopheles anthropophagus*, considered to be an important malaria vector in China, was found to be genetically indistinguishable from *Anopheles lesteri* and is now recognized as a junior synonym of that species (Hwang et al., 2006; Wilkerson et al., 2003). More recently, Taai et al. (2013) showed that *Anopheles paraliae* is also probably conspecific with *An. lesteri* based on low variation of *ITS2*, *COI*, and *COII* sequences and genetic compatibility in crossing-mating experiments. Gao et al. (2004) concluded that species of the Hyrcanus Group have been described as new species in China without considering

previously described species only known at the time to occur in other countries. Thus, Gao confirmed that the identities of some nominal species will never be fully resolved for this group until morphological and molecular approaches are used in combination. *Anopheles belemrae* and *Anopheles kleini* (Rueda, 2005) are morphologically similar to *An. sinensis*, but their *ITS2* sequences unambiguously distinguish them from that species and from each other (Li et al., 2005). Djajid et al. (2009) distinguished a potentially new species of the Hyrcanus Group in Iran, informally referred to as *An. hyrcanus* sp<sub>IR</sub>, based on differences in the *ITS2* sequence. How many species comprise the Hyrcanus Group is not solely a question of scientific interest since their recognition and identification have important implications for the control of malaria and lymphatic filariasis (Manguin et al., 2010; Rueda et al., 2006, 2007; Sen, 1956; Simpson, 1951).

Reid (1953) and Harrison and Scanlon (1975) noted that specimens of *An. crawfordi* occasionally exhibit two or three pale scales or a distinct humeral pale spot on the costa, usually on one wing and particularly in males. Vietnamese entomologists applied the name *An. dangi* to specimens that only differed from typical specimens of *An. crawfordi* in having a humeral pale spot on one or both wings (NIMPE, 2008). The aim of this study was to assess the validity of *An. dangi* as defined in the Vietnamese identification keys compared to the previously established *An. crawfordi*. As observed by Reid (1953) and Harrison and Scanlon (1975), our results confirm that a humeral pale spot, sometimes represented by only a few pale scales, is occasionally present in *An. crawfordi*. Specimens of groups 1 and 2 yielded essentially identical *D3*, *COI*, *COII*, and *Cyt-b* sequences (range of variation 0–0.6%). Based on a similar range of variation (0–0.8%), the nominal *An. yatsushiroensis* was formally recognized as a junior synonym of *An. pullus* (Park et al., 2003). Likewise, based on the results of the present study, *An. dangi* is merely a morphological variant of *An. crawfordi* and is hereby deemed to be a synonym of that nominal species. In view of the findings reported here, and the studies that led to the synonymies of *An. anthropophagus* with *An. lesteri* (Wilkerson et al., 2003) and *An. yatsushiroensis* with *An. pullus* (Park et al., 2003), a thorough revision of the entire Hyrcanus Group based on an integrated morphological and molecular approach should be done.

#### Acknowledgements

We express gratitude to the staff of the Department of Parasitology and Entomology of the Military Preventive Medicine Centre, Ho Chi Minh City, Vietnam, for organizing and participating in the field work. NCT gratefully acknowledges C. Lorna Culverwell for assistance provided during her work at the NHM. The field work was funded by the Direction de la Coopération de Sécurité et de Défense – Ministry of Foreign Affairs. We are grateful to the personnel of the military Mission, especially the Defence Attaché of the French Embassy in Vietnam, for logistical and administrative assistance. This study was made possible through a PhD allowance provided to the first author by IRD, Marseille, France.

#### References

- Ayala, D., Caro-Riano, H., Dujardin, J.P., Rahola, N., Simard, F., Fontenille, D., 2011. Chromosomal and environmental determinants of morphometric variation in natural populations of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon. *Infect. Genet. Evol.* 11, 940–947.
- Beebe, N.W., Maung, J., Van den Hurk, A.F., Ellis, J.T., Cooper, R.D., 2001. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and Papua New Guinea. *Insect Mol. Biol.* 10, 407–413.
- Besansky, N.J., Powell, J.R., Caccone, A., Hamm, D.M., Scott, J.A., Collins, F.H., 1994. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 6885–6888.
- Chen, B., Harbach, R.E., Butlin, R.K., 2002. Molecular and morphological studies on the *Anopheles minimus* group of mosquitoes in southern China: taxonomic review, distribution and malaria vector status. *Med. Vet. Entomol.* 16, 253–265.
- Djajid, N.D., Jazayeri, H., Gholizadeh, S., Rad Sh, P., Zakeri, S., 2009. First record of a new member of *Anopheles Hyrcanus* Group from Iran: molecular identification, diagnosis, phylogeny, status of *kdr* resistance and *Plasmodium* infection. *J. Med. Entomol.* 46, 1084–1093.
- Do, M.C., Beebe, N.W., Van, V.N., Quang, T.L., Lein, C.T., Nguyen, D.V., Xuan, T.N., Ngoc, A.L., Cooper, R.D., 2010. Vectors and malaria transmission in deforested, rural communities in north-central Vietnam. *Malar. J.* 9, 1–12.
- Dusfour, I., Linton, Y.M., Cohuet, A., Harbach, R.E., Baimai, V., Trung, H.D., Seng, C.M., Matusop, A., Manguin, S., 2004. Molecular evidence of speciation between island and continental populations of *Anopheles (Cellia) sondaicus* (Diptera: Culicidae), a principal malaria vector taxon in Southeast Asia. *J. Med. Entomol.* 41, 287–295.
- Gao, Q., Beebe, N.W., Cooper, R.D., 2004. Molecular identification of the malaria vectors *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in central China using polymerase chain reaction and appraisal of their position within the Hyrcanus Group. *J. Med. Entomol.* 41, 5–11.
- Garros, C., Harbach, R.E., Manguin, S., 2005. Morphological assessment and molecular phylogenetics of the *Funestus* and *Minimus* Groups of *Anopheles (Cellia)*. *J. Med. Entomol.* 42, 522–536.
- Harbach, R.E., 2013. *Anopheles* Classification. Mosquito Taxonomic Inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/Itemtanophelesstemtclassification> (accessed 1.09.13).
- Harbach, R.E., Roberts, D.R., Manguin, S., 1993. Variation in the hindtarsal markings of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in Belize. *Mosq. Syst.* 25, 192–197.
- Harrison, B.A., 1980. Medical entomology studies – XIII. The *Myzomyia* Series of *Anopheles (Cellia)* in Thailand, with emphasis on intra-specific variations (Diptera: Culicidae). *Contr. Am. Entomol. Inst.* 17 (4), iv + 1–195.
- Harrison, B.A., Scanlon, J.E., 1975. Medical entomology studies – II. The subgenus *Anopheles* in Thailand (Diptera: Culicidae). *Contr. Am. Entomol. Inst.* 12 (1), iv + 1–307.
- Hwang, U.W., 2007. Revisited *ITS2* phylogeny of *Anopheles (Anopheles) Hyrcanus* [sic] group mosquitoes: reexamination of unidentified and misidentified *ITS2* sequences. *Parasitol. Res.* 101, 885–892.
- Hwang, U.W., Yong, T.S., Ree, H.I., 2004. Molecular evidence for synonymy of *Anopheles yatsushiroensis* and *An. pullus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20, 99–104.
- Hwang, U.W., Tang, L.H., Kobayashi, M., Yong, T.S., Ree, H.I., 2006. Molecular evidence support that *Anopheles anthropophagus* from China and *Anopheles lesteri* from Japan are the same species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 324–329.
- IMPE (Institute of Malariology, Parasitology and Entomology), 1987. Keys to the *Anopheles* in Vietnam (adults–pupae–larvae). Department of Entomology, Institute of Malariology, Parasitology and Entomology, Hanoi, pp. 64 (in Vietnamese).
- International Code of Zoological Nomenclature, 1985. third ed. International Trust for Zoological Nomenclature, London, p. xx + 338.
- Kim, H.C., Klein, T.A., Lee, W.J., Collier, B.W., Chong, S.T., Sames, W.J., Lee, I.Y., Lee, Y.J., Lee, D.K., 2007. Mosquito species distribution and larval breeding habitats with taxonomic identification of Anopheline mosquitoes in Korea. *Entomol. Res.* 37, 29–35.
- Le Sueur, D., Sharp, B.L., 1991. Temperature-dependent variation in *Anopheles merus* larval head capsule width and adult wing length: implications for anopheline taxonomy. *Med. Vet. Entomol.* 5, 55–62.
- Le Sueur, D., Sharp, B.L., Appleton, C.C., 1992. Dark-scaled areas on adult *Anopheles* mosquitoes are selectively affected by temperature-related size variation. *Med. Vet. Entomol.* 6, 369–372.
- Li, C., Lee, J.S., Groebner, J.L., Kim, H.C., Klein, T.A., O'Guinn, M.L., Wilkerson, R.C., 2005. A newly recognized species in the *Anopheles Hyrcanus* Group and molecular identification of related species from the Republic of South Korea (Diptera: Culicidae). *Zootaxa* 939, 1–8.
- Ma, Y., Xu, J., 2005. The Hyrcanus Group of *Anopheles (Anopheles)* in China (Diptera: Culicidae): species discrimination and phylogenetic relationships inferred by ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 sequences. *J. Med. Entomol.* 42, 610–619.
- Manguin, S., Carnevale, P., Mouchet, J., Coosemans, M., Julvez, J., Richard-Lenoble, D., Sircoulon, L., 2008. Biodiversity of Malaria in the World. John Libbey Eurotext Montrouge, France, pp. 428.
- Manguin, S., Bangs, M.J., Pothikakorn, J., Chareonviriyaphap, T., 2010. Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infect. Evol.* 10, 159–177.
- Nguyen, T.A., 1993. Malaria in Vietnam. Environment, prevention and treatment. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 86, 494–499.
- Nguyen, D.M., Tran, D.H., Harbach, R.E., Elphick, J., Linton, Y.M., 2000. A new species of the Hyrcanus Group of *Anopheles*, subgenus *Anopheles*, a secondary vector of malaria in coastal areas of southern Vietnam. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 16, 189–198.
- NIMPE (National Institute of Malariology, Parasitology and Entomology), 2008. Keys to identify the *Anopheles* mosquitoes (Adults–Pupae–Larvae). Department of Entomology, Institute of Malariology, Parasitology and Entomology, Hanoi.
- Oh, S.S., Hur, M.J., Joo, G.S., Kim, S.T., Go, J.M., Kim, Y.H., Lee, W.G., Shin, E.H., 2010. Malaria vector surveillance in Ganghwa-do, a malaria-endemic area in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 48, 35–41.
- Paredes-Esquivel, C., Donnelly, M.J., Harbach, R.E., Townson, H., 2009. A molecular phylogeny of mosquitoes in the *Anopheles barbitrostris* Subgroup reveals cryptic species: implications for identification of disease vectors. *Mol. Phylogenet. Evol.* 50, 141–151.
- Paredes-Esquivel, C., Harbach, R.E., Townson, H., 2011. Molecular taxonomy of members of the *Anopheles hyrcanus* group from Thailand and Indonesia. *Med. Vet. Entomol.* 25, 348–352.

- Park, S.J., Choochote, W., Jitpakdi, A., Junkum, A., Kim, S.J., Jariyapan, N., Park, J.W., Min, G.S., 2003. Evidence for a conspecific relationship between two morphologically and cytologically different forms of Korean *Anopheles pullus* mosquito. *Mol. Cells* 16, 354–360.
- Ponçon, N., Balenghien, T., Toty, C., Baptiste Ferre, J., Thomas, C., Dervieux, A., L'Ambert, G., Schaffner, F., Bardin, O., Fontenille, D., 2007a. Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1810–1814.
- Ponçon, N., Toty, C., L'Ambert, G., Le Goff, G., Brengues, C., Schaffner, F., Fontenille, D., 2007b. Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malar. J.* 6, 1–18.
- Ponçon, N., Toty, C., Kengne, P., Alten, B., Fontenille, D., 2008. Molecular evidence for similarity between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae), sympatric potential vectors of malaria in France. *J. Med. Entomol.* 45, 576–580.
- Prakash, A., Bhattacharyya, D.R., Mohapatra, P.K., Mahanta, J., 2004. Role of the prevalent *Anopheles* species in the transmission of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in Assam state, north-eastern India. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98, 559–568.
- Ree, H.L., Yong, T.S., Hwang, U.W., 2005. Identification of four species of the *Anopheles hyrcanus* complex (Diptera: Culicidae) found in Korea using species-specific primers for Polymerase Chain Reaction Assay. *Med. Entomol. Zool.* 56, 201–205.
- Reid, J.A., 1953. The *Anopheles hyrcanus* Group in South-East Asia (Diptera Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 44, 5–76.
- Rueda, L.M., 2005. Two new species of *Anopheles* (*Anopheles*) *Hyrcaus* Group (Diptera: Culicidae) from the Republic of South Korea. *Zootaxa* 941, 1–26.
- Rueda, L.M., Kim, H.C., Klein, T.A., Pecor, J.E., Li, C., Sithiprasasna, R., Debboun, M., Wilkerson, R.C., 2006. Distribution and larval habitat characteristics of *Anopheles Hyrcanus* Group and related mosquito species (Diptera: Culicidae) in South Korea. *J. Vector Ecol.* 31, 198–205.
- Rueda, L.M., Zhao, T., Ma, Y., Gao, Q., Ding, Z.G., Khuntirat, B., Sattabongkot Wilkerson, R.C., 2007. Updated distribution records of the *Anopheles* (*Anopheles*) *hyrcanus* species-group (Diptera: Culicidae) in China. *Zootaxa* 1407, 43–55.
- 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.
- Sen, P., 1956. *Anopheles hyrcanus* as a vector of filariasis in West Bengal. *Nature* 178–750, 749–750.
- Sharpe, R.G., Harbach, R.E., Butlin, R.K., 2000. Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus Group of *Anopheles* subgenus *Celia* (Diptera Culicidae). *Syst. Entomol.* 25, 263–272.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Luitz, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved of polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 251–285.
- Simpson, T.W., 1951. A note on filariasis among the natives of Okinawa, with particular reference to possible transmission of *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles hyrcanus sinensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 614–616.
- Singh, O.P., Nanda, N., Dev, V., Bali, P., Sohail, M., Mehrunnisa, A., Adak, T., Dash, A.P., 2010. Molecular evidence of misidentification of *Anopheles minimus* as *Anopheles fluviatilis* in Assam (India). *Acta Trop.* 113, 241–244.
- Sungvornyothin, S., Garros, C., Chareonviriyaphap, T., Manguin, S., 2006. How reliable is the humeral pale spot for identification of cryptic species of the Minimus Complex? *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 185–191.
- Taai, K., Baimai, V., Saeung, A., Thongsahuan, S., Min, G.-S., Otsuka, Y., Park, M.-H., Fukuda, M., Somboon, P., Choochote, W., 2013. Genetic compatibility between *Anopheles lesteri* from Korea and *Anopheles paratatae* from Thailand. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 312–320.
- Takano, K.T., Nguyen, N.T., Nguyen, B.T., Sunahara, T., Yasunami, M., Nguyen, M.D., Takagi, M., 2010. Partial mitochondrial DNA sequences suggest the existence of a cryptic species within the Leucosphyrus Group of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae), forest malaria vectors, in northern Vietnam. *Parasit. Vectors* 3, 1–16.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Van Bortel, W., Trung, H.D., Manh, N.D., Roelants, P., Verle, P., Coosemans, M., 1999. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. *Trop. Med. Int. Health* 4, 257–265.
- Wilkerson, R.C., Li, C., Rueda, L.M., Kim, H.C., Klein, T.A., Song, G.H., Strickman, D., 2003. Molecular confirmation of *Anopheles* (*Anopheles*) *lesteri* from the Republic of South Korea and its genetic identity with *An. (anthropophagus) anthropophagus* from China (Diptera: Culicidae). *Zootaxa* 378, 1–14.
- Yang, M., Ma, Y., Wu, J., 2011. Mitochondrial genetic differentiation across populations of the malaria vector *Anopheles lesteri* from China (Diptera: Culicidae). *Malar. J.* 10, 216–224.

### **III. Diversité anophélienne dans les Provinces de Dak Nong et Binh Phuoc et capacité vectorielle des espèces**

Pour atteindre la phase d'élimination du paludisme et des filarioses lymphatiques (FL), des outils de diagnostic plus sensibles et de nouvelles stratégies doivent être utilisés afin de détecter avec succès les foyers résiduels de faible transmission [118] et mieux cibler les efforts de contrôle de ces maladies. Les campagnes d'administration massive de médicaments pour lutter contre les FL sont une stratégie efficace de contrôle de ces maladies. De même, la réduction du contact homme-moustique reste l'intervention standard pour interrompre la transmission de microfilaires, mais aussi de *Plasmodium*. En l'absence de vaccin efficace contre le paludisme, voie de recherche qui demeure essentielle et chargée de beaucoup d'espoir [119], la stratégie de lutte antivectorielle pour réduire le nombre de vecteurs potentiels reste une voie majeure dans le contrôle de cette maladie.

La présence d'espèces jumelles dans le genre *Anopheles* pose des problèmes importants d'identification qui peut entraîner des estimations erronées du rôle vectoriel de l'anophèle concerné lorsque l'espèce n'est pas correctement identifiée et rendre obsolète tout programme de lutte antivectorielle. Comme la biodiversité des espèces d'*Anopheles* au Vietnam est importante et que cette faune comprend un grand nombre d'espèces jumelles [4,120] et d'espèces génétiquement proches [79,121], une approche fiable et robuste pour identifier les espèces impliquées dans la transmission de parasites était essentielle pour mieux appréhender les vecteurs et maximiser l'efficacité des programmes de lutte antivectorielle. Afin de pallier ce problème, des méthodes moléculaires ont été développées pour identifier les espèces jumelles appartenant aux complexes et groupes d'Asie du Sud-est, en particulier des PCR allèle-spécifique qui permettent de distinguer les espèces du Complexe Minimus par Garros et al. [121,122], Phuc et al. [100]; du Complexe Dirus par Walton et al. [123], Manguin et al. [124] ; et du Groupe Maculatus par Walton et al. [125].

Après l'identification exacte des espèces d'anophèle, il faut évaluer le rôle vectoriel de chaque espèce dans la transmission de parasites. La méthode traditionnelle reste la dissection des anophèles femelles et l'observation des larves de stade 3 (L3) de *Wuchereria bancrofti* au niveau du labium du moustique ou des sporozoïtes dans les glandes salivaires pour les *Plasmodium* spp. Mais cette technique prend du temps, nécessite du personnel qualifié et ne permet pas de différencier les espèces de *Plasmodium* dans l'échantillon. L'élaboration



d'approches plus rapides et précises de type immunologique et moléculaire, tels que le test ELISA de détection de l'antigène circumsporozoïtique (ELISA-CSP : enzyme linked immuno-sorbent assay - circumsporozoite protein) [126] et les méthodes basées sur l'amplification de séquences spécifiques par PCR [127-133] sont maintenant largement appliquées. Cependant, un manque de spécificité de la technique ELISA-CSP a été soulevé en révélant plusieurs réactions croisées [133-136] et une augmentation des faux-positifs ce qui a pour conséquence de surestimer de façon considérable le taux d'infection entomologique (EIR), particulièrement pour *P. falciparum* et pour les espèces zoophiles [136]. La PCR en temps réel (rtPCR), qui permet une détection rapide et simultanée de plusieurs espèces de *Plasmodium*, ainsi que la quantification de séquences d'ADN ciblées chez l'homme grâce à l'utilisation des sondes spécifiques marquées au fluorophore [137-139], est aussi considérée comme une méthode de haute sensibilité et spécificité pour la détection des parasites chez les anophèles [127,130,131]. En outre, la rtPCR nécessite qu'une petite quantité d'ADN, ce qui permet d'identifier à la fois plusieurs espèces de parasites, le reste de l'ADN extrait peut ainsi servir aux autres analyses (identification des espèces d'anophèle par exemple).

Dans le cadre de cette thèse, différentes techniques moléculaires ont été employées pour évaluer la biodiversité anophélienne des Provinces de Dak Nong et Binh Phuoc (centre-sud Vietnam) (Figures 6 et 7), ainsi que la capacité vectorielle de ces espèces d'*Anopheles* dans la co-transmission de *Plasmodium* spp. et *Wuchereria bancrofti*.

En 2010 et 2011, 2 campagnes d'échantillonnage ont été réalisées dans la période de Novembre-Décembre respectivement dans la Province de Dak Nong, puis de Binh Phuoc. Un total de 797 *Anopheles* femelles a été collecté en utilisant plusieurs méthodes, dont la capture sur homme, sur appât bovin, par piègeage lumineux et collecte de la faune résiduelle. Les spécimens d'*Anopheles* collectés ont été identifiés morphologiquement sur le terrain en utilisant les clés d'identification des anophèles femelles du Vietnam [116]. Puis chaque spécimen a été coupé en deux parties : (1) tête, thorax, ailes et pattes, et (2) abdomen ; chaque partie a été conservée dans un tube en plastique à -20°C au Vietnam, puis transporté en carboglace jusqu'au laboratoire de l'IRD, Montpellier (France) où les échantillons ont été conservés à -80°C avant d'être analysés.

L'ADN de la partie (1) tête-thorax-ailes-pattes de chaque spécimen a subi une extraction, puis plusieurs techniques de PCR ont été effectuées, dont les tests de PCR allèle-spécifique pour l'identification des espèces des Complexes Dirus [123], Minimus [122] et du Groupe Maculatus [125]. Les sondes Taqman marquées aux fluorophores spécifiques ont été définies pour des rtPCR multiplexes qui permettent de détecter à la fois deux parasites, soit

*Plasmodium falciparum* et *P. knowlesi*, soit *P. vivax* et *Wuchereria bancrofti*. Les sondes et les amorces utilisées ont été publiées par Rao et al. [130,131] et Divis et al. [139]. Toutes les rtPCR ont été effectuées sur un LightCycler 480 (Roche Applied Science. Penzberg, Germany).

Les résultats obtenus ont montré une grande biodiversité de la faune anophélienne dans les Provinces de Dak Nong et de Binh Phuoc avec la présence de 24 espèces d'*Anopheles*. Les espèces communes aux 2 provinces étaient *An. barbumbrosus*, *An. dirus*, *An. kochi*, *An. maculatus*, *An. nitidus*, *An. philippinensis*, *An. sawadwongporni* et *An. subpictus*, alors que celles propres à la Province de Dak Nong appartenaient à *An. asiaticus*, *An. campestris*, *An. crawfordi*, *An. gigas*, *An. tessellatus*, *An. umbrosus* et *An. vagus* ; et celles collectées qu'à Binh Phuoc étaient *An. aconitus*, *An. barbirostris*, *An. indefinitus*, *An. jeyporiensis*, *An. karwari*, *An. minimus*, *An. pampanai*, *An. rampae*, et *An. scanloni*. Le principal vecteur d'agents du paludisme, *An. dirus*, était présent dans les deux provinces, et l'espèce était dominante dans la Province de Binh Phuoc (74,3%), associée à un autre vecteur majeur *An. minimus*. Dans la Province de Dak Nong, *An. maculatus* était l'espèce dominante (48,7%). Ce travail représente le premier rapport montrant la présence d'une espèce nouvelle au Vietnam, *An. scanloni*, espèce appartenant au Complexe Dirus (espèce C). La distribution de cette espèce est actuellement localisée du sud de la Birmanie (Myanmar) au sud de la Thaïlande [4]. La présence d'*An. scanloni* au centre-sud Vietnam représente donc une extension considérable à l'est de l'aire de distribution de cette espèce en Asie du Sud-est.

Aucun moustique infecté par *Plasmodium falciparum*, *P. knowlesi* et *Wuchereria bancrofti* n'a été détecté sur 765 échantillons analysés. Un spécimen sur 361 *An dirus* (0,26 %) et un sur 5 *An. pampanai* (20 %) ont été trouvés infectés par *P. vivax*, ce qui porte le taux d'infection sur le total des échantillons de la Province de Binh Phuoc à 0,41% (2/486). Aucun spécimen de la Province de Dak Nong sur un total de 308 n'était infecté. Un complément d'étude sur un échantillonnage plus important devra être effectué pour mieux évaluer les capacités vectorielles des différentes espèces d'*Anopheles* impliquées dans la transmission du paludisme dans ces provinces du centre-sud Vietnam encore peu étudiées.

**Figure 6:**

Sites de collection dans la Province de Dak Nong. A, B, C – Villages et maisons à côté de plantations de manioc, forêt d'hévéa (caoutchouc) et autre type de forêts. D – Maison entourée par une plantation de noix de cajou où *Anopheles maculatus* est l'espèce dominante.



**Figure 7:** Sites de collection dans la Province de Binh Phuoc. A – Maison en bois entre la forêt et la route bétonnée. B – Ruisseau à côté du site de collecte d'*Anopheles minimus* et *An. dirus*. C – Containeurs d'eau oubliés dans la forêt, gîte larvaire d'*Anopheles dirus*.



**Article 2:** Diversity of *Anopheles* mosquitoes in Binh Phuoc and Dak Nong Provinces – Vietnam, their implication in the co-transmission of *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti*. (Ngo et al. en preparation)

Résumé de l'article 2:

Le paludisme est un problème de santé publique à Dak Nong et Binh Phuoc, deux provinces voisines au centre-sud du Vietnam qui se trouvent à la frontière avec le Cambodge. Plusieurs espèces d'anophèles impliquées dans la transmission de *Plasmodium* spp. peuvent transmettre également *Wuchereria bancrofti*, le nématode responsable de la filariose lymphatique de Bancroft. Mais les connaissances sur la faune anophélienne et sur le rôle des espèces d'*Anopheles*, impliquées dans la co-transmission de ces deux types de parasites dans les Provinces de Dak Nong et Binh Phuoc, restent limitées.

Les populations d'*Anopheles* ont été collectées dans les Provinces de Dak Nong et de Binh Phuoc deux années successives, en Novembre et Décembre 2010 et 2011, grâce à plusieurs méthodes de capture sur homme et sur appât bovin, par piégeage lumineux et collectes de la faune résiduelle à l'aide d'un aspirateur à bouche. L'identification morphologique et le typage moléculaire utilisant plusieurs techniques de PCR ont été appliquées pour identifier les espèces d'anophèles appartenant aux complexes et groupe d'espèces. La rtPCR a été employée pour détecter les *Plasmodium* spp. et *W. bancrofti* dans les échantillons.

Vingt-quatre espèces d'*Anopheles* ont été identifiées, parmi lesquelles *An. dirus* collecté dans les deux provinces et qui était l'espèce dominante à Binh Phuoc, tandis qu'*An. maculatus* était l'espèce dominante à Dak Nong. Les spécimens d'*An. minimus* ont été capturés uniquement à Binh Phuoc. Des erreurs d'identification morphologique entre *An. minimus* et *An. pampanai* ont montré l'importance de l'identification moléculaire, d'autant plus qu'un des spécimens d'*An. pampanai* était infecté par *P. vivax*. Il s'agit du premier rapport montrant la présence d'une nouvelle espèce au Vietnam, *An. scanloni*, appartenant au Complexe Dirus et étant impliqué dans la transmission du paludisme en Thaïlande. Un spécimen sur 361 *An. dirus* (0,26%) et 1 sur 5 *An. pampanai* (20%) ont été trouvés infectés par *P. vivax*, le taux d'infection à Binh Phuoc étant de 0,41% (2/486), alors que ce taux était de zéro à Dak Nong. Aucun moustique parmi un échantillon de 765 spécimens n'était infecté par *P. falciparum*, *P. knowlesi* ou *Wuchereria bancrofti*.

La faune anophélienne du centre-sud Vietnam présente une grande biodiversité, comprenant plusieurs espèces considérées comme des vecteurs potentiels dans la co-transmission du paludisme et de la FLB. L'objectif de cette étude était d'améliorer nos connaissances sur les

*Anopheles* vecteurs dans une zone peu étudiée du centre-sud du Vietnam en mettant l'accent sur l'évaluation de la capacité vectorielle des espèces d'anophèles dans cette région où le paludisme est endémique.

**Mots clés** : *Plasmodium*, *Wuchereria bancrofti*, *Anopheles*, Vietnam, rtPCR.

## **Diversity of *Anopheles* mosquitoes in Binh Phuoc and Dak Nong Provinces – Vietnam, and implication in the co-transmission of *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti***

Chung Thuy Ngo <sup>1,2</sup>, Daniel Parzy <sup>3</sup>, Véronique Sinou <sup>3</sup>, Hong Quang Le<sup>4</sup> and Sylvie Manguin <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recherche pour le Développement (IRD), LIPMC, UMR-MD3, Faculté de Pharmacie, F-34093 Montpellier, France

<sup>2</sup> National Institute of Veterinary Research, Ha Noi, Viet Nam

<sup>3</sup> UMR-MD3/IRBA, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université, F-13385 Marseille, France

<sup>4</sup> Military Preventive Medicine Centre, Ho Chi Minh City, Viet Nam

### **Summary**

**Background:** Human malaria is still a burden in Dak Nong and Binh Phuoc, two neighboring provinces in central-south Vietnam sharing border with Cambodia. Several *Anopheles* species that transmit *Plasmodium*, malaria pathogen, may also transmit *Wuchereria bancrofti*, the nematode causing Bancroftian lymphatic filariasis (BLF). The objective of this study was to evaluate the role of *Anopheles* species in the transmission and the co-transmission of these two parasitic pathogens in these two highly malaria endemic provinces of Vietnam.

**Methods:** The *Anopheles* samples were collected in Dak Nong and Binh Phuoc Provinces at the same period in 2010 and 2011 (November/December) using several collection methods: human landing catches (HLC), paired collections on human and buffalo (PC), resting captures (RC), all using mouth aspirator, and light traps (LT). Morphological identification and PCR-based methods were applied to identify the *Anopheles* species belonging to complex or group, while rtPCR was used to detect *Plasmodium* spp. and *W. bancrofti* in each mosquito specimen.

**Results:** On a total of 797 specimens, 24 *Anopheles* species were identified. *An. dirus* was found in both provinces and was predominant in Binh Phuoc Province, while *An. maculatus* was the most prevalent species in Dak Nong Province. *An. minimus* was collected only in Binh Phuoc Province. Misidentification between *An. minimus* and *An. pampanai* occurred. Four specimens of *An. scanloni* were identified and this is the first report on the occurrence of this species belonging to the Dirus Complex in Vietnam. One *An. dirus* and 1 *An. pampanai* specimen were infected by *P. vivax* for an infected rate of 0.41% (2/486) in Binh Phuoc

Province. No mosquito was found to be infected in Dak Nong Province. The global infection rate among the 765 specimens collected was 0.26% (2/765). No mosquito was found to be infected either by *P. falciparum*, *P. knowlesi* or *Wuchereria bancrofti*.

**Conclusion:** The *Anopheles* populations in Dak Nong and Binh Phuoc Provinces have a great biodiversity and include several species that are considered as potential vectors in the co-transmission of malaria and BLF pathogens.

**Key words:** *Plasmodium*, *Wuchereria bancrofti*, *Anopheles*, Vietnam, rtPCR.



## INTRODUCTION

Despite a decline in human malaria burden in Vietnam, malaria transmission remains in the forested areas of the southern and central provinces of Vietnam [1-5] and constitutes a considerable public health and economic problem in these areas [6]. There are several factors that maintain malaria transmission in this region of Vietnam such as: the presence at high density of the main vector *Anopheles dirus* [3,7,8], the transborder human migration and migration of national workers from malaria endemic areas [9], the lack of prevention while working in the forest [10]. Moreover, after long lasting treatment using insecticides (for *Anopheles* vectors) and drugs (for *Plasmodium*), resistance of the mosquito species to insecticides [11-13] and parasites to drugs [14,15] have been reported. The recently reported species, *Plasmodium knowlesi* [16-21] has also been mentioned infecting both humans [7,22] and *Anopheles* mosquitoes in Vietnam [7,23]. Marchand et al. [7] reported the co-infection status of one *An. dirus* with all three species, *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. knowlesi*. These studies suggested that *P. knowlesi* is most likely transmitted by the same *Anopheles* species that are considered the primary vectors in the transmission of falciparum and vivax malaria. Knowlesi malaria, hence, may represent one more challenge for malaria control in forested region because, even if human malaria could be eliminated, it still remains in forests where *An. dirus* mosquitoes and the natural knowlesi host, macaque monkeys, co-occur allowing the zoonotic transmission of *P. knowlesi* which serves as reservoir.

*Anopheles* vectors allowing the transmission of *Plasmodium* parasites may also transmit *Wuchereria bancrofti*, the nematode parasite that causes 90% of the human lymphatic filariasis (LF) cases worldwide [24]. The co-occurrence of malaria and filarial worm parasites has been reported in endemic areas [25-28]. Unlike malaria, this neglected disease is rarely fatal but severe morbidity including disabilities, as well as adverse economic consequences, occurs in 40% of infected individuals and involves disfigurement of the limbs and male genitalia (elephantiasis and hydrocoele, respectively) [29,30]. In Vietnam, Bancroftian lymphatic filariasis (BLF) occurred in the southern and central provinces [31,32], but only few information are available on the co-infection of these parasites in *Anopheles* mosquitoes. Even though, Vietnam is now in the pre-elimination phase for the control of lymphatic filariasis [33], it is important to obtain additional information on the prevalence and transmission of this disease to better define its geographic distribution in the country.

Binh Phuoc and Dak Nong Provinces are located in forested areas of southern and central Vietnam. These two neighboring provinces of Vietnam share the border with Cambodia and are reported as having the highest burden of malaria nationwide [14,34,35]. Some studies

have reported resistance of *P. falciparum* to malaria drugs such as: chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine chloroquine and mefloquine in these provinces [14,15], but no information on the transmission of malaria and filariasis in these provinces is available.

In order to understand the role of *Anopheles* species in the co-transmission of *Plasmodium* and *Wuchereria bancrofti*, and evaluate the diversity of the anopheline in Binh Phuoc and Dak Nong Provinces, a cross sectional study have been conducted during 2 years, 2010 and 2011.

## **MATERIEL AND METHODS**

### **Study Area**

Samples of *Anopheles* females were collected in 2 communes, Bu Gia Map – Binh Phuoc Province (11°45'N, 106°43'E) and Dak Ngo – Dak Nong Province (11°59'N, 107°42'E). In these 2 provinces, the temperature is around 25°C during the day and falls to 7° to 9°C at night; the rainy season is ranging from May to October and the dry season from November to April. The climate is favorable for agriculture, especially coffee, pepper and rubber plantations. Crops of coffee, pepper or cashew nuts are usually cultivated around houses. Villages are surrounded by cassava, corn and rice fields, and located in the fringe forest. The majority of income is from agricultural production. Every year, during harvest period, workers from neighboring regions come to work in the field, which generate high population movements in these areas. The wood houses are mostly built directly on the ground and on stilts with the floor made from wood at about 1 meter up in villages that are near forest or forest fringe. During the harvest, people live in the huts with poor protected condition.

Dak Ngo commune – Dak Nong Province was named in 2006. Its surface area is of 16,624 ha and the population is of 8,478 (in 2012) with the ethnics minorities accounting for 65%. The income is low, 58% of the household are poor. The circulation is difficult, especially during the wet season, because most roads are unpaved. In Dak Ngo, most forested areas have been replaced by plantations. In 2011, the Dak Ngo commune health station reported 24 malaria cases including 14 caused by *P. falciparum* and 10 cases due to *P. vivax*, that were treated at this health station (data provided by Dak Ngo commune health station).

Contrary to Dak Ngo, in Bu Gia Map commune – Binh Phuoc Province, the roads are mostly well reconstructed and this commune is mostly covered by primary forest, including Bu Gia Map National Park. This commune, formed in 2009, with an area of 2,330 ha and 3,704 inhabitants (in 2009), is a touristic destination. In 2011, Bu Gia Map commune health station

treated 266 malaria cases, such as 124 caused by *P. falciparum*, 138 due to *P. vivax*, and 4 mixed infection of both *P. falciparum* and *P. vivax* (data provided by Bu Gia Map commune health station).

### **Field collections and morphological identification of mosquitoes**

Four collecting methods were used including human landing catches (HLC), paired collection of humans and buffalo (PC), resting captures (RC), using mouth aspirator, and light trap (LT) available from 5 pm until 7 am. The period of collections was the same during both years which was scheduled during the change of season, from rainy to dry season (November and December) in 2010 and 2011.

In Dak Ngo commune, the mosquitoes were collected in 6 sites during 9 nights in November 2010. During November and December 2011, no *Anopheles* mosquito was collected in the same 6 sites of the Dak Ngo commune. Therefore, an additional 7<sup>th</sup> collecting site was added where few *Anopheles* were collected. The collections began at 5 pm and ended at midnight. The PC method was held in two sites. There were two collectors per collecting site, one person practiced HLC method and another person did either RC or PC method.

In Bu Gia Map commune, human landing catches and light trap methods were used to collect mosquitoes in 3 sites during 11 nights. Collections were made from 5 pm to 8 pm. Three to four collectors seated together at each site, the distance between the collectors of the same site was about 10 meters. Two light traps were settled near the collecting site.

All caught mosquitoes were held in separated cups and labeled according to hours and collection methods. *Anopheles* mosquitoes were identified during the following morning, then killed by freezing them. The *Anopheles* specimens were sorted out by taxon in the field by the Vietnamese entomologists using the keys published by the National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology (NIMPE)[36,37]. The *Anopheles* samples were kept frozen (-20°C) until processed. In the laboratory, they were separated in two parts: (1) head-thorax-legs-wings and (2) abdomen, each part being stored in individual tube at -20°C. Then, the samples were shipped on dry ice to the IRD laboratory in France and stored at -80°C until further use.

### **DNA extraction**

Genomic DNA was extracted from head-thorax-legs-wings part, using the Qiagen DNeasy Kit (Qiagen Ltd., Sussex, England). The manufacture's protocol was followed to obtain a final volume of 100 µl. Extracted DNA was divided and stored in the separated tubes at -20°C for several use.

### **Molecular identification of *Anopheles* species**

Based on the results obtained from morphological identification, extracted DNA from the *Anopheles* specimens belonging to group or complex of sibling species were followed by PCR identification. Several allele-specific multiplex PCR were applied accordingly in order to identify species of the Minimus and Dirus Complexes, as well as the Funestus and Maculatus Groups [38]. Sequences of the primers used, mix contains and PCR program followed those published in Garros et al. [39] for the Funestus Group including the Minimus Complex and closely related species such as *An. pampanai*; Walton et al. [40] for the Dirus Complex; and Walton et al. [41] for the Maculatus Group. The Tfi DNA polymerase (Invitrogen, France) was used in all PCR assays. Positive controls of each species, *An. minimus*, *An. harrisoni*, *An. aconitus*, *An. pampanai*, *An. varuna*, *An. dirus*, *An. scanloni*, *An. baimaii*, *An. maculatus* and *An. sawadwongporni*, available at LIPMC (IRD, Montpellier, France), were used as references.

### **Detection of *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti* using real time PCR (rtPCR)**

LightCycler system 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) was used for the rtPCR detection of three *Plasmodium* species (*P. falciparum*, *P. vivax* and *P. knowlesi*) and *Wuchereria bancrofti*. The sequences of the primers and probes used to amplify the target sequences have been previously described by Rao et al. [42,43] and Divis et al. [44] and listed in Table 1. The Taqman probes were labeled with the reporter dyes FAM, HEX or Cy5 at 5' end and the quencher dyes Black Hole Quencher 1 (BHQ1) and 2 (BHQ2) have been added to 3' end (detailed in Table 1). Primers and probes were commercially synthesized by Eurogentec (Angers, France). Extracted DNA used as positive controls for *P. falciparum* and *P. vivax* were provided by Pr. PARZY D., Director of the UMR-MD3 (Marseille, France) and those for *Wuchereria bancrofti* were available at LIPMC (kindly provided by Dr. Pothikasikorn J., Mahidol University, Bangkok, Thailand).

The PCR mix was prepared in the laboratory using the Platinum Taq polymerase Kit for each rtPCR run. Total volume (20 µl) of the mix containing (in final concentration): 1X PCR buffer, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP mixture, 0.225 µM of each primer, 0.1 µM of probe, 0.5 Unit Platinum Taq polymerase, and 2µl of DNA template, was filled in a 384 wells microplate (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Singleplex rtPCR was preceded by positive and negative samples to detect the separated target and check the repeatability of the method.

Multiplex assays were designed to detect several parasite species at a time such as: *Plasmodium* sp., *P. vivax* and *Wuchereria bancrofti*; and *P. falciparum* and *P. knowlesi*. The

amplification was composed of one cycle of denaturation at 95°C for 15 min followed by 45 cycles at 95°C during 20 sec, one cycle at 60°C during 1 min, completed by one cycle of cooling down to 40°C for 30 sec. The data analysis for singleplex and multiplex assays was performed with LightCycler 480 software (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). PCR grade water was used as no-template control, DNA from *W. bancrofti*, *P. falciparum*, *P. vivax* served as positive control samples, DNA extracted from human blood and *Anopheles dirus* free of *Plasmodium* and *W. bancrofti* served as negative controls. All qPCR assays were carried out in duplicate, samples that did not produce fluorescence signals before the threshold of 40 cycles (Ct) were considered negative. Discrepant samples with a single positive well were retested. rtPCR efficiencies for each target were determined from the slopes of standard curves generated by plotting graphs of genomic DNA concentrations against Ct values.

The specimens that gave a positive signal for the presence of parasites in rtPCR before 40 Ct have been double-checked using conventional PCR developed by Cunha et al. [45] for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax*.

### **Sequencing**

The fragments of *Plasmodium* mitochondrial genes (cytochrome oxidases, cox I and III) and the fragments of *Anopheles* mitochondrial (Cytochrome Oxidase subunits 1 and 2, COI and COII) and ribosomal (Domain 3, D3 and Internal Transcribed Spacer 2, ITS2) genes have been amplified and sent out for sequencing (Millegen, Labege Cedex, France).

The fragments of cox III for *P. falciparum* and cox I for *P. vivax* have been amplified using the PCR assay of Cunha et al. [45] (described above).

For *Anopheles*, the D3 and ITS2 fragments of ribosomal DNA were amplified using the pair of primers of Sharpe et al. [46] and Beebe et al. [47], respectively. The mitochondrial genes COI and COII were amplified using the pair of primers described in Simon et al. [48] and Yang et al. [49], respectively. Standard protocols were used for all PCR amplifications. Each 50 µl PCR reaction contained 5 µl of 1X AccuPrime Pfx reaction mix, 1.5 µl of each primer (10 µM), 0.4 µl of AccuPrime Pfx DNA Polymerase (2.5 units/µl), and 4 µl of template DNA. Thermal cycling conditions consisted of an initial denaturation step at 95°C for 2 min, then 40 cycles each consisting of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 50°C for COI, COII and ITS2, and 63°C for D3 for 30 s, and extension at 68°C for 45 s with final extension at 68°C for 10 min. The PCR products were kept at 4°C and checked by electrophoresis in 1.5% agarose gel, containing gel red 1X at final concentration.

Successfully amplified products were purified using the Nucleo Spin DNA purification kit (Macherey Nalgen, Germany). Direct sequencing of the products in both directions was done with an ABI 377 automated sequencer (PE Applied Bio Systems, Warring-ton, England).

## RESULTS

### Identification of *Anopheles* mosquitoes

A total of 797 *Anopheles* females were collected in Dak Nong and Binh Phuoc Provinces during November and December 2010 and 2011. Morphological identifications showed that the *Anopheles* samples belonged to 21 taxa, including species of 3 Complexes (Dirus, Minimus, Gigas) and one Group (Maculatus) (Table 2).

Out of these 21 morphological taxa, the taxonomic status of *An. dangi*, a species that has never been internationally recognized, has recently been formally specified. *An. dangi* is merely a morphological variant of *An. crawfordi* and is deemed to be a synonym of that nominal species [50]. We then considered *An. dangi* and *An. crawfordi* as one taxon (Table 2).

All specimens belonging to the Minimus (n=83) and Dirus (n=390) Complexes and to the Maculatus Group (n=175) were processed for specific molecular identification. Misidentifications and discrepancies between morphological and molecular identifications occurred for each complex and group as shown in Table 2. Of 83 specimens of *An. minimus*, 5 specimens of *An. pampanai* were morphologically misidentified with a rate of error of 6.02% (Figure 1A). For the Dirus Complex, out of 390 specimens of *An. dirus*, 4 were actually specimens of *An. scanloni* (former *An. dirus* species C) with a rate of error of 1.02% (Figure 1B). Within the Maculatus Group, of 175 specimens of morphologically identified *An. maculatus*, the molecular identification showed the presence of 3 species: 152 specimens were identified as *An. maculatus* (86.86%), 16 as *An. sawadwongporni* (9.14%), and 6 as *An. rampae* (3.43%) (formerly known as *An. maculatus* form K) (Figure 1C). Three specimens, including 2 morphologically identified as part of the Dirus Complex and 1 of the Maculatus Group, did not give any amplification and could not be formally identified (Table 2).

Of the 21 taxa originally identified based on morphological characters, molecular identifications revealed 4 additional taxa (*An. scanloni*, *An. rampae*, *An. sawadwongporni* and *An. pampanai*) and eliminated one (*An. dangi*). All the 797 *Anopheles* specimens were then classified into 24 taxa (Table 2). The dominant species was *An. dirus* (48.2%), followed by *An. maculatus* (19.1%) and *An. minimus* (9.8%). These 3 species are the main malaria vectors in Southeast Asia and represented 77.1% of the collected species in this region of Vietnam.

The other 21 identified taxa (180 specimens) represented 22.6% of the total sample. Three specimens could not be molecularly identified leading a rate of unidentified samples of 0.4 % (Figure 2). Of these 24 taxa, 8 were commonly found in both provinces, 7 and 9 taxa were collected in one Province only, Dak Nong or Binh Phuoc respectively (Table 2).

In Dak Nong Province, a total of 311 specimens were collected and 308 specimens were molecularly identified as belonging to 15 *Anopheles* species among which *An. maculatus* (48.7%) and *An. crawfordi* (15.9 %) were dominant. *Anopheles dirus*, considered as the main vector of “forest malaria”, accounted for 7.5 % of the specimens, such as *An. gigas* (7.8%) and *An. barbumbrosus* (7.1%), followed by *Anopheles kochi* (5.2%), while the last 9 species, *An. asiaticus*, *An. campestris*, *An. nitidus*, *An. philippinensis*, *An. sawadwongporni*, *An. subpictus*, *An. tessellatus*, *An. umbrosus*, and *An. vagus*, were collected in small densities ranging from 1 to 5 specimens, the overall representing 7.8% (Table 3).

Unlike in Dak Nong, two *Anopheles* species predominated in Binh Phuoc Province accounting for 90.4% of the total sample. These were *An. dirus* and *An. minimus*, with respective prevalence of 74.3% and 16.1%. These 2 species are considered as the main malaria vectors, *An. sawadwongporni* is a secondary malaria vector and represented 2.7% of the sample. Of the 486 specimens collected and 17 species identified, the last 14 species including *An. aconitus*, *An. barbirostris*, *An. barbumbrosus*, *An. indefinitus*, *An. jeyporiensis*, *An. karwari*, *An. kochi*, *An. maculatus*, *An. nitidus*, *An. pampanai*, *An. philippinensis*, *An. rampae*, *An. scanloni*, and *An. subpictus*, were collected in densities not exceeding 6 specimens, for a total of 7% (Table 3). Both species, *An. scanloni* and *An. rampae* occurred in Binh Phuoc Province only. This is the first report of the presence of *An. scanloni* in Vietnam and *An. rampae* at this southern latitude in Vietnam. Comparative analysis of DNA sequences from these two species showed high identity rate with those reported in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The sequences have been added in the GenBank under accession numbers: (add latter).

#### **Detection of *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti***

Detection of parasites was realized on 765 *Anopheles* specimens using a multiplex rtPCR method with Taqman probes. Two specimens were found positive, one *Anopheles dirus* and one *An. pampanai*, both infected by *P. vivax* (Figure 3 A, B). To double-check this result, the conventional PCR by Cunha et al. [45] was applied on both positive specimens and the amplified products showed the typical band for *P. vivax* (Figure 3 C). The PCR products were sent for sequencing. The sequences of these two *P. vivax* isolates have been added into the GenBank under the accession numbers (add latter). These 2 positive samples were collected

in Binh Phuoc Province. The *P. vivax* infection rate in *Anopheles* specimens of Binh Phuoc was 0.41% (2/486), while it was of 0.28% (1/384) for *An. dirus* and 20% (1/5) for *An. pampanai*, this high rate being due to the small number of specimens. None of the collected *Anopheles* specimens of both provinces were infected either by *P. falciparum*, *P. knowlesi* or *Wuchereria bancrofti*.

## DISCUSSION

### **Biodiversity of the *Anopheles* mosquitoes in Dak Nong and Binh Phuoc Provinces**

The *Anopheles* fauna of Vietnam, and more globally in Southeast Asian countries, is known to have the greatest biodiversity worldwide and includes the highest numbers of species complexes and groups based on the fact that there is either no or unreliable morphological characters to accurately distinguish each sibling species from one another [38,51]. Two of the main malaria vectors known in Southeast Asia are *An. dirus* and *An. minimus*, but other species have been incriminated such as: *An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, *An. sinensis*, *An. aconitus*, *An. pampanai*, *An. harrisoni*, *An. peditaeniatus* and *An. philippinensis* [1,3-5,7,52]. The relative importance in density of each species depends on the ecology of the area where transmission occurs [53-56]. The sibling species of *An. dirus*, *An. scanloni* is considered as one of the primary vectors in southern Thailand and it has also been reported in southern Myanmar, but there is no report on the occurrence of this species in other countries [8,38,57]. In Thailand, *An. scanloni* is considered to have a non-continuous distribution because this species is closely linked to limestone karst habitat [58]. Of 390 individuals belonging to the Dirus Complex, 4 specimens were molecularly identified as *An. scanloni* and this is the first report on the occurrence of *An. scanloni* in another country out of Thailand and Myanmar. On a total of 8 species within the Dirus Complex, 3 are now reported from Vietnam such as *An. scanloni*, *An. dirus* and *An. aff. takasagoensis* [59]. Although *An. rampae* has already been reported in northern (Lang Son, Ninh Binh, Nghe An Provinces) and central-northern Vietnam (Quang Binh Province) [41,60], this is the first report of the presence of this species in central-southern part of Vietnam. This species is the third one belonging to the Maculatus Group collected in Vietnam, along with *An. maculatus* and *An. sawadwongporni*. The Maculatus Group includes 9 species which are difficult to identify based on morphological identification due to overlapping characters [61], their role as malaria vectors has been considered in several regions [38,62-64]. *An. maculatus* and *An. sawadwongporni* have also been considered as implicated in malaria transmission in Vietnam [1,5]. Although the collected samples of *An. scanloni* and *An. rampae* were limited with 4 and



6 specimens respectively, this finding once again shows the important role of an accurate identification to distinguish the *Anopheles* species, especially sibling species, and the reliability of molecular assays for this purpose. This result also highlights the need for more studies on the occurrence and the role of these two species in malaria transmission in Vietnam.

In our study, beside *An. scanloni* and *An. rampae*, 22 other *Anopheles* species have been collected that were previously considered to occur in Vietnam [1,3-5,53,65-67]. The *Anopheles* species composition in Dak Nong and Binh Phuoc contained common species, but also specific species of each province. This species specificity was most likely linked to the environment of each site. These two bordering provinces with similar climate conditions favor the presence of 8 common *Anopheles* species. However, Dak Ngo commune - Dak Nong Province is mainly covered by secondary forest and large plantation of coffee, pepper, cashew nuts or cassava, with people living nearby these plantations to manage their own crops. Many insecticides (agrochemicals) were administrated to protect the farm products and dams were constructed for irrigation (Ngo C.T., personal observation). These activities are introducing ecological changes that may affect the distribution of *Anopheles* species. While in Bu Gia Map commune - Binh Phuoc Province, the study area was mostly covered by primary forest with natural and shaded streams, this undisturbed tropical forest is known to favor the occurrence of primary malaria vectors such as species of the Dirus Complex [2,4,55,68]. This environment may influence the species composition of anopheline in these two provinces, *An. dirus* and *An. minimus* were the dominant species in Binh Phuoc while *An. maculatus* was dominating in Dak Nong. The presence of *An. dirus* s.l. and *An. maculatus* s.l. was significantly related to their sampling sites ( $X^2 = 413.6$ ,  $X^2$  lim = 3.84,  $P < 0.00001$ ). However, as this study was not objected to find out the link between the ecological condition and the *Anopheles* species composition, further study will be needed to confirm this result.

#### ***Anopheles* vectors and transmission of parasites**

The occurrence of malaria and lymphatic filariasis (LF), two of the most common mosquito-borne parasitic diseases that may share common vectors, has been reported in Vietnam in the 50's and the 70's [69-71], but no study has been done since. WHO considered LF as being one of the six infectious diseases eradicable and the regular surveillance of the disease and its vectors is mandatory to reach this goal [33]. Out of 24 *Anopheles* species identified in Dak Nong and Binh Phuoc Provinces herein, 9 were considered as potential vectors for co-transmitting *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti* such as *An. aconitus*, *An. barbirostris*, *An. dirus*, *An. maculatus*, *An. minimus*, *An. philippinensis*, *An. subpictus*, *An.*

*tessellatus* and *An. vagus* [24]. Two specimens, one *An. dirus* and one *An. pampanai*, were infected by *P. vivax* and no sample was found infected by *Wuchereria bancrofti* or other *Plasmodium* species (*P. falciparum*, *P. knowlesi*). The infection rate in Binh Phuoc was of 0.41% (2/486), and more precisely it was of 0.28% (1/384) within *An. dirus* and 20% (1/5) within *An. pampanai*, while it was negative in Dak Nong Province. Our results are in accordance with those reported by Nguyen (2006) [31]. This author conducted a study on the LF situation in Khanh Hoa Province and reported that 3.64% of the studied human population was infecting by FLB, however, no *Anopheles* individual out of 144 *An. vagus* dissected was infected by *W. bancrofti*. Vietnam has been considered as one of the countries being in the pre-elimination phase of controlling lymphatic filariasis since 2011 and this study contributes to the surveillance of the Bancroftian lymphatic filariasis in Vietnam.

In Vietnam, reported malaria cases are mostly due to *P. falciparum* (66%), followed by *P. vivax* (34%), while *P. malariae* and *P. ovale* are seldom recorded [72] and some infected cases by *P. knowlesi* have been reported in southern-central Vietnam [22]. Malaria cases have been found in some areas with a high proportion of asymptomatic infections that may reach more than 80% [73]. Recently, sporozoite positive *Anopheles* specimens have been reported in different areas, including northern, central and southern Vietnam [1,3-5,7,53], with *An. dirus* and *An. minimus* being the main malaria vectors. Beside these primary vectors, the authors of these reports indicated also the possible role in malaria transmission of other *Anopheles* species, including *An. pampanai* [3,5,7,23]. The *P. vivax* infection rate in Binh Phuoc was of 0.41% (2/486), which is higher than those obtained from *Anopheles* populations collected in Khe Ngang (Quang Binh Province) (0.24%, 9/3,770) [1], and from 7 *Anopheles* species (0.08%, 13/16,160) collected in Vietnam and Cambodia [52]. However, it was lower compared to those previously reported by Marchand et al. [7] (0.76%; 43/5,663 *An. dirus* from Khanh Phu - Khanh Hoa Province were infected by *P. vivax*), Sanh et al. [4] (0.67%; 1/149 *An. dirus* from Dong Thong - Ninh Thuan Province were infected by *P. falciparum*), and Trung et al. [53] (0.83%; 3/361 *An. minimus* from Lang Nhot – Khanh Hoa Province were infected by *P. vivax*). However, the infection rate found within the specimens of *An. pampanai* was quite high reaching 20% (1/5). *An. pampanai* has been previously considered as a *vivax* malaria vector in Vietnam [5,52]. Durnez et al. [52] reported that 1.54% (1/65) of the *An. pampanai* specimens collected in Ninh Thuan Province were infected by *P. vivax*. Comparing with our report, this rate was lower. Concerning the transmission of *P. knowlesi* in Vietnam, Marchand et al. [7] reported about 0.55% (31/5,663) *An. dirus* infected by *P. knowlesi* in Khanh Phu - Khanh Hoa Province (12°14'N 108°56'E). In the current study, no

*Anopheles* specimens were infected by this parasite. The same result was obtained with *P. falciparum*. Among 311 *Anopheles* collected in the Dak Nong Province, no specimens were found to be infected. However, malaria cases are still reported in this province, and in a similar survey conducted in 2007, using the conventional PCR by Cunha et al. [45], we found that 2.03% (5/246) of the *Anopheles* specimens were infected by *P. vivax*. The 5 infected specimens belonged to *An. minimus* (3/76) and *An. maculatus* (2/22) (unpublished data). Moreover, as this is the first study investigating the implication of *Anopheles* in the co-transmission of *Plasmodium* and *Wuchereria bancrofti* in central-south Vietnam, further study will be needed to evaluate on a larger sample the vector role of *Anopheles* species in this area.

## CONCLUSION

The *Anopheles* fauna in Dak Nong and Binh Phuoc Provinces showed a great biodiversity with 24 *Anopheles* species identified, including common species and specific species of each province. The primary malaria vector, *An. dirus*, occurred in both provinces and this species was predominated in our total sample, while *An. minimus* was only present in Binh Phuoc Province. *An. maculatus* was the dominant species in Dak Nong Province. This is the first report of the occurrence of *An. scanloni*, species belonging to the Dirus Complex in Vietnam, as well as it is the first report of *An. rampae*, member of the Maculatus Group, in southern latitude of Vietnam. No infected *Anopheles* by *P. falciparum*, *P. knowlesi* or *Wuchereria bancrofti* have been detected over 765 specimens. One *An. dirus* and 1 *An. pampanai* were infected by *P. vivax*. The infected rate was of 0.41% (2/486) in Binh Phuoc and of 0.28% (1/384) for *An. dirus* and 20% (1/5) for *An. pampanai*. Further study on the vector status and malaria transmission will be needed for a better understanding on the vector role of *Anopheles* species in these provinces of Vietnam.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We express gratitude to the staff of the Department of Parasitology and Entomology of the Military Preventive Medicine Centre, Ho Chi Minh City, Vietnam, for organizing and participating in the field work. NCT gratefully acknowledges Gregor Dubois (LIPMC – Faculty of Pharmacie – Montpellier) and Philippe Clair (qPCR platform – Faculty of Sciences – Montpellier) for their precious advises and experience in rtPCR during the lab work in France. Field work was funded by the Direction de la Coopération de Sécurité et de Défense – Ministry of Foreign Affairs (France). We are grateful to the personnel of the Military Mission, especially the Defence Attaché of the French Embassy in Vietnam, for logistical and

administrative assistance. This study was made possible through a PhD allowance provided to the first author by IRD, Marseille, France.

## REFERENCES

1. Do MC, Beebe NW, Van VN, Quang TL, Lein CT, et al. (2010) Vectors and malaria transmission in deforested, rural communities in north-central Vietnam. *Malar J* 9: 1-12.
2. Erhart A, Thang ND, Hung NQ, Toi le V, Hung le X, et al. (2004) Forest malaria in Vietnam: a challenge for control. *Am J Trop Med Hyg* 70: 110-118.
3. Marchand RP, Tuyen NQ, Hoanh NQ, Vien NT (1996) The Khanh Phu malaria research project. Hanoi. 168 p.
4. Sanh NH, Van Dung N, Thanh NX, Trung TN, Van Co T, et al. (2008) Forest malaria in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 79: 652-654.
5. Van Bortel W, Trung HD, Hoi LX, Van Ham N, Van Chut N, et al. (2010) Malaria transmission and vector behaviour in a forested malaria focus in central Vietnam and the implications for vector control. *Malar J* 9: 373.
6. Morel CM, Thang ND, Xa NX, Hung le X, Thuan le K, et al. (2008) The economic burden of malaria on the household in south-central Vietnam. *Malar J* 7: 166.
7. Marchand RP, Culleton R, Maeno Y, Quang NT, Nakazawa S (2011) Co-infections of *Plasmodium knowlesi*, *P. falciparum*, and *P. vivax* among Humans and *Anopheles dirus* Mosquitoes, Southern Vietnam. *Emerg Infect Dis* 17: 1232-1239.
8. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Chareonviriyaphap T, Patil AP, et al. (2011) The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 4: 89.
9. Pongvongsa T, Ha H, Thanh L, Marchand RP, Nonaka D, et al. (2012) Joint malaria surveys lead towards improved cross-border cooperation between Savannakhet province, Laos and Quang Tri province, Vietnam. *Malar J* 11: 262.
10. Thang ND, Erhart A, Speybroeck N, Hung le X, Thuan le K, et al. (2008) Malaria in central Vietnam: analysis of risk factors by multivariate analysis and classification tree models. *Malar J* 7: 28.
11. Thang ND, Erhart A, Speybroeck N, Xa NX, Thanh NN, et al. (2009) Long-Lasting Insecticidal Hammocks for controlling forest malaria: a community-based trial in a rural area of central Vietnam. *PLoS One* 4: e7369.
12. Van Bortel W, Chinh VD, Berkvens D, Speybroeck N, Trung HD, et al. (2009) Impact of insecticide-treated nets on wild pyrethroid resistant *Anopheles epiroticus* population from southern Vietnam tested in experimental huts. *Malar J* 8: 248.
13. Van Bortel W, Trung HD, Thuan le K, Sochantha T, Socheat D, et al. (2008) The insecticide resistance status of malaria vectors in the Mekong region. *Malar J* 7: 102.
14. Tran TH, Nguyen TT, Nguyen HP, Boni MF, Ngo VT, et al. (2012) *In vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam. *Malar J* 11: 355.

15. Sinou V, Quang LH, Pelleau S, Huong VN, Huong NT, et al. (2011) Polymorphism of *Plasmodium falciparum* Na(+)/H(+) exchanger is indicative of a low in vitro quinine susceptibility in isolates from Viet Nam. *Malar J* 10: 164.
16. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, et al. (2008) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 46: 165-171.
17. Cox-Singh J, Singh B (2008) *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol* 24: 406-410.
18. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, et al. (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024.
19. Vythilingam I, Noorazian YM, Huat TC, Jiram AI, Yusri YM, et al. (2008) *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. *Parasit Vectors* 1: 26.
20. White NJ (2008) *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 46: 172-173.
21. Ta TT, Salas A, Ali-Tammam M, Martinez Mdel C, Lanza M, et al. (2010) First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malar J* 9: 219.
22. Van den Eede P, Van HN, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc TN, et al. (2009) Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malar J* 8: 249.
23. Nakazawa S, Marchand RP, Quang NT, Culleton R, Manh ND, et al. (2009) *Anopheles dirus* co-infection with human and monkey malaria parasites in Vietnam. *Int J Parasitol* 39: 1533-1537.
24. Manguin S, Bangs MJ, Pothikasikorn J, Chareonviriyaphap T (2010) Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infect Genet Evol* 10: 159-177.
25. Muturi EJ, Jacob BG, Kim CH, Mbogo CM, Novak RJ (2008) Are coinfections of malaria and filariasis of any epidemiological significance? *Parasitol Res* 102: 175-181.
26. Burkot TR, Molineaux L, Graves PM, Paru R, Battistutta D, et al. (1990) The prevalence of naturally acquired multiple infections of *Wuchereria bancrofti* and human malarias in anophelines. *Parasitol* 100 Pt 3: 369-375.
27. Chadee DD, Rawlins SC, Tiwari TS (2003) Short communication: concomitant malaria and filariasis infections in Georgetown, Guyana. *Trop Med Int Health* 8: 140-143.
28. Muturi EJ, Mbogo CM, Mwangangi JM, Ng'ang'a ZW, Kabiru EW, et al. (2006) Concomitant infections of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* on the Kenyan coast. *Filaria J* 5: 8.
29. Molyneux DH (2006) Control of human parasitic diseases: Context and overview. *Adv Parasitol* 61: 1-45.
30. Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD (2007) Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis* 1: e114.
31. Nguyen DA (2006) Study on lymphatic filariasis characteristic in Khanh Vinh district, Khanh Hoa province and intervention effectiveness [Thesis in vietnamese]. Hanoi: University of Medicine. 134 p.
32. Meyrowitsch DW, Nguyen DT, Hoang TH, Nguyen TD, Michael E (1998) A review of the present status of lymphatic filariasis in Vietnam. *Acta Trop* 70: 335-347.

33. WHO (2013) Lymphatic filariasis: a handbook of practical entomology for national lymphatic filariasis elimination programmes. 1211 Geneva 27, Switzerland: WHO Press. 107 p.
34. Abe T, Honda S, Nakazawa S, Tuong TD, Thieu NQ, et al. (2009) Risk factors for malaria infection among ethnic minorities in Binh Phuoc, Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40: 18-29.
35. IMPEQN (2013) Malaria situation in the Centre and Highlands region: Statistic data of 2012 18 January 2013 ed. Quy Nhon - Vietnam: Epidemiology department - Institute of Malaria, Parasitology and Entomology - Quy Nhon.
36. IMPE, editor (1987) Keys to identify the *Anopheles* in Vietnam (Adult - Pupae - Larvae). Printed in the Hanoi Architectural University ed. Hanoi: Department of Entomology. Institute of Malariology, Parasitology and Entomology. 66 p.
37. IMPE, editor (2008) Keys to identify the *Anopheles* mosquitoes (Adults-Pupae-Larvae). Hanoi: Department of Entomologie - Institute of Malariology, Parasitology and Entomology. 62 p.
38. Manguin S, Garros C, Dusfour I, Harbach RE, Coosemans M (2008) Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: an updated review. *Infect Genet Evol* 8: 489-503.
39. Garros C, Koekemoer LL, Coetzee M, Coosemans M, Manguin S (2004) A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. *Am J Trop Med Hyg* 70: 583-590.
40. Walton C, Handley JM, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RE, et al. (1999) Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med Vet Entomol* 13: 24-32.
41. Walton C, Somboon P, O'Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, et al. (2007) Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infect Genet Evol* 7: 93-102.
42. Rao RU, Atkinson LJ, Ramzy RM, Helmy H, Farid HA, et al. (2006) A real-time PCR-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in blood and mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 74: 826-832.
43. Rao RU, Huang Y, Bockarie MJ, Susapu M, Laney SJ, et al. (2009) A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 365-370.
44. Divis PC, Shokoples SE, Singh B, Yanow SK (2010) A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. *Malar J* 9: 344.
45. Cunha MG, Medina TS, Oliveira SG, Marinho AN, Povoas MM, et al. (2009) Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Acta Trop* 111: 35-38.

46. Sharpe RG, Harbach RE, Butlin RK (2000) Molecular variation and phylogeny of members of the *Minimus* group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol* 25: 263-272.
47. Beebe NW, Saul A (1995) Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 53: 478-481.
48. Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, et al. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of Mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved of polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 251-285.
49. Yang M, Ma Y, Wu J (2011) Mitochondrial genetic differentiation across populations of the malaria vector *Anopheles lesteri* from China (Diptera: Culicidae). *Malar J* 10: 216-224.
50. Ngo CT, Harbach RE, Garros C, Parzy D, Le HQ, et al. (2013) Taxonomic assessment of *Anopheles crawfordi* and *An. dangi* of the Hyrcanus Group of subgenus *Anopheles* in Vietnam. *Acta Trop*.
51. Manguin S, Boete C (2011) Global Impact of Mosquito Biodiversity, Human Vector-Borne Diseases and Environmental Change In: Lopez JP, editor. *The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity*: InTech. pp. 27-50.
52. Durnez L, Van Bortel W, Denis L, Roelants P, Veracx A, et al. (2011) False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. *Malar J* 10: 195.
53. Trung HD, Van Bortel W, Sochantha T, Keokenchanh K, Quang NT, et al. (2004) Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia. *Trop Med Int Health* 9: 230-237.
54. O'Loughlin SM, Somboon P, Walton C (2007) High levels of population structure caused by habitat islands in the malarial vector *Anopheles scanloni*. *Heredity (Edinb)* 99: 31-40.
55. Manguin S, Carnevale P, Mouchet J, Coosemans M, Julvez J, et al. (2008) Biodiversity of malaria in the world. Montrouge, France. 464 p.
56. Ali WN, Ahmad R, Nor ZM, Ismail Z, Ibrahim MN, et al. (2012) Environmental variables associated with immature stage habitats of culicidae collected in aboriginal villages in Pahang, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 43: 1387-1399.
57. Baimai V, Kijchalao U, Sawadwongporn P, Green CA (1988) Geographic distribution and biting behaviour of four species of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 19: 151-161.
58. Poopittayasatoporn A, Baimai V (1995) Polytene chromosome relationships of five species of the *Anopheles dirus* complex in Thailand. *Genome* 38: 426-434.
59. Takano KT, Nguyen NT, Nguyen BT, Sunahara T, Yasunami M, et al. (2010) Partial mitochondrial DNA sequences suggest the existence of a cryptic species within the *Leucosphyrus* Group of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae), forest malaria vectors, in northern Vietnam. *Parasit Vectors* 3: 1-16.



60. Morgan K, O'Loughlin SM, Mun-Yik F, Linton YM, Somboon P, et al. (2009) Molecular phylogenetics and biogeography of the Neocellia Series of *Anopheles* mosquitoes in the Oriental Region. *Mol Phylogenet Evol* 52: 588-601.
61. Harbach RE (2013) The phylogeny and classification of *Anopheles*. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. InTech Open Access Publisher ed. Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher. pp. 3-55.
62. Muenworn V, Sungvornyothin S, Kongmee M, Polsomboon S, Bangs MJ, et al. (2009) Biting activity and host preference of the malaria vectors *Anopheles maculatus* and *Anopheles sawadwongporni* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vector Ecol* 34: 62-69.
63. Wu S, Pan JY, Wang XZ, Zhou SS, Zhang GQ, et al. (2009) *Anopheles pseudowillmori* is the predominant malaria vector in Motuo County, Tibet Autonomous Region. *Malar J* 8: 46.
64. Singh S, Prakash A, Yadav RN, Mohapatra PK, Sarma NP, et al. (2012) *Anopheles (Cellia) maculatus* group: its spatial distribution and molecular characterization of member species in north-east India. *Acta Trop* 124: 62-70.
65. Nguyen TA (1993) Malaria in Vietnam. Environment, prevention and treatment. *Bull Soc Pathol Exot* 86: 494-499.
66. Vu DC (2006) Distribution of *Anopheles* mosquito, the malarial transmission vector in some forested habitat, located in northern part of Vietnam. Hanoi: IMPE-Hanoi. 40 p.
67. Vu TP, editor (1998) *Epidemiologie du paludisme et lutte antipaludique au Vietnam*. Edition médicale ed. Hanoi-Vietnam.
68. Obsomer V, Defourny P, Coosemans M (2007) The *Anopheles dirus* complex: spatial distribution and environmental drivers. *Malar J* 6: 26.
69. Le Xuan C (1959) [Contribution to the study of malarial splenomegaly in Vietnam]. *Sang* 30: 13-25.
70. Hembree SC (1974) Distribution and prevalence of Bancroftian filariasis in US Army Special Forces Camps in the Republic of Vietnam. *Mil Med* 139: 309-312.
71. Colwell EJ, Armstrong DR, Brown JD, Duxbury RE, Sadun EH, et al. (1970) Epidemiologic and serologic investigations of filariasis in indigenous populations and American soldiers in South Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 19: 227-231.
72. WHO (2012) *World Malaria Report*. Geneva, Switzerland: WHO Press. 195 p.
73. Thang ND, Erhart A, Hung le X, Thuan le K, Xa NX, et al. (2009) Rapid decrease of malaria morbidity following the introduction of community-based monitoring in a rural area of central Vietnam. *Malar J* 8: 3.

**Table 1:** Sequences of primers and probes used for the detection of *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti* using multiplex rtPCR.

Name	Sequence (5' - 3')	Target
Plasmo 1	GTTAAGGGAGTGAAGACGA TCAGA	<i>Plasmodium</i> <i>sp.</i> and <i>P. knowlesi</i>
Plasmo 2	AACCCAAAGACTTTGATTTTC TCATAA	
Plasprobe	FAM- ACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG- BHQ1	
Pk probe	HEX-CTCTCCGGAGATTAGA AACTCTTAGATTGCT-BHQ1	
FAL_F	CTT TTG AGA GGT TTT GTT ACT TTG AGT AA	<i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i>
FAL_R	TAT TCC ATG CTG TAG TAT TCA AAC ACA A	
FAL_PB	FAM - TGT TCA TAA CAG ACG GGT AGT CAT GAT TGA GTT CA - BHQ1	
VIV_F	ACG CTT CTA GCT TAA TCC ACA TAA CT	<i>Plasmodium</i> <i>vivax</i>
VIV_R	ATT TAC TCA AAG TAA CAA GGA CTT CCA AGC	
VIV_PB	HEX - TTC GTA TCG ACT TTG TGC GCA TTT TGC - BHQ1	
LDR1_F	ATT TTG ATC ATC TGG GAA CGT TAA TA	<i>Wuchereria</i> <i>bancrofti</i>
LDR2_R	CGA CTG TCT AAT CCA TTC AGA GTG A	
WB_PB	Cy5 - ATC TGC CCA TAG AAA TAA CTA CGG TGG ATC TCT G - BHQ2	

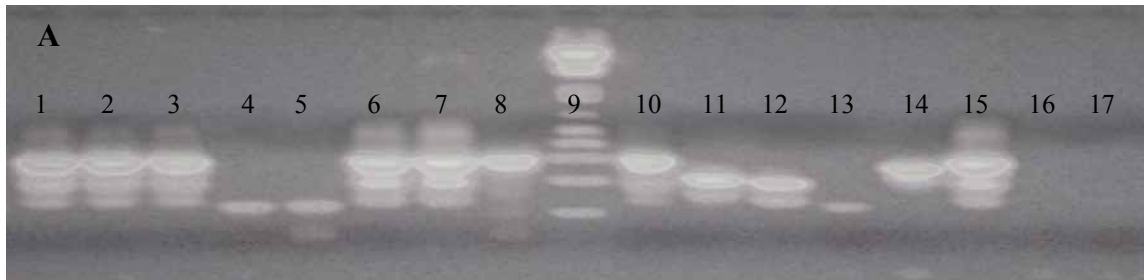
**Table 2:** *Anopheles* species and numbers collected in Dak Nong (\*) and Binh Phuoc (\*\*) Provinces following morphological and molecular identifications when applicable. Species names without asterisk were commonly collected in both provinces. Complex and Groups in bold include major malaria vector species. NA, molecular identification not applicable.

N°	Complex/Group	Taxa	Morphological identification	Molecular identification
1	Annularis Group	<i>An. philippinensis</i>	5	NA
2	Asiaticus Group	<i>An. asiaticus</i> *	1	NA
3	Barbirostris Group	<i>An. barbirostris</i> **	1	NA
4		<i>An. barbumbrosus</i>	23	NA
5		<i>An. campestris</i> *	5	NA
6	<b>Dirus Complex</b>	<i>An. dirus</i>	390	384
7		<i>An. scanloni</i> **	0	4
8	<b>Funestus Group</b>	<i>An. aconitus</i> **	1	1
9		<i>An. minimus</i> **	83	78
10		<i>An. pampanai</i> **	0	5
11		<i>An. jeyporiensis</i> **	5	NA
12	Hyrcanus Group	<i>An. crawfordi</i> *	25	49
13		<i>An. dangi</i> *	24	0
14		<i>An. nitidus</i>	2	NA
15	Kochi Group	<i>An. kochi</i>	18	NA
16	Lindesayi Group	<i>An. gigas</i> *	24	NA
17	<b>Maculatus Group</b>	<i>An. maculatus</i>	175	152
18		<i>An. sawadwongporni</i>	0	16
19		<i>An. rampae</i> **	0	6
20		<i>An. karwari</i> **	1	NA
21	Subpictus Group	<i>An. indefinitus</i> **	1	NA
22		<i>An. subpictus</i>	4	NA
23		<i>An. vagus</i> *	2	NA
24	Tessellatus Group	<i>An. tessellatus</i> *	4	NA
25	Umbrosus Group	<i>An. umbrosus</i> *	3	NA
26		Unidentified	0	3
<b>Total</b>			<b>797</b>	

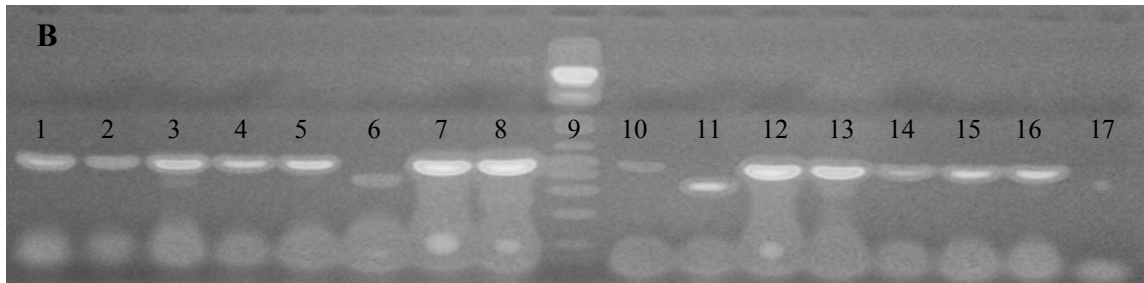
**Table 3:** *Anopheles* species and numbers collected in Dak Nong and Binh Phuoc Provinces, Vietnam. Species identifications obtained after applying molecular identification methods for Complex or Group species. In bold, major malaria vector species.

N°	Species	Provinces	
		Dak Nong	Binh Phuoc
1	<i>An. aconitus</i>		1
2	<i>An. asiaticus</i>	1	
3	<i>An. barbirostris</i>		1
4	<i>An. barbumbrosus</i>	22	1
5	<i>An. campestris</i>	5	
6	<i>An. crawfordi</i>	49	
7	<b><i>An. dirus</i></b>	23	361
8	<i>An. gigas</i>	24	
9	<i>An. indefinitus</i>		1
10	<i>An. jeyporiensis</i>		5
11	<i>An. karwari</i>		1
12	<i>An. kochi</i>	16	2
13	<b><i>An. maculatus</i></b>	150	2
14	<b><i>An. minimus</i></b>		78
15	<i>An. nitidus</i>	1	1
16	<i>An. pampanai</i>		5
17	<i>An. philippinensis</i>	4	1
18	<i>An. rampae</i>		6
19	<i>An. sawadwongporni</i>	3	13
20	<i>An. scanloni</i>		4
21	<i>An. subpictus</i>	1	3
22	<i>An. tessellatus</i>	4	
23	<i>An. umbrosus</i>	3	
24	<i>An. vagus</i>	2	
25	Unidentifiable	3	
<b>Total : 797</b>		<b>311</b>	<b>486</b>

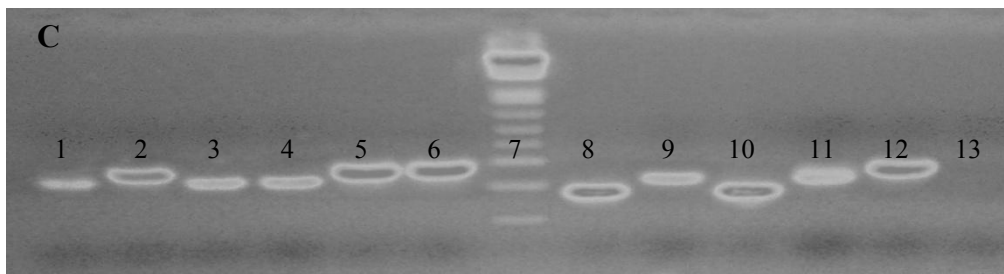
**Figure 1:** Multiplex allele-specific PCR products migrated on 2% agarose gel showing *An. pampanai* (A), *An. scanloni* (B) and *An. rampae* (C) in anopheline of southern central Vietnam



A - Lane: 10-14 -positive control of *An. minimus*(310bp), *An. aconitus* (200bp), *An. harrisoni* (180bp), *An. pampanai* (90bp)and *An. varuna* (260bp), respectively; 9 - 1kb plus ladder; 16,17 - negative control; 4 and 5- Samples identified as *An. pampanai*; 1- 3, 6 - 8,14-15 - Samples identified as *An. dirus*



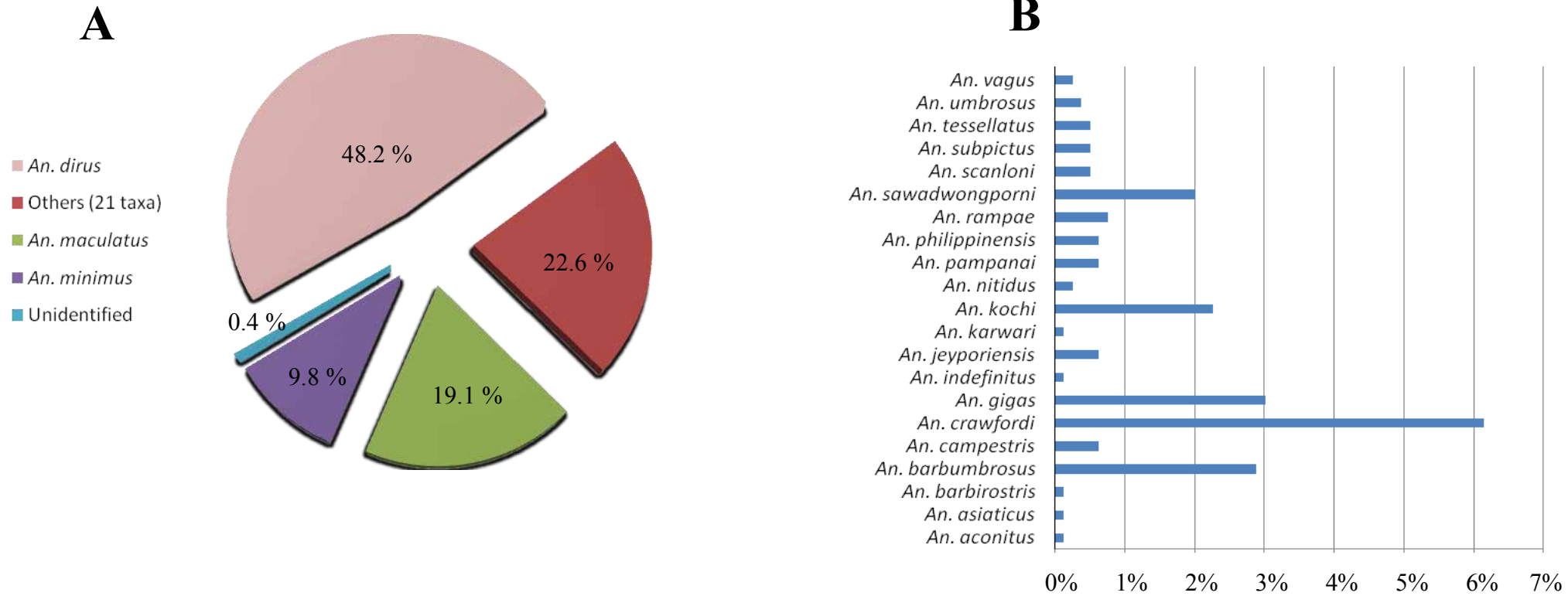
B - Lane: 10, 11-positive control of *An. dirus* (562bp)and *An. scanloni* (349-352bp), respectively; 9 - 1kb plus ladder; 17 - negative control; 6 - Sample identified as *An. scanloni*; 1- 5, 7,8,12 – 16 - Samples identified as *An. dirus*.



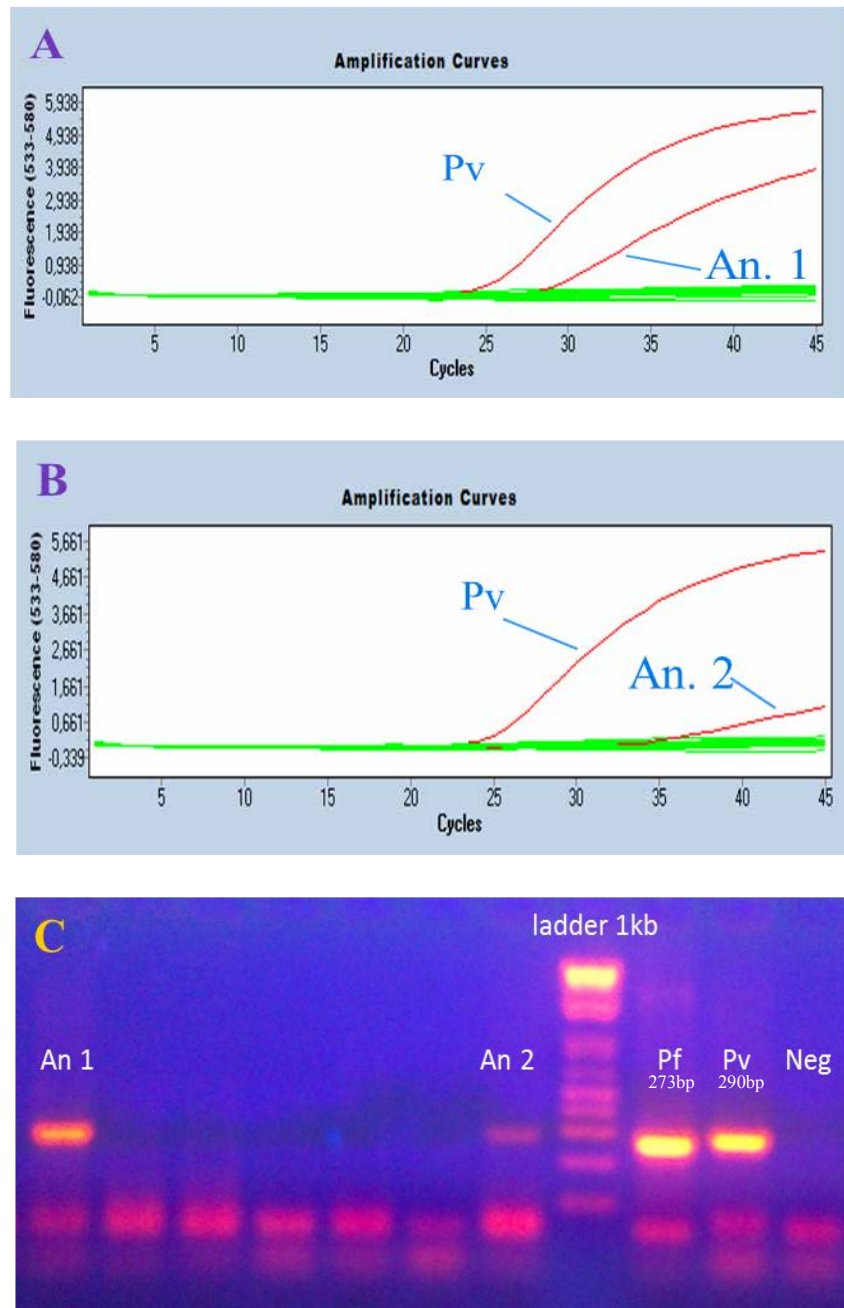
C - Lane: 8, 9-positive control of *An. maculatus* (180bp) and *An. sawadwongporni* (242bp), respectively; 7-1kb plus ladder; 13-negative control; 1 ,3, 4, 11-sample identified as *An. sawadwongporni*; 10-sample identified as *An. maculatus*; 2, 5, 6, 12 - samples identified as *An. rampae*.

**Figure 2:** *Anopheles* species composition in Southern-central Vietnam based on molecular identification for complex or group of species.

(A), Prevalence of the malaria vectors and other taxa; (B) Percentage of each species within the 21 taxa displayed in (A)



**Figure 3:** Amplification curves in multiplex rtPCR for both positive specimens (A, B). (A) An. 1, *Anopheles dirus*; (B) An. 2, *Anopheles pampanai*; and amplification of cytochrome oxidase cox I fragment by conventional PCR (C) of *Plasmodium vivax* detected in *Anopheles* samples collected in Vietnam. Pf, Pv-positive controls of *P. falciparum* and *P. vivax*; Neg-negative control; kb-kilobases.



## IV. Discussion

### **Intérêt de la méthode d'identification moléculaire dans la recherche sur les anophèles**

L'identification des espèces d'anophèles est importante pour évaluer le rôle de chaque espèce dans la transmission d'agent pathogène, surtout dans le genre *Anopheles* qui comprend de nombreux complexes d'espèces jumelles ou de groupes avec des espèces morphologiquement et génétiquement très proches, voire indifférenciables sur la base de caractères morphologiques. Un complexe peut contenir plusieurs espèces jumelles qui ne sont pas toutes impliquées dans la transmission d'agent pathogène. Un complexe peut même être composé d'espèces considérées comme des vecteurs majeurs, d'autres des vecteurs secondaires et enfin des espèces non vectrices. Pour ajouter à cette complexité dans l'identification des espèces d'*Anopheles*, des individus d'une même espèce peuvent présenter des variations de caractère morphologique [80,95-98,140] qui vont introduire des erreurs d'identification [113,141,142]. Ainsi, les méthodes moléculaires de type PCR (PCR conventionnelle, rtPCR, RFLP-PCR) sont essentielles pour éviter les erreurs d'identification morphologique [78,79,81,121,122]. Dans cette thèse, l'application des méthodes de taxonomie moléculaire a permis d'identifier deux espèces d'*Anopheles*, *An. scanloni* et *An. rampae*, qui avaient été morphologiquement identifiées comme étant respectivement *An. dirus* et *An. maculatus* (voir l'article 2). En zone forestière, *An. dirus* est considéré comme le vecteur primaire d'agents du paludisme (« *forest malaria* »), suivi d'*An. maculatus*, vecteur secondaire au Vietnam [45,55]. Par contre, le rôle vecteur d'*An. scanloni*, identifié pour la première fois au Vietnam et *An. rampae* encore peu étudié, est totalement inconnu et les données actuelles disponibles en Thaïlande, au moins sur *An. scanloni*, laissent supposer que cette espèce pourrait localement être impliquée dans la transmission du paludisme.

Une autre partie de ma thèse concernant l'identification morphologique et l'analyse phylogénétique d'*An. crawfordi* et *An. dangi*, a permis de clarifier le statut taxonomique d'*An. dangi* identifié comme un synonyme d'*An. crawfordi* (voir l'article 1). Ce résultat est en accordance avec ceux de Paredes et al. [142] qui concluent qu'il est indispensable de réaliser des études phylogénétiques pour clarifier la relation des espèces du Groupe Hyrcanus et leur distribution [142].

### **Biodiversité des anophèles au centre-sud Vietnam**

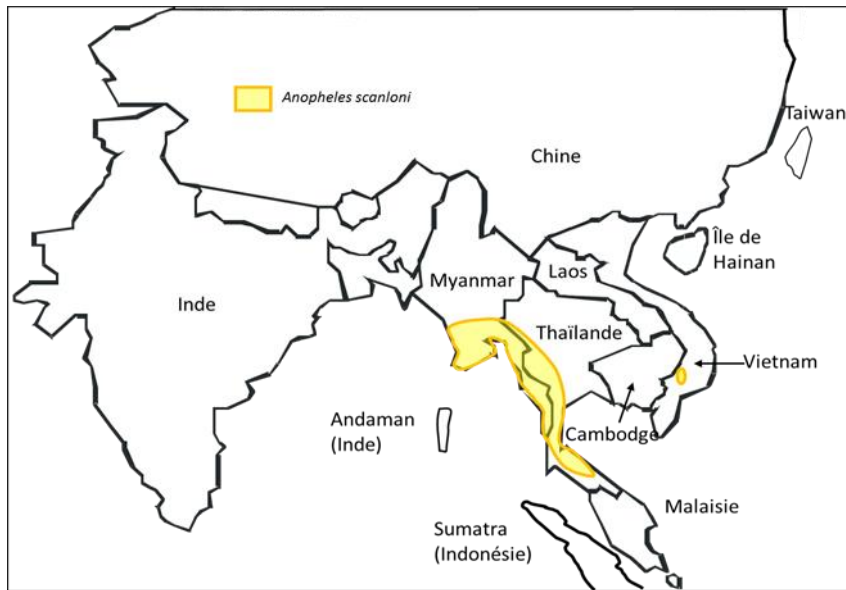
La faune anophélienne du Vietnam, comme dans d'autres pays d'Asie du Sud-est, a une très grande biodiversité, et comprend plusieurs groupes et complexes d'espèces. Sur les 25



complexes d'espèces répertoriés dans le monde, près de la moitié se trouve en Asie (44%) [9,120]. Les caractères morphologiques de ces espèces, en particulier celles appartenant à des complexes, ne sont pas fiables et ne peuvent pas les différencier. Deux des principaux vecteurs majeurs connus en Asie du Sud-est sont *An. dirus* et *An. minimus*, mais plusieurs autres espèces participent aussi à la transmission d'agents du paludisme, tels que: *An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, *An. sinensis*, *An. aconitus*, *An. pampanai*, *An. harrisoni*, *An. peditaeniatus*, *An. philippinensis* [24,55,57,60,64] (Tableau 1). Au sein du Complexe Dirus, qui comprend actuellement 8 espèces, dont 2 vecteurs majeurs, *An. dirus* et *An. baimaii*, l'espèce jumelle *An. scanloni* est considérée comme un vecteur local en Thaïlande et il n'y a aucune étude sur cette espèce en dehors de ce pays, bien que sa distribution s'étende au sud du Myanmar [4,84,143]. En Thaïlande, la distribution de cette espèce n'est pas continue, elle est étroitement liée aux zones karstiques présentes le long de la côte est de la Péninsule Thaïlandaise [144]. Notre étude est la première à montrer la présence d'*An. scanloni* au Vietnam, ce qui étend considérablement sa distribution vers l'est (Figure 8). Des études précises sur le Complexe Dirus devront être effectuées à l'est de la Thaïlande et au Cambodge surtout en régions karstiques pour déterminer si la distribution de cette espèce forme ou non une sorte de continuum vers l'est. La présence d'*An. scanloni* au Vietnam porte à 2, avec *An. dirus*, le nombre d'espèces de ce complexe dans ce pays.

L'espèce *An. rampae*, collectée durant notre étude, fait partie du Groupe Maculatus représenté par 3 espèces au Vietnam avec *An. maculatus* et *An. sawadwongporni*. Le Groupe Maculatus comprend 9 espèces qui ont des caractères morphologiques très proches et peuvent entraîner des erreurs d'identification morphologique [9]. Le rôle vectoriel de certains membres du Groupe Maculatus dans la transmission d'agents pathogènes a été reconnu dans plusieurs pays comme l'Inde, le Népal, le Tibet, la Thaïlande, la Péninsule Malaise, l'Indonésie et les Philippines où sévissent 2 espèces endémiques [4,145-147]. *An. maculatus* et *An. sawadwongporni* ont également été incriminés dans la transmission d'agents du paludisme au Vietnam [55,57,59,60,64]. Bien que le nombre de spécimens collectés d'*An. scanloni* (n=4) et *An. rampae* (n=6) soit très limité, notre étude montre une fois de plus l'importance de l'utilisation systématique de méthode d'identification fiable pour distinguer les espèces d'anophèles, en particulier les espèces jumelles. Ces résultats suggèrent aussi la nécessité de faire des études approfondies sur la présence et le rôle vectoriel de ces deux espèces dans la transmission de parasites au Vietnam.

**Figure 8** : Distribution actuelle d'*Anopheles scanloni* (Complexe Dirus)



Hormis *An. scanloni*, notre étude a permis de confirmer la présence de 23 espèces d'anophèles au centre-sud Vietnam [45,55,57,60,64,85,86,148]. Dak Nong et Binh Phuoc ont montré aussi bien une diversité commune aux 2 provinces, qu'une diversité propre à chacune probablement liée à l'environnement de chaque province. Ces 2 provinces voisines ont des conditions climatiques similaires qui peuvent favoriser le développement des 8 taxons communs d'*Anopheles*. Cependant, les forêts de la commune de Dak Ngo – Province de Dak Nong, sont principalement formées de grandes plantations de café, de poivre, de noix de cajou ou manioc, la population vivant à proximité de la plantation pour faciliter les activités agricoles. Cette agriculture intensive utilise de nombreux insecticides et pesticides agrochimiques et un système de barrage a été construit pour l'irrigation (Ngo C.T., observation personnelle). Ces changements anthropiques et écologiques peuvent influencer la répartition des espèces d'anophèles. Contrairement à Dak Ngo, la commune de Bu Gia Map - Province de Binh Phuoc, est essentiellement couverte de forêt primaire avec des cours d'eau naturel ombragé (Ngo C.T., observation personnelle). Cet environnement forestier tropical et non perturbé favorise le développement de vecteurs majeurs du paludisme, tels qu'*An. minimus* et *An. dirus* [5,59,60,91]. Ces différences peuvent expliquer la prédominance d'*An. dirus* et *An. minimus* à Binh Phuoc tandis qu'*An. maculatus* était dominant à Dak Nong.

## Rôle vectoriel des anophèles dans la transmission de parasites

Au Vietnam, les agents pathogènes des deux maladies parasitaires, le paludisme et la filariose lymphatique de Bancroft, peuvent être transmis par des moustiques du genre *Anopheles*. Malgré le succès des programmes de lutte contre ces deux maladies, un des problèmes qui reste à résoudre est le contrôle des vecteurs qui doivent faire l'objet d'une surveillance régulière dans les zones endémiques [6,7]. Parmi les 24 espèces d'anophèles identifiées dans les Provinces de Dak Nong et de Binh Phuoc, 9 étaient capables de co-transmettre *Plasmodium* spp. et *Wuchereria bancrofti*, dont *An. aconitus*, *An. barbirostris*, *An. dirus*, *An. maculatus*, *An. minimus*, *An. philippinensis*, *An. subpictus*, *An. tessellatus* et *An. vagus* [3]. Notre échantillonnage de 765 spécimens nous a permis de détecter 2 individus infectés par *Plasmodium vivax*, 1 *An. dirus* et 1 *An. pampanai*, ce qui représente un taux d'infection global de 0,26% (2/765) sur le total de notre échantillonnage. Les 2 spécimens positifs ayant été collectés à Binh Phuoc, ce taux s'élève à 0,41% (2/486) dans cette province. Par espèce, le taux d'infection est de 0,28% pour *An. dirus* (1/361) et de 20% pour *An. pampanai* (1/5). Aucun spécimen infecté par *Wuchereria bancrofti* ou d'autres espèces de *Plasmodium* étudiées, comme *P. falciparum* et *P. knowlesi*, n'a été trouvé. Notre résultat est conforme à ceux rapportés par Nguyen [75] qui a effectué une étude sur le statut de la FLB dans la Province de Khanh Hoa signalant qu'il y avait 3,64% de la population étudiée qui était infectée. Toutefois, aucun anophèle sur les 144 *An. vagus* disséqués n'était infecté par *W. bancrofti*. Comme le Vietnam est considéré comme un des pays en phase de pré-élimination de la filariose lymphatique depuis 2011, nos résultats apportent des éléments d'information utile dans l'évolution de la filariose lymphatique de Bancroft au Vietnam.

Les cas de paludisme au Vietnam sont principalement dus à *P. falciparum* (66 %), suivi par *P. vivax* (34 %), tandis que *P. malariae* et *P. ovale* sont rarement détectés [6]. Les cas infectés par *P. knowlesi* ont été signalés au centre-sud Vietnam [38]. De plus, un fort taux d'infection asymptomatique de paludisme a été reconnu pouvant atteindre plus de 80% [35]. Cette forte proportion semble indiquer que la transmission est suffisamment intense pour stimuler l'immunité partielle qui est capable de contrôler la parasitémie et empêcher son évolution vers les signes cliniques.

Récemment, l'indice sporozoïtique d'*An. dirus* et *An. minimus* a été rapporté dans différentes régions, allant du nord au sud du Vietnam [24,45,55,60,64], et ces études font état du rôle majeur que jouent ces 2 espèces dans la transmission du paludisme au Vietnam, malgré des variations selon les localités et les enquêtes. En dehors de ces 2 vecteurs primaires, ces

différents auteurs ont également indiqué l'implication possible de plusieurs autres espèces, dont *An. pampanai* [24,34,55,57]. Le taux d'infection à *P. vivax* de nos spécimens de la Province de Binh Phuoc était de 0,41%, ce taux est supérieur à ceux rapportés en 2010 par Do et al. de 0,24 % (9/3770) pour des spécimens de Khe Ngang (Province de Quang Binh) [64] et de 0,08% (13/16160) pour des spécimens de 7 espèces d'*Anopheles* collectés au Vietnam et au Cambodge [136]. Cependant, ce taux d'infection à *P. vivax* est plus faible que ceux rapportés par Marchand et al. [24] de 0.76% soit 43/5663 *An. dirus* collectés à Khanh Phu – Province de Khanh Hoa et Trung et al. [45] de 0.83% (3/361) pour *An. minimus* in Lang Nhot – Province de Khanh Hoa. En conclusion, notre étude montre que les espèces infectées, *An. dirus* et *An. pampanai*, sont clairement des vecteurs du paludisme dans la région concernée. En conséquence, le paludisme dans la Province de Binh Phuoc peut être transmis non seulement par des vecteurs majeurs comme *An. dirus*, mais aussi par des vecteurs secondaires, comme *An. pampanai*. Marchand et al. [24] a déclaré qu'il y avait environ 0,55% (31/5663) des spécimens d'*An. dirus* infectés par *P. knowlesi* à Khanh Phu - Province de Khanh Hoa (12° 14'N 108° 56') située au centre Vietnam. Comparativement, nous n'avons trouvé aucun *Anopheles* infecté par ce parasite, le même résultat a été obtenu avec *P. falciparum*. Parmi des *Anopheles* prélevés dans la Province de Dak Nong, aucun spécimen n'était infecté, même les spécimens d'*An. dirus* étaient négatifs, probablement dû au petit échantillonnage collecté (n=23), tandis que des cas de paludisme sont régulièrement signalés dans cette province. Toutefois, dans une étude similaire effectuée en 2007 dans la Province de Dak Nong, nous avons trouvé 2,03% (5/246) des anophèles collectés infectés par *P. vivax* en appliquant la PCR de Cunha et al. [128], les espèces de moustiques infectés étaient *An. minimus* (3/76) et *An. maculatus* (2/22) (résultat non publié). Une étude plus approfondie sera nécessaire pour évaluer le rôle vectoriel des espèces d'*Anopheles* dans ces provinces.

## **PARTIE II: Biodiversité de la flore bactérienne de l'estomac d'*Anopheles* du centre-sud du Vietnam**

# I. Introduction

## 1. Flore bactérienne chez les espèces d'*Anopheles* du Vietnam

Le contrôle du paludisme s'appuie à la fois sur le diagnostic précoce et la thérapie (prévention et traitement), mais aussi sur la lutte antivectorielle basée sur les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée (MII) et les pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent (PII) [6]. L'efficacité de cette stratégie de lutte antivectorielle a fait ses preuves au Vietnam [42]. Cependant, après plusieurs années d'application, la résistance des anophèles aux insecticides a été constatée dans 64 pays dans le monde dont le Vietnam [6,8,29,149,150]. De plus, l'utilisation seule des insecticides, dans les régions les plus fortement endémiques d'Afrique et du Pacifique, ne peut pas interrompre la transmission du paludisme [151]. Par conséquent, la recherche d'approches novatrices comme la lutte biologique utilisant des bactéries symbiotiques attire l'intérêt des chercheurs.

Les recherches montrent que de nombreux insectes contiennent une grande et diverse communauté de microorganismes qui dépasse probablement le nombre de cellules de l'insecte lui-même [152]. L'ensemble des études faites sur les spécimens d'*Anopheles* collectés sur le terrain ou élevés au laboratoire a permis de répertorier 98 genres bactériens identifiés dans l'estomac des moustiques, sans compter les genres en faible abondance identifiés par séquençage à haut-débit. Parmi eux, 41 genres ont été trouvés dans plusieurs espèces d'*Anopheles*. *Pseudomonas* a été le genre le plus fréquemment indiqué, suivi par *Aeromonas*, *Asaia*, *Comamonas*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* et *Serratia* [153]. Le nombre de bactéries isolées varie non seulement entre les individus, mais aussi au cours de la vie du moustique, selon le stade de développement et la charge bactérienne du sang dont se nourrissent les moustiques [154].

La flore microbienne de l'abdomen de moustiques qui a été décrite fait état de la présence de nombreux bacilles Gram négatifs, y compris *Serratia marcescens*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. [16]. Récemment, trois études de métagénomique ont fourni un tableau encore plus complet de la diversité de la microflore de l'abdomen d'*An. gambiae*, vecteur majeur du paludisme en Afrique [20,155,156]. Les travaux effectués sur des *Anopheles* adultes de terrain ont montré la présence de *Pseudomonas* et *Aeromonas* dans au moins 5 espèces de vecteurs du paludisme de 3 continents différents dont, *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus* en Afrique sub-saharienne, *An. stephensi* en Asie et *An. darlingi* d'Amérique Latine [17,18,154,155,157,158]. Trois espèces de bactéries spécifiques des anophèles ont été isolées de l'estomac de 2 espèces du Complexe Gambiae

(*An. gambiae*, *An. arabiensis*), tels que *Thorsellia anophelis* [159], *Janibacter anophelis* [160] et *Elizabethkingia anophelis* [161]. La première de ces trois espèces représente un nouveau genre et elle est l'espèce prédominante dans l'estomac des spécimens d'*An. arabiensis* collectés au Kenya [17], tout comme *Janibacter anophelis* isolée dans la même espèce d'*Anopheles*. La troisième espèce, nouvellement décrite, est étroitement liée à *Elizabethkingia meningoseptica* avec laquelle elle a 98,6 % de similarité. Les deux espèces ont été trouvées chez *An. gambiae* [161,162]. Cette dernière espèce, *E. meningoseptica*, a été isolée à la fois chez des oiseaux malades, des grenouilles, des tortues et des chats, étant très probablement un agent d'infections zoonotiques, mais aussi chez des nouveau-nés provoquant des cas de méningite [163]. Récemment, le cas d'un jeune adulte infecté dans un centre hospitalier par une souche multi-résistante d'*E. meningoseptica* a aussi été mentionné en Inde montrant que cette bactérie peut provoquer des infections nosocomiales [164]. Les bactéries du genre *Asaia* ont également été associées aux anophèles de terrain, en particulier *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. coustani* [155], *An. maculatus* et *An. harrisoni* [93], ainsi qu'*An. stephensi* maintenu en insectarium dans lequel *Asaia* était la bactérie dominante et associée de façon stable [165]. La présence d'*Asaia* chez les anophèles pourrait servir de candidat pour la lutte contre le paludisme grâce à la production de molécules antiparasitaires chez les moustiques para-transgéniques [154,165,166]. Une autre espèce bactérienne, *S. marcescens*, a aussi été définie comme pouvant être un agent antipaludique grâce à sa production de pigment de type prodigiosine [15,16,167,168].

## **2. Rôle des bactéries des *Anopheles* dans le développement de parasites**

Parallèlement aux études de caractérisation de la flore bactérienne de l'estomac des *Anopheles*, un nombre croissant de travaux de laboratoire sont effectués sur l'interaction de certaines bactéries et les *Plasmodium* afin de trouver des bactéries candidates favorisant la résistance des *Anopheles* vecteurs au développement de *Plasmodium*. Cette nouvelle approche pourrait être une nouvelle stratégie de contrôle du paludisme.

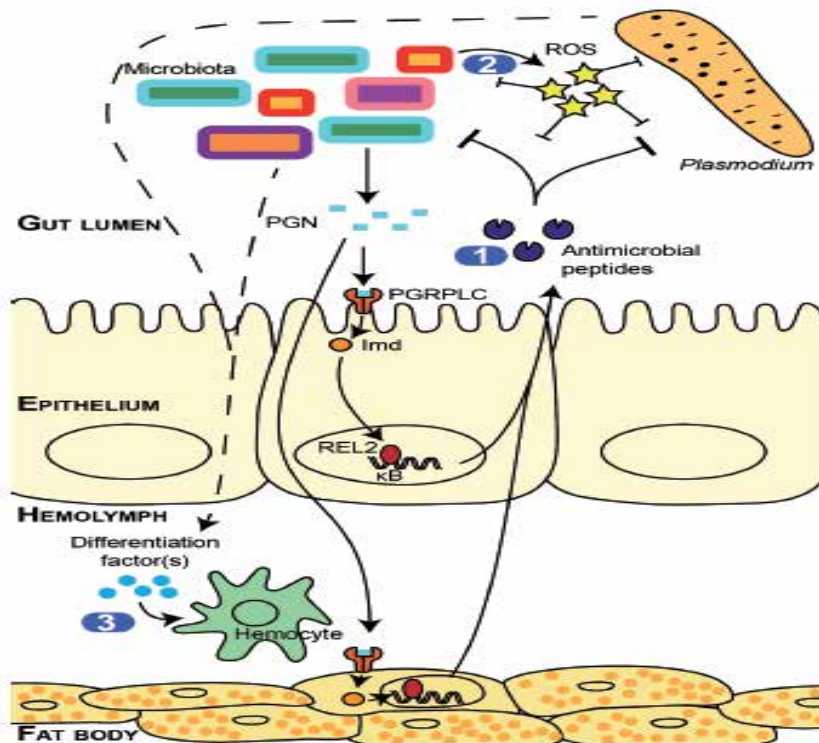
De récentes études ont signalé la présence de bactéries symbiotiques, telles que *Pantoea agglomerans* ou *Asaia* qui produisent les protéines anti-*Plasmodium* efficaces permettant au moustique-hôte de devenir réfractaire à l'infection palustre [19,169,170]. Les souches de *P. agglomerans* génétiquement modifiées étaient capables d'inhiber le développement de *P. falciparum* de 98 % [170]. D'autres études ont montré que les insectes avec une flore microbienne importante semblent plus résistants aux infections et certaines bactéries, comme *Enterobacter* sp. (Esp Z), inhibent partiellement ou totalement la formation des ookinètes,

oocystes et sporozoïtes [12,15,16]. Chez *An. albimanus*, la co-infection de *P. vivax* et *Serratia marcescens* aboutit à la formation de seulement 1% de moustiques infectés avec présence d'oocystes, comparé à 71% des moustiques infectés par *P. vivax* en l'absence de bactéries [14]. A partir d'une étude de méta-taxogénomique, Boissière et al. [20] ont décrit les communautés microbiennes de l'estomac d'*An. gambiae* infecté par *P. falciparum*, puis ils ont comparé cette communauté bactérienne des individus infectés à ceux qui n'étaient pas infectés pour évaluer les liens entre la flore microbienne et l'infection parasitaire. Les auteurs ont trouvé une corrélation significative entre la haute teneur en entérobactéries et l'infection palustre. Malgré des résultats contradictoires sur le rôle des entérobactéries, il est clairement établi que les bactéries présentes dans les populations d'anophèles ont une grande influence sur le développement et la transmission de parasites [12,13,20,171].

Dans une analyse récemment publiée, Gendrin et Christophides [153] ont constaté qu'il existe un aspect de la microflore des anophèles qui a reçu beaucoup d'intérêt, il s'agit de la résistance des bactéries à l'infection due à *Plasmodium*. Trois scénarios sont proposés pour expliquer le mécanisme de cette résistance contre *Plasmodium* développé par certaines bactéries des anophèles (Figure 9): (1) la croissance bactérienne après un repas de sang induit, entre autre, une signalisation conduisant à la synthèse de peptides antimicrobiens (cas d'*An. gambiae* présenté par Meister et al. [172] ); (2) la souche EspZ, appartenant aux *Enterobacter*, isolée chez des individus sauvages d'*An. arabiensis*, a montré qu'elle affectait directement le développement de *Plasmodium* dans l'estomac du moustique à cause de la synthèse élevée d'espèces bactériennes réactives à l'oxygène (ROS), comme en attestent les résultats obtenus par Cirimotic et al. [15]; et (3) l'infection à *Plasmodium* est sous la dépendance de l'immunité développée par les anophèles sous l'influence de la flore microbienne. Cette immunité, qui protège les moustiques contre des réinfections de *Plasmodium*, a recours à la différenciation hémocytaire [173].

Ces résultats d'étude en laboratoire, sur l'implication de la flore bactérienne contre le développement de *Plasmodium* chez l'anophèle, sont vraiment encourageants et ils montrent la possibilité de nouvelles approches biologiques prometteuses dans le contrôle de paludisme. Il est donc nécessaire de continuer ces études afin de les compléter, les approfondir et pouvoir les appliquer à l'extérieur du laboratoire.





**Figure 9** : Mécanismes de résistance conférée par des bactéries des *Anopheles* contre l'infection due à *Plasmodium*. 1 — Effet direct via la synthèse de ROS par *Enterobacter* souche EspZ (1). 2 — Effet indirect via l'induction de réponses antibactériennes NF-κB qui ont des effets antiparasitaires (2). C'est le mécanisme le plus commun. 3 — Induction de la différenciation des hémocytes par des facteurs solubles de l'hémolymphe pendant l'infection due à *Plasmodium* (3) [153].

### 3. Exploration moléculaire de la flore bactérienne

Les communautés bactériennes sont classiquement étudiées grâce à des méthodes de culture de colonies isolées sur milieu solide, parfois après enrichissement pour la croissance des bactéries dans un milieu liquide. Mais il est évident que cette approche pour l'étude des bactéries symbiotes chez les insectes n'a pas permis d'identifier les bactéries non-cultivables réduisant d'autant la diversité microbienne présente chez les anophèles, qui se trouve de ce fait mal représentée par la méthode de culture. En réalité, la culture n'a permis de découvrir que moins de 1% de la diversité bactérienne dans des échantillons environnementaux [174]. Toutefois, certaines méthodes moléculaires représentent des outils puissants qui aident à mieux comprendre les associations de l'insecte avec les micro-organismes et à divulguer de nouveaux systèmes symbiote-hôte. La démarche méta-génomique donne le contenu génétique total d'une communauté, fournissant ainsi des données sur la biodiversité bactérienne, mais aussi sur les fonctions et les interactions diverses [175]. Après l'étude de la biodiversité,

l'approche métagénomique peut se concentrer sur un seul gène commun partagé par tous les membres de la communauté. Cette méthode, indépendante de la culture qui est la plus utilisée, repose actuellement sur l'amplification et l'analyse de la séquence du gène 16S ARNr des bactéries [176]. Ce gène a été choisi car il bénéficie à la fois de régions bien conservées favorisant la construction d'amorces universelles, mais aussi de régions très variables servant à l'identification des espèces [177]. Les caractéristiques du gène 16S ARNr ont permis d'élargir son application non seulement dans les recherches phylogénétiques, systématiques et d'identification, mais aussi dans la recherche écologique associée aux bactéries [178]. Parmi les recherches sur la communauté bactérienne des *Anopheles*, plusieurs résultats ont été obtenus après amplification du 16S ARNr, tels que Boissière et al. [20] sur *An. gambiae* du Cameroun, Chavshin et al. [18] sur *An. stephensi* d'Iran, Djadid et al. [21] sur *An. stephensi* et *An. maculipennis* d'Iran, et notre étude sur 5 espèces du Vietnam et 7 de Thaïlande [93].

La PCR-TTGE est une technique, basée sur la migration différentielle sur un gel dénaturant de fragments d'ADN, cette technique permet de séparer les fragments d'ADN dans un gradient temporel de la température [179,180]. Les produits de la PCR de même taille, mais avec différentes séquences, sont séparés dans un gel d'acrylamide dénaturant, où l'ADN dénaturé aura des régions discrètes de fusion, chacun d'entre eux affichant une température de fusion spécifique à sa séquence. Lorsque la température de fusion ( $T_m$ ) de l'amplicon entier est atteinte, l'ADN dénaturé va créer des molécules ramifiées. Cette ramification réduit la migration de l'ADN dans le gel. Par conséquent, les amplicons de même taille, mais avec différentes compositions nucléotides peuvent être séparés grâce aux différences dans le comportement de leurs domaines de fusion. Lorsque l'ADN d'une communauté complexe est extrait et amplifié, la TTGE conduit à la séparation entre les amplicons différents et produit un modèle de bande caractéristique de la communauté. Le comptage des bandes sur le profil TTGE fournit un score sur la diversité qui correspond approximativement au nombre d'espèces moléculaires de l'échantillon. Le profil des bandes peut subir une analyse plus poussée par migration de distance des bandes de mesure et en les comparant à des critères d'espèces connues. Cette comparaison permet d'affilier les bandes aux quelques espèces représentatives. L'affiliation de toutes les bandes est possible par le découpage des bandes du gel de TTGE, suivi de l'extraction de l'ADN à partir des bandes et séquençage. L'association de la méthode mesurant des distances entre les bandes migrées et le séquençage des groupes sélectionnés a montré son efficacité dans la description des communautés bactériennes de faible complexité, telles que la microflore intestinale des nouveau-nés [180]. C'est une

approche assez simple et rentable d'étude des communautés bactériennes sur une large gamme d'échantillons [181].

## **II. Biodiversité de la flore bactérienne des espèces d'*Anopheles* de la Province de Dak Nong par culture et méthode moléculaire**

Au Vietnam, le contrôle du paludisme a obtenu de nombreux succès, surtout dans le nord du pays, mais la transmission du paludisme continue encore dans les régions forestières et frontalières. Le contrôle de cette maladie passe actuellement par la lutte antivectorielle qui est basée sur l'utilisation d'insecticides. Toutefois, de nouvelles approches sont nécessaires car les résistances aux insecticides risquent de compromettre les avancées obtenues dans la lutte contre le paludisme. Une des approches innovantes concerne l'étude de la flore bactérienne des *Anopheles* comme décrite plus haut. Dans le cadre de cette thèse, l'exploration de la flore bactérienne a été réalisée sur des populations d'*Anopheles* du centre-sud Vietnam. Ce paragraphe présente les résultats obtenus dans l'étude réalisée dans la Province de Dak Nong. Les résultats présentés dans le troisième article de cette thèse ont été obtenus après analyse de 100 *Anopheles* femelles sauvages appartenant à 5 espèces dont *An. barbumbrosus*, *An. crawfordi*, *An. dirus*, *An. gigas* et *An. maculatus*, collectées dans la commune de Dak Ngo – Province de Dak Nong au Vietnam. Les abdomens de ces moustiques ont servis pour les deux approches :

(i) la culture bactérienne a été effectuée à partir de 52 spécimens sur 100, utilisant 3 milieux de culture (agarose R2A, gélose au sang ou à acétobacter), suivie par l'amplification d'une séquence presque entière du gène 16S avec les amorces universelles 27f décrite par Lane et al. [182] et 1492r décrite par DeLong et al. [183]. Les analyses des séquences ont été faites avec Blast nucléotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et SeqMatch (<http://www.rdp.cme.msu.edu/>), l'étude phylogénétique avec la méthode de Maximum de Vraisemblable pour affilier les souches isolées aux niveaux taxonomiques;

(ii) l'approche moléculaire, indépendante de la culture bactérienne, appliquée à 100 spécimens, a commencé par l'extraction de l'ADN génomique à partir de l'homogénéisation de chaque abdomen de moustique dans l'eau purifiée, stérilisée et sans ADN, utilisant le kit « Master pure Gram positive DNA purification kit ». Cette phase est suivie par l'amplification de la séquence de la région V2-V3 du gène 16S ARNr avec les amorces HDA1 et HDA2

décrites par Roudière et al. [180], dont l'amorce HDA1 a été élongée en attachant la queue riche en GC à l'extrémité 5' selon Ogier et al. [179]. La séparation des fragments de produits PCR est effectuée dans un gel d'acrylamide par méthode TTGE. Les fragments d'ADN des bandes découpées du gel d'acrylamide sont alors élués dans 50µl de tampon d'éluion et amplifiés avec les amorces HDA1 et HDA2 avant l'envoi au séquençage. Les séquences obtenues ont été analysées et affiliées aux UTOs (Unités Taxonomiques Opérationnelles) grâce au programme de Blast nucléotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et de SeqMatch (<http://www.rdp.cme.msu.edu/>).

Les résultats de cette étude sont très encourageants car ils ont montré que la flore bactérienne de l'estomac des anophèles de la Province de Dak Nong est très diverse avec la présence de 47 UTOs bactériennes, dont des bactéries considérées comme ayant une implication dans la réduction du développement de *Plasmodium*. Cette étude a aussi montré l'intérêt de combiner des méthodes dont la culture bactérienne et la méthode moléculaire d'ADN fingerprint qui permettent de détecter plus de bactéries et de mieux évaluer la biodiversité de la flore bactérienne chez les anophèles.

**Article 3:** Characterization of midgut bacteria of wild caught adult *Anopheles* mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam using culture and DNA fingerprint. (Ngo et al. en préparation)

#### Résumé de l'article 3:

**Contexte :** La flore bactérienne de l'estomac des *Anopheles* vecteurs d'agents du paludisme peut augmenter leur immunité et bloquer le développement de *Plasmodium*. Un nombre grandissant d'études sont actuellement menées sur la biodiversité bactérienne chez des espèces d'*Anopheles* d'Afrique, en particulier, sur l'identification des bactéries pouvant bloquer la transmission du paludisme grâce à des bactéries génétiquement modifiées qui produisent des molécules anti-parasitaires ou approche paratransgénique. Le Vietnam est un pays endémique pour le paludisme et la filariose lymphatique de Bancroft, maladies dues respectivement à *Plasmodium* spp. et *Wuchereria bancrofti*, parasites pouvant être transmis par les mêmes vecteurs du genre *Anopheles*. Malgré l'intérêt décrit dans la littérature de certaines bactéries dans le contrôle de *Plasmodium*, cette étude représente la première analyse de la microflore bactérienne des espèces d'*Anopheles* du Vietnam.

**Méthode :** Deux approches complémentaires, la culture et la méthode de PCR-TTGE du gène 16S, ont été utilisées pour investiguer la biodiversité bactérienne de l'estomac de 5 espèces

d'*Anopheles*, collectées dans la Province de Dak Nong – Vietnam. Des méthodes moléculaires, séquençage et analyse phylogénétique ont été utilisés pour caractériser cette flore bactérienne.

**Résultats et discussion :** La flore bactérienne des 5 espèces d'*Anopheles* collectées à Dak Nong – Vietnam était diverse avec la présence de 47 OTUs bactériennes appartenant à 30 genres, notamment des genres bactériens qui sont impliqués dans la résistance des anophèles au développement de *Plasmodium*. Les bactéries identifiées étaient affiliés à 4 Phyla : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*, ce dernier étant le phylum dominant. Dix-sept genres bactériens ont été décrits pour la première fois chez les *Anopheles*. La diversité bactérienne par spécimen était faible, allant de 1 à 4. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt de coupler 2 méthodes de culture et d'ADN fingerprint pour estimer la biodiversité de la flore bactérienne de l'estomac des espèces d'*Anopheles*.

**Conclusion :** Les populations d'*Anopheles* du centre-sud Vietnam contiennent dans leur estomac une flore bactérienne importante qu'il est intéressant d'étudier pour développer une nouvelle approche pour le contrôle de paludisme. La combinaison des 2 méthodes de culture et d'ADN fingerprint a permis une analyse plus complète de la communauté bactérienne de l'estomac des Anophèles collectés au centre-sud Vietnam.

**Mots clés:** *Anopheles*, moustique, flore bactérienne, paludisme, Dak Nong, Vietnam

## Characterization of midgut bacteria of wild caught *Anopheles* mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam using culture and DNA fingerprint

Chung Thuy Ngo<sup>1,2</sup>, Sylvie Manguin<sup>1</sup> and Estelle Jumas-Bilak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR-MD3, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France*

<sup>2</sup>*National Institute of Veterinary Research, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup>*University Montpellier 1, UMR 5119 ECOSYM, Equipe Pathogènes et Environnements, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France*

### Abstract

**Background:** Microbiota of *Anopheles* midgut can modulate vector immunity and block *Plasmodium* development. Investigation on the bacterial biodiversity in *Anopheles* and specifically on the identification of bacteria to be used in malaria transmission blocking, based on bacterial genetic changes to deliver anti-parasite molecules or paratransgenic approach, has been mainly conducted on malaria vectors of Africa. Vietnam is an endemic country for both malaria and Bancroftian lymphatic filariasis, two mosquito-borne diseases caused by *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti*, respectively. These two diseases can be transmitted by the same *Anopheles* vector species. No information on the microbiota of *Anopheles* mosquitoes in Vietnam was available.

**Method:** The culture dependent, using different medium and culture independent (16S rRNA PCR – TTGE) methods were employed to investigate the midgut bacterial biodiversity in 5 *Anopheles* species collected from Dak Nong Province, central-south Vietnam. Molecular methods, sequencing and phylogenetic analysis were used to characterize the microbiota.

**Results and discussion:** The microbiota of 5 wild-caught *Anopheles* species collected in Dak Nong – Vietnam was diverse with the presence of 47 bacterial OTUs belonging to 30 genera, including bacterial genera implicated in *Plasmodium* development. The bacteria were

affiliated to 4 phyla, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*, the latter being the dominant phylum. Seventeen bacterial genera were described for the first time in *Anopheles* mosquitoes. The bacterial diversity per specimen was low ranging from 1 to 4. The results showed the interest of pairing culture and fingerprint methods to better screen the bacterial community in the midgut of *Anopheles* mosquitoes.

**Conclusion:** Specimens of 5 *Anopheles* species from central-south Vietnam contained a diverse midgut bacterial flora that needs to be investigated in order to develop new malaria control approach. The combination of both culture and fingerprint methods allowed a complementary screening of the bacterial community in *Anopheles* mosquitoes.

**Keywords:** *Anopheles* mosquitoes, midgut bacterial flora, malaria, Dak Nong, Vietnam

## 1. Introduction

*Anopheles* mosquitoes can be vectors of human pathogens responsible of infectious diseases such as malaria and lymphatic filariasis, which represent a great public health challenge in many tropical countries. In Vietnam, malaria remains the most important vector-borne parasitic disease with a strong prevalence in forested regions, in particular along the international borders with Cambodia. The goal of the National Malaria Control Program (NMCP) to eliminate malaria by 2020 is based on the increase to 40 the number of provinces with no local malaria transmission, 15 provinces in elimination mode and 8 provinces in pre-elimination mode on a total of 63 provinces nationwide, as well as the elimination of all hyper-endemic provinces [1].

The parasite causing malaria in Vietnam is mostly *Plasmodium falciparum* (66%), along with *P. vivax* (34%) that may share the same *Anopheles* vector species with *Wuchereria bancrofti*, the pathogen nematode causing Bancroftian lymphatic filariasis (BLF), for which only little information is available [2]. These *Anopheles* vectors belong to complexes or groups of species with different involvement in the transmission of pathogens [3,4] causing difficulties for controlling these diseases [1].

Factors allowing the development of a pathogen to reach the infecting stage in a mosquito are poorly known. On the 539 species of mosquitoes recorded within the *Anopheles* genus [5], only 70 to 60 are able to transmit parasites responsible for malaria and BLF [2,6]. In vector-parasite interactions, the mosquito gut represents the first point of contact between parasites ingested and the vector epithelial surfaces. In the midgut, the parasites will have the opportunity to undergo their life cycle, but of the tens of thousands of *Plasmodium* gametocytes ingested by mosquitoes, less than five oocysts might be produced [7]. The factors responsible for this drastic reduction are still poorly understood. Recent studies showed that one of these factors concerns the primordial role played by the bacteria naturally present in mosquito midgut [8-12]. Then, there is a growing interest on bacterial biodiversity in *Anopheles* mosquitoes and particularly those based on the identification of bacteria to be used for malaria transmission blocking based on bacterial genetic changes to deliver anti-parasite molecules or paratransgenic approach [12-20].

Recent studies have been conducted to investigate bacterial species in field-collected *Anopheles* mosquitoes using culture-dependent and/or culture-independent approaches but all of these studies focused on the primary vector species [13,14,21-23] and no study on midgut bacteria in *Anopheles* mosquitoes from Vietnam combining these two methods have yet been recorded.



Our study was performed for characterizing midgut bacteria of 5 wild-caught *Anopheles* species collected in Dak Nong Province of Vietnam, using both culture-dependent and culture-independent (DNA fingerprint) methods.

## **2. Materials and methods**

### **Samples**

Specimens belonging to 5 *Anopheles* species, including *Anopheles barbumbrosus*, *An. crawfordi*, *An. dirus*, *An. maculatus* and *An. gigas*, were collected from 6 sites located in Dak Ngo Commune, Tuy Duc District, Dak Nong Province, Vietnam (11°59'N 107°42'E - central Highlands). These *Anopheles* specimens were collected between November and December 2010 during 10 consecutive nights using several methods, such as light trap capture, human landing catches, cow bait and resting capture.

*Anopheles* mosquito identification was morphologically done in the field by sorting out each taxon. Specimens that belonged to the Dirus Complex or the Maculatus Group were individually identified to species level using the appropriate PCR-based method as described by Walton et al (1999, 2007). Each individual was split in two pieces stored at -80°C until use, head-thorax for species identification and abdomen for midgut bacteria analysis. One hundred abdomens of wild-caught females were used for the bacterial study.

### **Bacterial culture and DNA extraction**

*Anopheles* abdomens were surface rinsed twice in sterilized DNA-free water, and each abdomen was thoroughly disrupted using a sterilized tissue crusher device in 150 µl of sterilized DNA-free water. Then, 10 µl of this suspension was spread on each culture medium plate: blood sheep agar, R2A and acetobacteria agar. The inoculated agar plates were incubated at 30-35°C during 72hrs and verified every 24hrs for bacterial growth. Bacterial isolates were transferred to Tryptic Soya Agar (TSA) plate and incubated at 30-35°C during 24hrs. Then, colonies were suspended in purified DNA free water until reached turbidity equal to McFarland N°5 (about  $1.5 \times 10^9$  bacteria/ml), boiled during 10 mins and frozen at -20°C for raw DNA extraction. Each bacterial isolate were stored at -80°C in TSA with 15% glycerol. Whole DNA was extracted from 100 µl of mosquito abdomen suspension using the Master Pure Gram Positive DNA purification kit as recommended by the supplier (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA). The purified and raw DNAs were kept at -80°C before further analyses.

### **PCR**

For PCR-TTGE experiments, the V2–V3 region of the 16S rRNA gene of bacteria was amplified using the primers HDA1/HDA2 [24] ; HDA1: 5'-ACTC CTA CGG GAG GCA GCA GT-3', HDA2: 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'. A 40-bp clamp, named GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') flanked the 5' extremity of HDA1 [25] in order to form HDA1-GC. PCR was performed using an Eppendorf thermal cycler® (Eppendorf, Le Pecq, France) and 0.5 ml tubes. The reaction mixture (50 µl) contained 2.5 units of Taq DNA Polymerase (FastStart High fidelity PCR system, Roche, Meylan, France), 0.2 mM of each primer and 1 µl of gut content DNA in the appropriate reaction buffer. Amplification was 95°C for 2 mins, 35 cycles of 95°C for 1 min, 62°C for 30 s, 72°C for 1 mins and 7 mins at 72°C for final extension. A nearly complete 16S rRNA gene sequence was amplified with DNA from the bacterial isolates as template using the universal primers 27f [26] and 1492r, as described [27]. PCR amplifications were checked by DNA electrophoresis in 1.5% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

### **Temporal Temperature Gel Electrophoresis**

Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) was performed using the DCode universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, Marne-la-Coquette, France) in gels that were 16 cm × 16 cm by 1 mm. The gels (60 ml) were composed of 8% (wt/vol) bisacrylamide (37.5:1), 7 M urea, 60 ml of N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), and 0.1% (wt/vol) ammonium persulfate. Gels were run with 1X Tris–acetate–EDTA buffer at pH 8.4. The 5 µl of DNA were loaded on gel with 5 µl of in house dye marker (saccharose 50%, Bromophenol Blue 0.1%) using capillary tips. Denaturing electrophoresis was performed at 46 V with a temperature ramp from 63°C to 70°C during 16 hrs (0.4°C/h), after a pre-migration of 15 mins at 20 V and 63°C. Gels were stained with ethidium bromide solution (5µg/ml) for 20 mins, washed with de-ionized water, viewed using a UV trans-illumination system (Vilbert-Lourmat, France) and photographed.

### **TTGE band sequencing and OTU affiliation**

TTGE bands were excised and the DNA was eluted with 50 µl of elution buffer (EB) of the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Courtabeuf, France) overnight at 37°C before PCR amplification with HDA1/HDA2 used without GC clamp. The reaction conditions were identical to those described above. PCR products were sequenced on an ABI 3730xl sequencer (Cogenics, Meylan, France). Each sequencing chromatograph was visually

inspected and corrected. The sequences were analyzed by comparison with Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Ribosomal Databases Project 2 (RDPII) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and Seqmatch programs, respectively. The sequence with the highest percentage was used for OTU affiliation. A sequence was affiliated to a species-level OTU when the percent of sequence similarity with the species type strain was above 99.0% [28]. This value is over the recognized cut-off value for the delineation of species [29], but warrants high stringency for species-level OTU affiliation. Below 99.0%, the sequence is affiliated to the genus of the reference sequence with the highest percentage. When several species reference sequences match equally, affiliation was done to the genus level or to a group of species if relevant. For example, sequence with 99.5% in similarity to both *Aeromonas caviae* and *Aeromonas hydrophila* was only assigned to the genus *Aeromonas*. The same rule was applied for the taxonomic level higher than the genus level if necessary. On each TTGE gel, about 50% of the bands were sequenced, the others being affiliated to an OTU by comparison of their migration distance with that of sequenced bands.

### **Phylogeny**

Sequences obtained herein and sequences selected from RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu>) were used for phylogenetic analysis. Sequences were aligned using the ClustalW program. Maximum-likelihood (ML) phylogenetic analysis was performed using Mega 5 software [30], the model being General Time Reversible plus gamma distribution plus invariable site. ML bootstrap support was computed on 100 re-interactions using Mega 5.

## **3. Results and discussion**

### **Taxonomic diversity of bacteria in the midgut of adults *Anopheles* caught in Dak Nong – Vietnam**

From 100 *Anopheles* specimens belonging to 5 species, 83% were positive for midgut bacteria in either PCR-TTGE or culture. No bacteria were detected in the midguts of 17 specimens including 6 *An. maculatus*, 4 *An. barbumbrosus*, 3 *An. dirus*, 2 *An. crawfordi* and 2 *An. gigas* for which the percentage of negative samples were 21.4%, 30.8%, 13.0%, 16.2%, and 8.3% respectively. In the current study, bacteria were detected in 83% of samples, this percentage is much higher than the one (15% of *Anopheles* mosquitoes from Kenya) reported by Lindh et al. [14]. However, this percentage of positive samples was lower than those reported by Boissière et al. [31] in a study in which they used pyrosequencing method to explore the

bacterial flora in midgut of *Anopheles gambiae* in Cameroon and detected bacteria in 100% of studied samples. They demonstrated that the infection prevalence of *An. gambiae*, collected from different areas in Cameroon, was influenced by the sampling site [31].

The bacterial flora of 100 *Anopheles* midguts, characterized by analyzing all sequences obtained by DNA fingerprint and culture method, showed its affiliation to 47 bacterial OTUs belonging to 30 genera (Table 1) of 17 families in the Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria*. Twenty out of 30 detected genera belonged to *Proteobacteria*, which were present in 73% of the specimens studied (Table 1). This result is in accordance with those recently reported by Rani et al. [22], Djadid et al. [19] and Boissière et al. [31], who concluded that *Proteobacteria* was the dominant phylum in midgut bacterial communities of *An. stephensi* collected in India, *An. stephensi* and *An. maculipennis* from Iran, and *An. gambiae* from Cameroon, respectively. Moreover, these four bacterial phyla reported here, have also been identified in *Anopheles* mosquitoes from Kenya [14], Iran [13,19], *An. gambiae* in Cameroon [31], even in *Aedes aegypti*, vector of Dengue virus [32], suggesting that at least a fraction of midgut microbiota is common to different mosquito species and genera.

Within the *Proteobacteria*, the genus *Acinetobacter* was dominant as present in 53% of the 100 studied samples, the second most encountered genus being *Novosphingobium* with 16% (Table 1). Of note, *Acinetobacter* was also mostly found in *An. gambiae* collected in Cameroon [31], as well as other *Anopheles* species collected from Iran, India, Kenya and Mali [13,22,33]. The genus *Novosphingobium* (*Sphingomonadaceae* Family) contains numerous environmental bacteria species known to be metabolically versatile and occupy different ecological niches [34-36]. *Novosphingobium* is reported herein for the first time, in the *Anopheles* midgut. As *Novosphingobium* is the second most found genus in wild-caught *Anopheles* from Vietnam, further study will be needed to know its association to the mosquito host and parasite pathogens. Related genera within *Sphingomonadaceae*, such as *Sphingomonas* and *Sphingobacterium*, have also been detected in the midgut of *An. gambiae* [17,31].

Beside these highly prevalent genera, intermediate prevalence was observed for *Staphylococcus* (5%), *Enhydrobacter* and *Thorsellia* (4%), and *Pseudomonas* (3%). *Thorsellia anophelis* was found in 4 specimens belonging to 2 *Anopheles* species, *An. crawfordi* (n=1) and *An. gigas* (n=3) (Table 1). This species has been isolated and described in 2006 as a new species from the midgut of *An. arabiensis* [37], this bacteria species has also been reported as the dominant bacterium in *An. gambiae* adults from Kenya [38]. Six genera

(*Brachy bacterium*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia*) displayed lower prevalence rate (2%), whereas the last 18 genera have been detected in only one specimen of the sample (Table 1). Among this minority genera, *Chryseobacterium* detected in one *An. barbumbrosus* specimen has been largely reported in other samples such as *Anopheles* from Kenya [23], *Anopheles* larvae and adults from Iran [13], and from other aquatic animals (fish) and habitats [39,40]. In fact, the latter studies considered that there is a direct link between the composition of midgut microbiota in adult mosquitoes and the bacterial richness of the native aquatic source [11,41].

Bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae* were identified from 10 specimens of 3 *Anopheles* species, *An. crawfordi*, *An. dirus*, and *An. gigas* (Table 1). These bacteria belonged to seven genera including *Enterobacter*, *Hafnia*, *Tatumella*, *Thorsellia*, *Serratia*, *Yersinia*, and *Klebsiella*. Within *Enterobacteriaceae* positive samples, one specimen of *An. crawfordi* was colonized with three enterobacterial genera such as *Serratia*, *Yersinia* and *Klebsiella* (data not shown). The genera *Enterobacter* [8,11,41] and *Serratia* [9,14,22] have been considered for their role in the development cycle of *Plasmodium* in the *Anopheles* vector. *Klebsiella* has also been isolated in the midgut of *An. gambiae* collected from Kenya and Mali [33].

Seventeen bacterial genera were detected in this study for the first time, they were not identified in *Anopheles* mosquitoes from the previous reports that have been reviewed by Manguin et al. [42]. This result suggests that the bacterial diversity associated to *Anopheles* midgut remains underestimated and some individuals of *Anopheles* population from Dak Nong - Vietnam displayed important microbiota diversity.

However, the diversity index (DI) that corresponded to the number of different OTUs per specimen was low ranging from 1 to 4. *An. crawfordi* microbiota displayed the highest bacterial diversity (DI = 1.9) but the diversity among the different *Anopheles* species did not differ significantly ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis test)(Table 1). The study by Rani et al. [22] on midgut bacterial diversity of lab-reared and field-collected *An. stephensi* (both larvae and adults) from India, reported 53 bacterial genera identified from the midgut with biodiversity index values ranging from 2.75 to 3.49 for field-collected mosquitoes. Regarding those reported by Rani et al. [22], the bacterial community of wild-caught *Anopheles* mosquitoes in Vietnam seems to present a lower diversity. This result is in agreement with the hypothesis that the biodiversity of midgut microbiota in *Anopheles* mosquitoes is influenced either by the environment where the mosquito was collected, or by the methods employed in detecting the microbial flora in the midgut of the *Anopheles* mosquito, or by both factors. And this influence of environment or the bacterial detection method may be observed not only in the

bacterial biodiversity of *Anopheles* population but also those of individual *Anopheles* mosquito.

### **Comparison of cultivable and molecular microbiota diversity**

Among the 100 specimens studied, 52 *Anopheles* belonging to five species were analyzed using both culture and 16S rRNA genes PCR-TTGE fingerprinting. The panel of culture media was chosen accordingly to the diversity previously described for *Anopheles* microbiota [14,31,42]. Only 13 samples (25%) gave positive culture. No positive sample was found for the 3 *An. dirus* specimens. TTGE fingerprinting appeared more sensitive for bacteria detection in *Anopheles* gut because TTGE pattern were observed in 26/52 (50%) samples. Culture-dependent and culture-independent methods gave congruent results for 4 positive and 16 negative. Twenty-two positive samples by PCR-TTGE were bacteria undetectable by culture whereas 9 positive samples by culture were negative by PCR-TTGE (data not shown). A total of 28 bacterial strains were isolated from the positive samples and subjected to identification by 16S rRNA gene sequencing. The size of the sequences ranged between 900 and 1,000 bp allowing species-level affiliation in most cases. Affiliations into taxonomic levels (species, genus, family, and phylum) are given in Table 2. *Microbacterium* (Phylum *Actinobacteria*) present in 6 isolates was the dominant genus of cultivable bacteria in *Anopheles* gut, then *Staphylococcus* (Phylum *Firmicutes*) (5 isolates) and *Brachybacterium* (Phylum *Actinobacteria*) (4 isolates) were the second and third genera most found, respectively (Table 2). Therefore, the 3 cultivable genera mostly represented in *Anopheles* midgut belonged to Gram-positive bacterial phyla, mainly *Actinobacteria* (Figure 1). A 16S rRNA gene sequences based phylogeny was reconstructed. The ML tree in Figure 2 showed the phylo-taxonomic position of the bacteria isolated in *Anopheles* midgut. Several isolates were mostly related to uncultured clones and few of them were related to newly described bacterial species [43-45] [46,47] (Figure 2).

On the same 52 samples, 39 sequences obtained from TTGE bands showed the bacteria classified into 13 OTUs of 12 genera belonging to 8 bacterial families. Out of 11 bacterial genera detected by culture-independent method (Table 1 and Figure 3), 7 (8 OTUs) belonged to *Proteobacteria*, a Gram-negative phylum that was also the dominant bacterial phylum detected by TTGE (Figure 1).

Among the 20 bacterial genera detected from 52 samples on which both culture and fingerprint methods were applied, there were only 3 common detected genera (*Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*), 9 and 8 genera were detected in using either culture-

dependent or culture-independent method, showing the importance of combining these two methods for increasing the detection a greater microbiota biodiversity.

Discordance between culture dependent and independent methods is in accordance with the results reported by Lindh et al. [14] who recognized that PCR-based method did not retrieve the genera found with the culture-dependent method conducted on midgut bacteria of two field-collected *Anopheles* species (*An. gambiae* and *An. funestus*) from Western Kenya. Herein, the discordances were observed at each taxonomic level even at the phylum level, particularly concerning Gram-negative and Gram-positive phyla, which contained bacteria clearly differing in their peptidoglycan layer structure [48]. This peptidoglycan layer causes Gram-positive bacteria to be more stable to the reaction of lysis buffer than the Gram-negative bacteria [49], particularly for *Actinobacteria* that owned an unusual cell envelope composition, characterized by the presence of a waxy cell envelope containing mycolic acids [50]. Despite that the cell wall lysis method we used was enhanced for Gram-positive lysis, one could hypothesize that partial cell lysis before DNA extraction introduced a bias in favor of Gram-negative bacteria leading to the under-presentation of Gram-positive phyla in DNA-based approach. Finally, each approach of the bacterial diversity presented potential biases, the non-cultivability being the more obvious but biases associated to molecular methods should also be considered.

For malaria control, many strategies have been put in place and malaria transmission blocking based on bacterial genetic changes to deliver molecule or paratransgenic approach is one of the newly developed strategy [51]. Several studies have been conducted on the characterization of the bacterial flora in the midgut of *Anopheles* mosquitoes in order to determine the bacterial candidate for blocking malaria transmission [18,52]. Then, several methods have been applied, including the detection of bacteria based on colony isolation on solid medium, sometimes after enrichment in liquid medium (so-called culture-dependent) and culture-independent (based directly on molecular technique) approach. Several authors have based their study on the simple use of either culture-dependent [13,19] or culture-independent method [23,31], while other authors favored the combination of these two methods for evaluating the bacterial diversity in midgut of *Anopheles* mosquitoes [14,22]. Our study was in favor of the use of both culture-dependent and culture-independent methods in determining the microbiota of *Anopheles* mosquitoes. The culture-independent method showed more sensitivity than the culture-dependent one as it detected bacteria in half of the samples with 26 out of 52 specimens (50%), while a quarter of the samples (13/52) were positive by culture-dependent method (25%). However, the sequences obtained from TTGE

band were short (about 200 bp in this case) which causes the lack of genetic information that allows an accurate affiliation to the species taxonomic level [42]. Culture-dependent method is the classical approach to study bacterial communities but it appeared less sensitive than the culture-independent method in determining the microbial diversity in *Anopheles* samples. This method allowed us to also detect bacteria that are difficult to develop on normal culture medium or those needing specific cultural conditions for growing such as anaerobic bacteria [53,54]. However, the complete 16S rRNA gene sequences obtained from culture bacterial isolates are quite long and favors an accurate affiliation to a lowest taxonomic level [55]. In addition, obtaining living isolates is also very helpful for various characterizations of the isolate such as biological, chemical, immunological, or other experiments including the interaction between bacteria and parasite, for example. Although TTGE fingerprint has its own advantage in describing bacterial community with low diversity [56], the detection of bacteria using culture medium is still needed for a more complete screening of bacterial colonization in a host population. This combination of both methods is more appropriate for the microbiological malaria control approach while the influence of certain species of Gram-negative and Gram-positive bacteria on the *Plasmodium* sporogonic development in the *Anopheles* midgut has not yet been clarified [33,57]. Our results showed the interest in coupling culture-dependent and culture-independent methods for detecting and evaluating the microbiota diversity in *Anopheles* mosquitoes.

#### 4. Conclusion

Based on culture-dependent and culture-independent methods, we showed that the *Anopheles* specimens from Dak Nong - Vietnam contained a great diversity of bacteria in their midgut, including bacteria species previously described as implicated in the development of malaria parasites. As the microbiota might have an impact on pathogen development in *Anopheles* mosquitoes and disease transmission, and since the use of insecticides in controlling of mosquito vectors might lose its efficacy due to the resistance already reported worldwide, the study of the midgut microbiota of *Anopheles* vectors must be encouraged. This first study reporting the biodiversity of midgut bacteria of *Anopheles* mosquitoes collected from Vietnam encourages the development of further study to understand the role of some specific bacteria isolated from wild mosquito population for the goal of developing a new potential approach in controlling *Anopheles* vectors and malaria transmission in Vietnam.



## **5. Acknowledgements**

The authors are thankful to Isabelle Zornotti (EA 3755 UM1, Faculté de Pharmacie, Montpellier) for her involvement in the DNA extraction and sequencing of cultured isolates. This study was made possible through a PhD allowance provided to the first author by IRD, Marseille, France.

## References

1. Mekong malaria (2013) Mekong malaria III: Towards malaria elimination in the Greater Mekong Subregion. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44: 307.
2. Manguin S, Bangs MJ, Pothikasikorn J, Chareonviriyaphap T (2010) Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infect Genet Evol* 10: 159-177.
3. Garros C, Van Nguyen C, Trung HD, Van Bortel W, Coosemans M, et al. (2008) Distribution of *Anopheles* in Vietnam, with particular attention to malaria vectors of the *Anopheles minimus* complex. *Malar J* 7: 11.
4. Manguin S, Garros C, Dusfour I, Harbach RE, Coosemans M (2008) Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: an updated review. *Infect Genet Evol* 8: 489-503.
5. Harbach RE (2013) The phylogeny and classification of *Anopheles*. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. InTech Open Access Publisher ed. Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher. pp. 3-55.
6. Manguin S, Carnevale P, Mouchet J, Coosemans M, Julvez J, et al. (2008) Biodiversity of malaria in the world. Montrouge, France. 464 p.
7. Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H (2002) Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol* 32: 1133-1143.
8. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, et al. (2011) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* 332: 855-858.
9. Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE (2003) Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol* 40: 371-374.
10. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog* 5: e1000423.
11. Wang Y, Gilbreath TM, 3rd, Kukutla P, Yan G, Xu J (2011) Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One* 6: e24767.
12. Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, et al. (2012) Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9.

13. Chavshin AR, Oshaghi MA, Vatandoost H, Pourmand MR, Raeisi A, et al. (2012) Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Trop* 121: 129-134.
14. Lindh JM, Terenius O, Faye I (2005) 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl Environ Microbiol* 71: 7217-7223.
15. Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, et al. (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9047-9051.
16. Favia G, Ricci I, Marzorati M, Negri I, Alma A, et al. (2008) Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Adv Exp Med Biol* 627: 49-59.
17. Lindh JM, Borg-Karlson AK, Faye I (2008) Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta Trop* 107: 242-250.
18. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, et al. (2010) Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb Ecol* 60: 644-654.
19. Djadid ND, Jazayeri H, Raz A, Favia G, Ricci I, et al. (2011) Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. *PLoS One* 6: e28484.
20. Dong Y, Das S, Cirimotich C, Souza-Neto JA, McLean KJ, et al. (2011) Engineered anopheles immunity to *Plasmodium* infection. *PLoS Pathog* 7: e1002458.
21. Pumpuni CB, Demaio J, Kent M, Davis JR, Beier JC (1996) Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *Am J Trop Med Hyg* 54: 214-218.
22. Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK (2009) Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* 9: 96.
23. Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM (2012) Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol* 21: 5138-5150.

24. Roudiere L, Jacquot A, Marchandin H, Aujoulat F, Devine R, et al. (2009) Optimized PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. *J Microbiol Methods* 79: 156-165.
25. Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 68: 3691-3701.
26. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, et al. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6955-6959.
27. DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5685-5689.
28. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, et al. (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38: 3623-3630.
29. Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
30. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
31. Boissiere A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, et al. (2012) Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog* 8: e1002742.
32. Gusmao DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M, Jr., Berbert-Molina MA, et al. (2010) Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop* 115: 275-281.
33. Straif SC, Mbogo CN, Toure AM, Walker ED, Kaufman M, et al. (1998) Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *J Med Entomol* 35: 222-226.
34. Xue D, Huang X (2013) Changes in soil microbial community structure with planting years and cultivars of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *World J Microbiol Biotechnol*.

35. Narciso-da-Rocha C, Vaz-Moreira I, Manaia CM (2013) Genotypic diversity and antibiotic resistance in *Sphingomonadaceae* isolated from hospital tap water. *Sci Total Environ* 466-467C: 127-135.
36. Gan HM, Hudson AO, Rahman AY, Chan KG, Savka MA (2013) Comparative genomic analysis of six bacteria belonging to the genus *Novosphingobium*: insights into marine adaptation, cell-cell signaling and bioremediation. *BMC Genomics* 14: 431.
37. Kampfer P, Lindh JM, Terenius O, Haghdoost S, Falsen E, et al. (2006) *Thorsellia anophelis* gen. nov., sp. nov., a new member of the *Gammaproteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 335-338.
38. Briones AM, Shililu J, Githure J, Novak R, Raskin L (2008) *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. *ISME J* 2: 74-82.
39. Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, Grisez L, Tailliez P, et al. (2005) Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Syst Appl Microbiol* 28: 640-660.
40. Michel C, Matte-Tailliez O, Kerouault B, Bernardet JF (2005) Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *J Appl Microbiol* 99: 323-332.
41. Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA (2005) Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol* 21: 568-572.
42. Manguin S, Ngo CT, Tainchum K, Juntarajumnong W, Michon AL, et al. (2013) Bacterial biodiversity in midgut of *Anopheles* mosquitoes, malaria vectors in Southeast Asia. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 549-576.
43. Roh SW, Kim KH, Nam YD, Chang HW, Kim MS, et al. (2008) *Luteimonas aestuarii* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *J Microbiol* 46: 525-529.
44. Gundi VA, Taylor C, Raoult D, La Scola B (2009) *Bartonella rattaaustraliani* sp. nov., *Bartonella queenslandensis* sp. nov. and *Bartonella coopersplainsensis* sp. nov., identified in Australian rats. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2956-2961.
45. Kommanee J, Tanasupawat S, Yukphan P, Malimas T, Muramatsu Y, et al. (2010) *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-*Proteobacteria*. *J Gen Appl Microbiol* 56: 81-87.

46. Zhang W, Zhu HH, Yuan M, Yao Q, Tang R, et al. (2010) *Microbacterium radiodurans* sp. nov., a UV radiation-resistant bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2665-2670.
47. Sturm G, Jacobs J, Sproer C, Schumann P, Gescher J (2011) *Leucobacter chromiiresistens* sp. nov., a chromate-resistant strain. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 956-960.
48. Bergey DH (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology United-Stat and England.* 2648 p.
49. Brewster JD, Paoli GC (2013) DNA extraction protocol for rapid PCR detection of pathogenic bacteria. *Anal Biochem* 442: 107-109.
50. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, et al. (2007) Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 495-548.
51. Abdul-Ghani R, Al-Mekhlafi AM, Alabsi MS (2012) Microbial control of malaria: biological warfare against the parasite and its vector. *Acta Trop* 121: 71-84.
52. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, et al. (2008) Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Curr Biol* 18: R1087-1088.
53. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 38: 525-552.
54. Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, et al. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428: 7.
55. Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* 24: 3381-3391.
56. Magne F, Abely M, Boyer F, Morville P, Pochart P, et al. (2006) Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 128-138.
57. Pumpuni CB, Beier MS, Nataro JP, Guers LD, Davis JR (1993) *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Exp Parasitol* 77: 195-199.

**Table 1:** Bacterial genera and OTUs in midgut of *Anopheles* species collected in Vietnam. \* genera revealed by both culture dependent and independent methods. \*\* genera revealed only in culture pathway. (1) Genera identified for the first time from *Anopheles* mosquitoes according to the review by Manguin et al. [42] . Number of samples colonized by each genus or family/OTU per *Anopheles* species is shown in the case box.

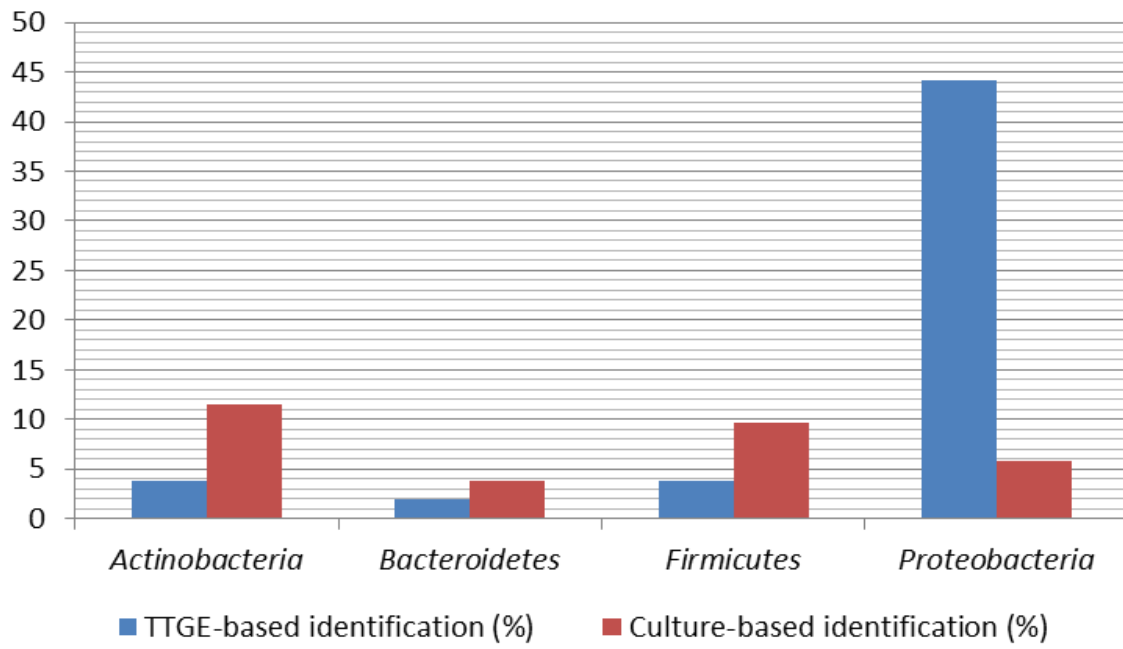
Phyla	Genera or family / OTUs belonged to genera	<i>An. barbumbrosus</i> (=13)	<i>An. crawfordi</i> (=12)	<i>An. dirus</i> (=23)	<i>An. gigas</i> (=24)	<i>An. maculatus</i> (=28)	Total
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> */						
	<i>Acinetobacter</i> , <i>A. junii</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.	3	7	11	19	13	53
	<i>Asaia</i> **/						
	<i>A. spathodeae</i>		1				1
	<i>Bartonella</i> **/						
	<i>B. rattraustraliani</i>				1		1
	<i>Coxiella</i> (1)/						
	<i>Diplorickettsia massiliensis</i>			1			1
	<i>Cellvibrio</i> (1)/						
	<i>C. ostraviensis</i>			1			1
	<i>Enhydrobacter</i> (1)/						
	<i>Enhydrobacter</i> , <i>E. aerosaccus</i> , <i>Enhydrobacter</i> sp.	1	2			1	4
	<i>Enterobacter</i> /						
	<i>E. aerogenes</i>			2			2
	<i>Hafnia</i> (1)/						
	<i>Hafnia paralvei</i>			1			1
	<i>Klebsiella</i> /						
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1				1
	<i>Serratia</i> /						
	<i>Serratia</i> sp.		2				2
	<i>Tatumella</i> (1)/						
	<i>Tatumella</i> sp.				1		1
	<i>Thorsellia</i> /						
	<i>Thorsellia anophelis</i>		1			3	4
	<i>Yersinia</i> (1)/						
	<i>Yersinia</i> sp.		2				2
<i>Moraxella</i> (1)/							
<i>Moraxella osloensis</i>				1		1	
<i>Novosphingobium</i> (1) /							
<i>Novosphingobium</i> sp.				3		13	
<i>Pseudomonas</i> /							
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.		2	1			3	
<i>Sphingobium</i> (1) /							
<i>Sphingobium</i>				1		1	
<i>Sphingomonas</i> /							
<i>Sphingomonas</i> sp.					1	1	
<i>Stenotrophomonas</i> /							
<i>S. maltophilia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> sp.				2		2	
<i>Xanthomonas</i> ** (1) /							
<i>Xanthomonas</i> sp.	1					1	
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i> * (1) /						
	<i>S. pasteurii</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. warneri</i>	1	1		2	1	5
	<i>Bacillus</i> ** /						
	<i>Bacillus</i> sp.				1		1
<i>Enterococcus</i> (1) /							
<i>Enterococcus faecium</i>		1				1	
Actinobacteria	<i>Microbacterium</i> * (1) /						
	<i>Microbacterium</i> sp., <i>M. radiodurans</i> , <i>M. testaceum</i>	2					2
	<i>Brachybacterium</i> ** (1) /						
	<i>Brachybacterium</i> sp., <i>B. (para)conglomeratum</i>	1	1				2
	<i>Brevibacterium</i> ** (1) /						
	<i>Brevibacterium yomogidense</i>		1				1
	<i>Leucobacter</i> ** (1) /						
<i>Leucobacter</i> sp.	1					1	
<i>Janibacter</i> ** /							
<i>Janibacter</i>					1	1	
Bacteroidetes	<i>Knoellia</i> ** (1) /						
	<i>Knoellia</i> sp.	1					1
	<i>Chryseobacterium</i> /						
<i>Chryseobacterium</i> sp.	1					1	
Proteobacteria Bacteroidetes Actinobacteria	Acetobacteraceae, Flavobacteriaceae, Micrococccaceae	2	1			2	5
<b>Total</b>		<b>14</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>31</b>	<b>120</b>
<b>Diversity index</b>		<b>1.1</b>	<b>1.9</b>	<b>1.1</b>	<b>1.1</b>	<b>1.1</b>	<b>1.2</b>



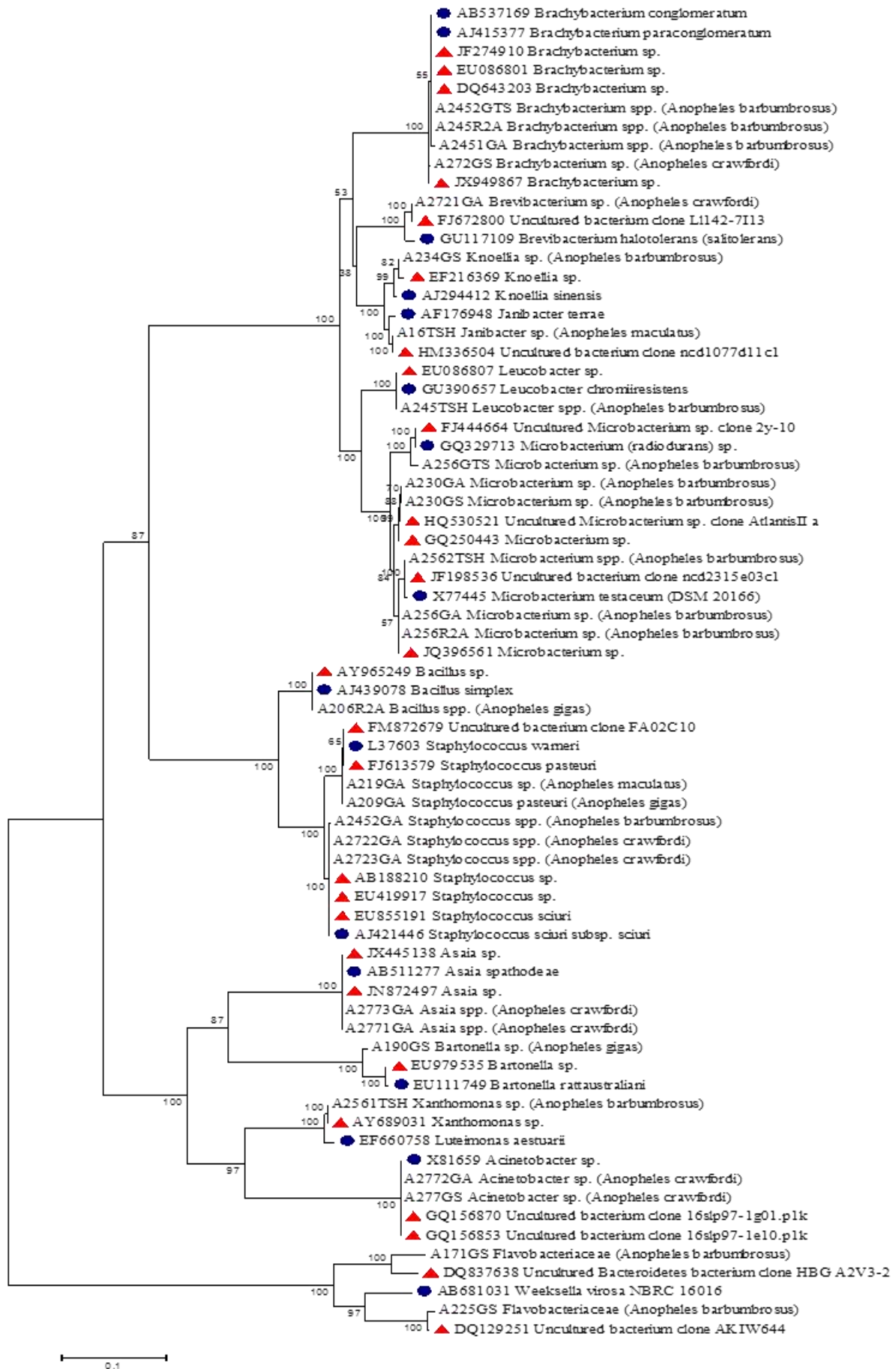
**Table 2:** Sequence analysis of bacterial isolation obtained from the midgut of 5 wild-caught *Anopheles* species by culture-dependent method

Nº	Isolate	Sequence size (bp)	Phylum	Family	Nearest type species RDPII Species name/GenBank accession number/Identity	Closest relative RDPII GenBank accession number/Identity	<i>Anopheles</i> species	GenBank accession number
1	A190GS	988	<i>Proteobacteria</i>	<i>Bartonellaceae</i>	<i>Bartonella rattaaustraliani</i> / EU111749/0.855	EU979535/0.862	<i>An. gigas</i>	
2	A171GS	975	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Empedobacter brevis</i> / AM177497/0.568	DQ837638/0.746	<i>An. barbumbrosus</i>	
3	A225GS	943	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Wautersiella falsenii</i> / AM084341/0.624 <i>Weeksella virosa</i> /AB681031	DQ129251/0.931	<i>An. barbumbrosus</i>	
4	A230-GA	949	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> / X77445/0.910	HQ530521/0.965	<i>An. barbumbrosus</i>	
5	A230GS	952	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> / X77445/0.909	GQ250443/0.954	<i>An. barbumbrosus</i>	
6	A234GS	951	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Knoellia sinensis</i> / AJ294412/0.921	EF216369/0.937	<i>An. barbumbrosus</i>	
7	A2721GA	955	<i>Actinobacteria</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium salitolerans/halotolerans</i> / GU117109/0.866	FJ672800/0.979	<i>An. crawfordi</i>	
8	A2722GA	975	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i> / AJ421446/0.987	AB188210/0.987	<i>An. crawfordi</i>	
9	A2723GA	975	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i> / AJ421446/0.990	EU419917/0.990	<i>An. crawfordi</i>	
10	A272GS	944	<i>Actinobacteria</i>	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium paraconglomeratum/conglomeratum</i> / AJ415377/AB537169/0.960	JX949867/0.978	<i>An. crawfordi</i>	
11	A2771GA	982	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Asaia spathodeae</i> / AB511277/0.990	JN872497/0.990	<i>An. crawfordi</i>	
12	A2772GA	942	<i>Proteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter guillouiae</i> / X81659/0.969	GQ156870/0.976	<i>An. crawfordi</i>	
13	A2773GA	979	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Asaia spathodeae</i> / AB511277/0.996	JX445138/0.996	<i>An. crawfordi</i>	
14	A277GS	943	<i>Proteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter guillouiae</i> / X81659/0.971	GQ156853/0.983	<i>An. crawfordi</i>	
15	A219GA	985	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus warneri</i> / L37603/0.986	FM872679/0.992	<i>An. maculatus</i>	
16	A16TSH	964	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Janibacter terrae</i> / AF176948/0.898	HM336504/0.960	<i>An. maculatus</i>	
17	A206R2A	974	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus simplex</i> / AJ439078/0.962	AY965249/0.971	<i>An. gigas</i>	
18	A209GA	958	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus warneri</i> / L37603/0.987	FJ613579/0.994	<i>An. gigas</i>	
19	A2561TSH	966	<i>Proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Luteimonas aestuarii</i> / EF660758/0.899	AY689031/0.995	<i>An. barbumbrosus</i>	
20	A2562TSH	972	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> / X77445/0.963	JF198536/0.990	<i>An. barbumbrosus</i>	
21	A256GA	963	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> / X77445/0.945	JQ396561/0.985	<i>An. barbumbrosus</i>	
22	A256GTS	960	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium radiodurans</i> / GQ329713/0.915	FJ444664/0.930	<i>An. barbumbrosus</i>	
23	A256R2A	960	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> / X77445/0.943	JQ396561/0.985	<i>An. barbumbrosus</i>	
24	A2451GA	941	<i>Actinobacteria</i>	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium conglomeratum/paraconglomeratum</i> / AB537169/AJ415377/0.951	DQ643203/0.951	<i>An. barbumbrosus</i>	
25	A2452GA	946	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i> / AJ421446/0.984	EU855191/0.985	<i>An. barbumbrosus</i>	
26	A245R2A	943	<i>Actinobacteria</i>	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium paraconglomeratum/conglomeratum</i> / AJ415377/AB537169/0.977	EU086801/0.977	<i>An. barbumbrosus</i>	
27	A245TSH	961	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Leucobacter chromiirestiensis</i> / GU390657/0.983	EU086807/0.989	<i>An. barbumbrosus</i>	
28	A2452GTS	946	<i>Actinobacteria</i>	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium paraconglomeratum/conglomeratum</i> / AJ415377/AB537169/0.977	JF274910/0.989	<i>An. barbumbrosus</i>	

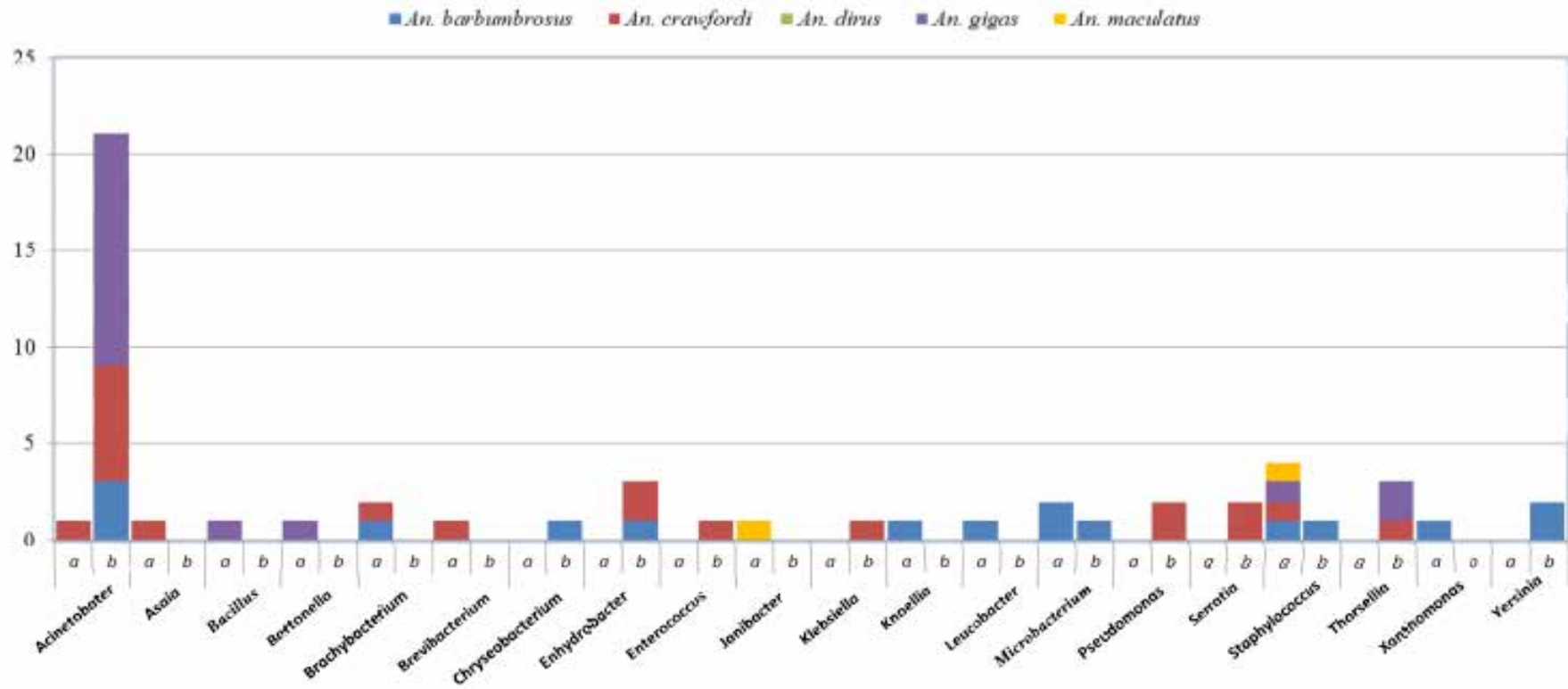
**Figure 1:** Repartition of identified isolates or sequences in bacterial phyla. Values showed the percentage of positive samples within 52 *Anopheles* specimens.



**Figure 2:** Maximum Likelihood phylogenetic tree showed the position of bacteria isolated from midgut of *Anopheles* species collected in Dak Nong – Vietnam using culture medium in their relative sequences. Tree constructed using Mega 5 software with 100 bootstraps supported (Bar=0.1). The sequences of isolates are shown in normal text, the closest sequences (triangular shape) and the sequences of the closest species type strain (green circle) are shown with their GenBank accession number and their annotation. More information on the sequences used is detailed in Table 2.



**Figure 3:** Bacterial genera detected in 52 wild-caught *Anopheles* mosquitoes using of culture dependent (a) and culture independent (b) methods, displayed by the number of positive samples in each *Anopheles* species



### **III. Biodiversité de la flore bactérienne d'espèces d'*Anopheles* de la Province de Binh Phuoc et lien entre bactéries, espèces d'*Anopheles* et *Plasmodium vivax***

Dans le chapitre précédent, nous avons montré l'intérêt de la recherche sur la flore bactérienne de l'estomac d'espèces d'*Anopheles* du Vietnam dans le but de développer une nouvelle stratégie potentielle dans la lutte contre le paludisme. Notre approche a montré l'intérêt de combiner deux méthodes pour une analyse plus complète de la diversité de la flore bactérienne des moustiques. Cette deuxième partie présente les résultats obtenus dans notre étude de la flore bactérienne des anophèles collectés dans la Province de Binh Phuoc, voisine de la Province de Dak Nong. L'étude, présentée dans le cadre de l'article 4, montre la biodiversité de la flore bactérienne de ces anophèles, les genres bactériens qui colonisent l'estomac des moustiques infectés par *P. vivax* et leur implication possible dans l'infection des anophèles.

**Article 4:** Diversity of midgut bacteria of wild *Anopheles* adults from Binh Phuoc Province, Vietnam and microbiota composition of vector species naturally infected by *Plasmodium vivax*. (Ngo et al. en préparation)

#### Résumé de l'article 4:

La lutte biologique contre les *Anopheles* vecteurs et le blocage de la transmission basée sur les bactéries symbiontes des moustiques, sont des approches nouvelles et innovantes. Ainsi, la communauté bactérienne de l'estomac de plusieurs espèces d'anophèles a récemment été explorée. Notre étude précédente sur la flore bactérienne de l'estomac des anophèles collectés dans la Province de Dak Nong, Vietnam, a montré que la communauté bactérienne chez les *Anopheles* était diverse et prometteuse pour le développement d'une nouvelle approche de contrôle de la transmission du paludisme.

Deux approches dont la culture bactérienne et la méthode de fingerprint d'ADN ont été combinées pour, à la fois explorer la biodiversité bactérienne de l'estomac de populations

d'*Anopheles* collectées dans la Province de Binh Phuoc, mais aussi estimer la composition de la microflore des anophèles vecteurs naturellement infectés par *Plasmodium vivax*.

Nos résultats montrent que presque tous les individus d'*Anopheles* (98%) de Binh Phuoc étaient colonisés par au moins un taxon bactérien appartenant aux phyla suivants : *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Protéobacteria*, *Synergistetes*. Six genres dont *Luteimonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Rubellimicrobium* sp., *Geobacillus* sp., *Sphingomonas* sp. et *Methylobacterium* sp., étaient présents dans l'estomac des 2 espèces d'*Anopheles*, *An. dirus* et *An. pampanai*, naturellement infectés par *Plasmodium vivax*. La colonisation d'*Acinetobacter*, trouvée dans ces deux spécimens, est significativement associée à la présence de *Plasmodium vivax* chez ces vecteurs.

**Mots clés:** Moustique, *Anopheles*, flore bactérienne de l'intestin, ARNr 16S PCR - TTGE, paludisme, Province de Binh Phuoc, Vietnam.

# Diversity of midgut bacteria of *Anopheles* adults from Binh Phuoc Province, Vietnam and microbiota composition of vector species naturally infected by *Plasmodium vivax*

Chung Thuy Ngo<sup>1,2</sup>, Sylvie Manguin<sup>1</sup> and Estelle Jumas-Bilak<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR-MD3, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

<sup>2</sup> National Institute of Veterinary Research, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup> Université Montpellier 1, UMR 5119 ECOSYM, Equipe Pathogènes et Environnements, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

## Abstract

Biological control of *Anopheles* vectors and malaria transmission blocking based on symbiotic bacteria in mosquitoes, are considered as a new and innovative approach. The midgut bacterial community of several *Anopheles* species has been recently explored. Our previous study on midgut bacterial flora of *Anopheles* populations of Dak Nong Province, Vietnam, showed that the bacterial community was diverse and promising for developing a new approach to control malaria transmission.

The combination of bacterial culture and DNA fingerprint methods were applied to explore the bacterial biodiversity in the midgut of *Anopheles* collected in the Binh Phuoc Province with a particular focus on the microbiota composition of *Anopheles* naturally infected by *Plasmodium vivax*.

Our data showed that nearly all *Anopheles* individuals (98%) in Binh Phuoc were colonized, at least, by one bacterial taxon belonging either to *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, or *Synergistetes*. Six genera (*Acinetobacter* sp., *Rubellimicrobium* sp., *Geobacillus* sp., *Luteimonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Methylobacterium* sp.) colonized the midgut of 2 *Anopheles* species, *An. dirus* and *An. pampanai*, naturally infected by *Plasmodium vivax*. *Acinetobacter* was found in these two specimens and the colonization of this genus was significantly linked to the *Plasmodium vivax* infection status of *Anopheles*.

**Keywords:** *Anopheles* mosquitoes, midgut bacterial flora, 16S rRNA PCR - TTGE, malaria, Binh Phuoc, Vietnam



## 1. Introduction

Despite some success in controlling malaria, this disease continues to be an important health burden in many countries around the world with 660,000 deaths reported in 2012, particularly in sub-Saharan Africa recording 596,000 deaths (90%), but also in forested regions of Southeast Asia with 43,000 deaths (6.5%) [1]. Until now, vector control has been one of the key elements for controlling this disease based on the use of insecticides, such as DDT, pyrethroids, organophosphates, carbamates [2,3]. However, this strategy using insecticides has many serious side-effects, in particular on human health and the environment [4-6], and it has a direct impact on the increase of *Anopheles* resistance to insecticides which has now been reported in 64 countries [1,2,7,8]. Therefore, a new and innovative approach to control *Anopheles* vectors, to reduce malaria transmission, and durable and safe for human health is, hence, needed.

The impact of the microbiota on mosquito infection and more specifically on *Anopheles* resistance to malaria pathogens is showing great potential toward reducing the mosquito vectorial capacity and transmission blocking [9-13].

The influence of the mosquito bacterial communities on the *Anopheles* vectorial capacity to transmit pathogens is a growing field of investigation as demonstrated by the recent increase in studies [9,12-17]. The protective role of *Anopheles* midgut bacteria against malaria infections has been demonstrated in using antibiotic treatment to clear the gut microbiota, which resulted in enhanced *Plasmodium* infections [12,15,16,18]. In addition, the experimental results of co-infections of bacteria with *Plasmodium* have showed the reduction of the number of developing oocysts in the mosquito midgut, both in laboratory and field conditions [12,17,19-22]. Cirimotich et al. [17] described an *Enterobacter* bacterium (EspZ) isolated from wild *An. gambiae* from Zambia that was implicated in an anti-*Plasmodium* effect. Their results revealed that the inhibition of *Plasmodium* development by commensal microbiota occurs through the production of bacterial generation of reactive oxygen species that directly target *Plasmodium* parasites in the midgut [17]. Then, in the objective to contribute to the development of a new approach in malaria control, the midgut bacterial community of several *Anopheles* species has been explored [13,23-27].

In Vietnam, malaria remains the most important vector-borne parasitic disease with a strong prevalence in forested regions, in particular along the international borders with Cambodia, where Binh Phuoc Province is located. This province, situated in central-south Vietnam, is considered as one of the provinces having the highest malarial transmission [28,29]. The local malaria situation reported both resistance of *Plasmodium* to anti-plasmodial drugs and

*Anopheles* mosquitoes to the insecticide used in this province [28,30-32]. However, there is a lack of information on the distribution and vectorial capacity of the local *Anopheles* vectors and no study has been done on the composition of the bacterial community in the midgut of the *Anopheles* collected in this province.

Our previous report on the biodiversity of the microbiota in the midgut of 5 *Anopheles* species from Dak Nong Province showed a diverse bacterial community, including species reported as implicated in the mosquito resistance to *Plasmodium* infection. This previous study used a combination of culture and molecular methods for an accurate and more complete approach on the bacterial community of *Anopheles* midgut (Ngo et al., in preparation). In this study, we present the bacterial biodiversity in the midgut of *Anopheles* collected from Binh Phuoc Province, combining culture and PCR – TTGE methods, with a particular focus on the microbiota composition of *Anopheles* naturally infected by *Plasmodium vivax*.

## **2. Materials and methods**

### **Samples**

A total of 486 specimens belonging to 17 *Anopheles* species, including *Anopheles dirus*, *An. jeyporiensis*, *An. maculatus*, *An. minimus*, *An. pampanai*, *An. rampae*, *An. sawadwongporni*, and *An. scanloni* were collected from 4 sites located in Bu Gia Map District, Binh Phuoc Province (11°45'N, 106°43'E) in central-southern Vietnam. These *Anopheles* specimens were collected between November and December 2010 during 11 consecutive nights using several methods, such as light trap capture and human landing catches.

*Anopheles* mosquito identification was morphologically done in the field by sorting out each taxon. Specimens that belonged to the Dirus and Minimus Complexes or the Maculatus Group were individually identified to species level using the appropriate PCR-based method as described by Garros et al. [33] and Walton et al. [34,35]. Each individual was split into two pieces stored at -80°C until use: (1) head-thorax for species identification and detection of *Plasmodium* by molecular method; and (2) abdomen for midgut bacteria analysis. One hundred abdomens of wild-caught *Anopheles* females were used for the subsequent bacterial study.

### **Bacterial culture and DNA extraction**

*Anopheles* abdomens were surface rinsed twice in sterilized DNA-free water, and each abdomen was thoroughly disrupted using a sterilized tissue crusher device in 150 µl of sterilized DNA-free water. Then, 10 µl of this suspension was spread on each culture medium plate: blood sheep agar, R2A and acetobacteria agar. The inoculated agar plates were incubated at 30-35°C during 72h and verified every 24h for bacterial growth. Bacterial isolates were transferred to Tryptic Soya Agar (TSA) plate and incubated at 30-35°C during 24 hrs. Then, colonies were suspended in purified DNA free water until reached turbidity equal to McFarland N°5 (about 1.5 10<sup>9</sup> bacteria/mL), boiled during 10 min and frozen at -20°C for raw DNA extraction. Each bacterial isolate were stored at -80°C in TSA with 15% glycerol. Whole DNA was extracted from 100 µl of mosquito abdomen suspension using the Master Pure Gram Positive DNA purification kit as recommended by the supplier (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA). The purified and raw DNAs were kept at -80°C before further analyses.

## **PCR**

For PCR-TTGE experiments, the V2–V3 region of the 16S rRNA gene of bacteria was amplified using the primers HDA1/HDA2 [36]; HDA1: 5'-ACTC CTA CGG GAG GCA GCA GT-3', HDA2: 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'. A 40-bp clamp, named GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') flanked the 5' extremity of HDA1 [37] in order to form HDA1-GC. PCR was performed using an Eppendorf thermal cycler® (Eppendorf, Le Pecq, France) and 0.5 ml tubes. The reaction mixture (50 µl) contained 2.5 units of Taq DNA Polymerase (FastStart High fidelity PCR system, Roche, Meylan, France), 0.2 mM of each primer and 1 µl of gut content DNA in the appropriate reaction buffer. Amplification was done at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles at 95°C for 1 min, 62°C for 30 s, 72°C for 1 min, and 7 min at 72°C for the final extension. A nearly complete 16S rRNA gene sequence was amplified with DNA from the bacterial isolates as template using the universal primers 27f [38] and 1492r as described [39]. PCR amplifications were checked by DNA electrophoresis in 1.5% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

## **Temporal Temperature Gel Electrophoresis**

Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) was performed using the DCode universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, Marne-la-Coquette, France) in gels that were 16 cm × 16 cm by 1 mm. The gels (60 mL) were composed of 8% (wt/vol)

bisacrylamide (37.5:1), 7 M urea, 60 mL of N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), and 0.1% (wt/vol) ammonium persulfate. Gels were run with 1X Tris–acetate–EDTA buffer at pH 8.4. The 5 µl of DNA were loaded on gel with 5 µl of in house dye marker (saccharose 50%, Bromophenol Blue 0.1%) using capillary tips. Denaturing electrophoresis was performed at 46 V with a temperature ramp from 63°C to 70°C during 16 hrs (0.4°C/h), after a pre-migration of 15 min at 20 V and 63°C. Gels were stained with ethidium bromide solution (5µg/mL) for 20 min, washed with de-ionized water, viewed using a UV transillumination system (Vilbert-Lourmat, France) and photographed.

### **TTGE band sequencing and OTU affiliation**

TTGE bands were excised and the DNA was eluted with 50 µL of elution buffer (EB) of the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Courtabeuf, France) overnight at 37°C before PCR amplification with HDA1/HDA2 used without GC clamp. The reaction conditions were identical to those described above. PCR products were sequenced on an ABI 3730xl sequencer (Cogenics, Meylan, France). Each sequencing chromatograph was visually inspected and corrected. The sequences were analyzed by comparison with Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Ribosomal Databases Project 2 (RDPII) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and Seqmatch programs, respectively. The sequence with the highest percentage was used for OTU affiliation. A sequence was affiliated to a species-level OTU when the percent of sequence similarity with the species type strain was above 99.0% [40]. This value is over the recognized cut-off value for the delineation of species [41], but warrants high stringency for species-level OTU affiliation. Below 99.0%, the sequence is affiliated to the genus of the reference sequence with the highest percentage. When several species reference sequences match equally, affiliation was done to the genus level or to a group of species if relevant. For example, sequence with 99.5% in similarity to both *Aeromonas caviae* and *Aeromonas hydrophila* was only assigned to the genus *Aeromonas*. The same rule was applied for the taxonomic level higher than the genus level if necessary. On each TTGE gel, about 50% of the bands were sequenced, the others being affiliated to an OTU by comparison of their migration distance with that of sequenced bands.

### 3. Results

#### **Bacterial composition in the midgut of *Anopheles* species**

Out of 486 specimens collected in the Binh Phuoc Province, 100 *Anopheles* females, belonging to 8 species (those named in Table 1), including members of the *Minimus* and *Dirus* complexes and the *Maculatus* Group, were analyzed using both bacterial culture and PCR-TTGE methods. Of them, 2 specimens, 1 *An. dirus* and 1 *An. pampanai*, were naturally infected by *Plasmodium vivax*. Bacteria were detected in 98% of the *Anopheles* sample, 2 negative specimens included 1 *An. minimus* and 1 *An. scanloni*.

The midgut bacterial composition linked to each *Anopheles* species is shown in Table 1. *Anopheles minimus*, considered as one of the primary vectors of *Plasmodium* in Vietnam, was the solely species colonized by all 7 bacterial phyla. Two other malaria vectors, *An. dirus* and *An. sawadwongporni*, were colonized by 5 of 7 bacterial phyla detected herein. The secondary vectors, *An. pampanai* and *An. jeyporiensis*, were the host of bacteria belonging to 4 phyla, while *An. scanloni*, together with *An. rampae* and *An. maculatus*, two species of the *Maculatus* Group, were infected by 3 bacterial phyla (Table 1).

Bacteria belonging to *Firmicutes* and *Proteobacteria* were present in all *Anopheles* species while *Synergistetes* colonized 2 *Anopheles* species, *An. minimus* and *An. sawadwongporni*, and *Planctomycetes* were detected in *An. minimus* only.

In order to evaluate the link between the bacterial infection and the host species, we tested the presence of bacteria belonging to 3 bacterial Phyla such as *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* that were most detected in 8 *Anopheles* species. However, the bacterial infection was not significantly linked to *Anopheles* species ( $X^2$ - test,  $p < 0.05$ ).

In addition, the diversity index (DI), based on the total presence of bacterial genera in each *Anopheles* species, showed that the bacterial community in *An. maculatus* was the highest (6.0) while it was the lowest (3.6) in *An. jeyporiensis* (Table 2). However, the values of DI were not significantly different between the *Anopheles* species ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis test).

#### **Taxonomic diversity of the microbiota of wild *Anopheles* populations**

A total of 86 bacterial isolates and 598 bands of TTGE gel were obtained from 98/100 positive individuals. Both isolates and TTGE bands were further analyzed through PCR and sequencing. The sequences obtained from cultured isolates have been added into the Genbank under the accession number (to be added) and live bacteria were maintained in the bacteria laboratory of the Faculty of Pharmacy (Montpellier University – France). The results of the

sequence analysis obtained from the cultured isolates and TTGE bands revealed 203 bacterial OTUs belonging to 105 genera of 63 families found in the 98 positive *Anopheles* specimens. Table 2 shows the affiliation of the bacteria detected in *Anopheles* specimens into the genus and phylum levels. The sequences obtained from three TTGE bands were not accurate enough to affiliate to the genus level, one of them was affiliated to the *Acidobacteria* Phylum and two others to the Family of *Planctomycetaceae* (*Planctomyces*). Therefore, both Phyla, *Acidobacteria* and *Planctomyces*, are not presented in Table 2.

The seven Phyla identified from 98 *Anopheles* specimens were *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomyces*, *Proteobacteria*, and *Synergistetes*, of them, the *Proteobacteria* and *Firmicutes* were identified from 8 *Anopheles* species, herein (Figure 1). *Proteobacteria* was the dominant phylum, present in 28 isolates and 157 TTGE bands, bacteria belonging to this phylum were identified from 92 specimens (93.9 %). The bacteria belonging to the *Firmicutes* Phylum represented the second dominant one in the bacterial community of *Anopheles* midgut, as they were identified from 70 specimens (71.4 %). Then, bacteria of the *Actinobacteria* Phylum were identified from 38 samples (38.8 %) of 5 *Anopheles* species, and they were absent from *An. rampae*, *An. scanloni* and *An. jeyporiensis*. The abundance of bacteria belonging to *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Synergistetes* and *Planctomyces* Phyla was low, as they were identified from 10.2%, 4.1%, 2.0% and 1.0% of the specimens, respectively. In particular, *Planctomyces* was identified in *An. minimus* only (Figure 1).

Out of 105 bacterial genera, listed in Table 1, more than half (57 genera) belonged to the *Proteobacteria* Phylum. *Actinobacteria* and *Firmicutes* were following with 24 and 18 genera, respectively. The other 6 genera were distributed into two Phyla, *Bacteroidetes* (5) and *Synergistetes* (1). From these 4 phyla, 32 genera were identified from 86 cultured isolates, as shown in Table 2.

At the genus level, three genera, all belonging to the *Firmicutes* Phylum, such as *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Clostridium*, were the three first dominant genera in *Anopheles* midguts with the frequencies of 29.6%, 23.5% and 21.4%, respectively. Eight genera were detected in more than 10% of the samples, with frequencies ranging from 10.2% to 18.4%, including *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Delftia*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, and *Lysobacter*. The other 94 genera (89.5%) were found at frequencies lower than 10%, including 81 genera (77.1 %) detected 1 to 4 samples representing frequencies lower than 5% (Table 2).

In comparison with our data collected in Dak Nong Province (Ngo et al., in preparation), eighteen genera, *Asaia*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brachybacterium*, *Enhydrobacter*, *Enterobacter*, *Janibacter*, *Klebsiella*, *Knoellia*, *Microbacterium*, , *Moraxella*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, and *Thorsellia*, have been detected in *Anopheles* populations from both provinces. Most of these genera were found at frequencies below 10% in the *Anopheles* samples from Binh Phuoc Province, except *Sphingomonas* (13.3%) and *Acinetobacter* (18.4%). Five genera of *Enterobacteriaceae*, including *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Proteus*, and *Thorsellia*, were present in 16.3% of the specimens of 5 *Anopheles* species (*An. dirus*, *An. maculatus*, *An. minimus*, *An. pampanai* and *An. scanloni*), of these 5 bacterial genera, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Thorsellia* were also reported from the *Anopheles* samples from Dak Nong (Ngo et al., in preparation).

#### **Characterization of the midgut microbiota of plasmodial naturally infected *Anopheles* specimens**

The 2 specimens found infected by *Plasmodium vivax*, out of the 486 *Anopheles* specimens collected in Binh Phuoc Province (Ngo et al., in preparation), belonged to *An. dirus* and *An. pampanai*. The midgut bacterial flora of these two plasmodial naturally infected specimens was analyzed by PCR-TTGE (no cultured isolate obtained from these 2 mosquitoes). Seven TTGE bands obtained from these 2 TTGE profiles were successfully amplified and sequenced. The sequence analysis showed the presence of 6 bacterial taxa: *Acinetobacter* sp., *Rubellimicrobium* sp., *Geobacillus* sp., *Luteimonas* sp., *Sphingomonas* sp., and *Methylobacterium* sp., among which 5 (83.3%) belonged to the *Proteobacteria* Phylum and only one, *Geobacillus* sp., to the *Firmicutes* genus.

The genus *Acinetobacter* was found in these two specimens, whereas *Luteimonas* sp., *Sphingomonas* sp., and *Methylobacterium* sp. were found in *An. pampanai* only, while *Rubellimicrobium* sp. and *Geobacillus* sp. were detected only in *An. dirus*.

The Fisher's exact test done to evaluate the link between these bacterial taxa and the parasite presence in these *Anopheles* specimens, showed that the colonization of *Acinetobacter* sp. was significantly linked to the *Plasmodium vivax* infection status of *Anopheles* ( $p < 0.034$ ), whereas there was no link between the presence of the other taxa and parasite infection ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

This study on the midgut microbiota of 98 specimens, belonging to 8 *Anopheles* species collected in Binh Phuoc Province using two approaches, culture and PCR-TTGE technique, provided a large description on the bacterial community of these mosquitoes. The *Anopheles* population was colonized by a great diversity of bacterial community, represented by 203 OTUs affiliated to 105 genera, belonging to 63 families of 7 phyla. Within the bacteria detected here, many genera have already been identified in the midgut flora of *Anopheles* populations in Thailand and Vietnam [27], Cameroon [23], Iran [24], India [25], including species specifically described from *Anopheles* mosquitoes, such as *Thorsellia anophelis* [42], *Janibacter anophelis* [43]. Interestingly, the *Anopheles* species from Binh Phuoc Province also contained five genera of *Enterobacteriaceae*, that have recently received lots of attention due to their implication in the reduction of *Plasmodium* development in *Anopheles* vectors [17,23].

The bacteria detected in *Anopheles* specimens were affiliated to 7 phyla, among which three were dominant such as *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes*. Out of these 7 phyla, 4 (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*) have also been identified in the midgut flora of *Anopheles* specimens collected in the Dak Nong Province, located next to Binh Phuoc Province, and *Proteobacteria* was the dominant phylum in *Anopheles* populations of Binh Phuoc, as well as Dak Nong (Ngo et al., in preparation), Cameroon [23], and Iran [44].

Our study demonstrated that midguts of 98% of *Anopheles* samples from Binh Phuoc Province were colonized by bacteria. This positive rate was higher than those reported before (83%) in the anopheline from Dak Nong Province (Ngo et al., in preparation). These results were obtained from two studies that employed the same methods of bacteria identification. Therefore, the environment where the samples were collected has most likely an important influence on the midgut bacterial communities of the *Anopheles* of these two provinces.

Our results showed that there is no link between bacterial colonization and host species collected in Binh Phuoc Province. This result is in accordance with previous reports that rather showed the influence of either the local environment of the sampling site [23] or the origin of specimens such as wild *versus* laboratory reared *Anopheles* mosquitoes [24] on the diversity of midgut bacterial community of host species. The influence of the method was also suggested in several reports, such as the selective pressure of laboratory conditions that may limit bacteria acquisition at both larval and adult stages resulting in great reduction or nil



cultivable bacteria in mosquito midguts [15,45,46]. Environmental conditions have too, an influence on the microbiota of *Anopheles* mosquitoes as shown in our recent study comparing the bacterial flora of *Anopheles* populations from Thailand and Vietnam [27]. In addition, the DNA fingerprint by TTGE method would be difficult to interpret if the diversity exceeded 25 to 30 OTUs [36]. Concerning the culture method, more culture media should be used for a better and greater investigation of the microflora community as demonstrated on the field-caught *An. stephensi* populations from Iran [24]. In our study, the combination of 2 approaches, allowed the detection of 30.4% of all bacterial genera reported in this study by culture medium, while 69.6% were identified by PCR–TTGE method. This result demonstrates the influence of the method used in studying midgut bacterial community of *Anopheles* mosquitoes.

Our data also showed the link between the common presence of *Acinetobacter* genus and *Plasmodium vivax* in *Anopheles* specimens. This bacterial genus has also been identified in the midgut flora of other anopheline species from Cameroon, Iran, India, Kenya, and Mali [24,25,47], and it was the dominant genus in midgut bacterial community of *Anopheles* from Dak Nong - Vietnam (Ngo et al., in preparation) and Cameroon [23]. Nevertheless, there is no available report on the possible implication of this genus into the development of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes. These results are preliminary ones as only 2 *Plasmodium* infected specimens were studied and obviously more work needs to be done on the interaction between this bacterial genus and malarial parasites in *Anopheles* populations of Vietnam.

## 5. Conclusion

For the first time, the midgut bacterial flora of 8 wild *Anopheles* species (100 specimens) collected from Binh Phuoc Province, Vietnam was investigated after applying 2 approaches, culture and molecular method. Our data showed that nearly all *Anopheles* individuals (98%) were colonized, at least, by one bacterial taxon. This bacterial flora was diverse with the presence of 105 genera, including *Enterobacter*, the genus considered to have an implication on *Plasmodium* development reduction in *Anopheles* mosquitoes. The bacteria detected were classified into 7 phyla, but most of them belonged to the *Proteobacteria* Phylum, which means that these bacteria are closely related. The diversity of the midgut microbiota was not significantly different between *Anopheles* species.

The midgut bacterial flora of both *An. dirus* and *An. pampanai*, 2 specimens naturally infected by *Plasmodium vivax*, was characterized by 6 bacterial taxa, including *Acinetobacter* sp. Interestingly, *Acinetobacter* sp. was the only taxon significantly linked to the presence of *P.*

*vivax* in the *Anopheles* specimens, demonstrating its possible implication in the *Plasmodium* infection status of these vectors. Hence, we suggest conducting further study to investigate and better understand the link between this bacteria genus and *Plasmodium* development in the *Anopheles* mosquitoes.

### **Acknowledgements**

This study was made possible through a PhD allowance provided to the first author by IRD, Marseille, France.

## References

1. WHO (2012) World Malaria Report. Geneva, Switzerland: WHO Press. 195 p.
2. Kabula B, Tungu P, Malima R, Rowland M, Minja J, et al. (2013) Distribution and spread of pyrethroid and DDT resistance among the *Anopheles gambiae* complex in Tanzania. Med Vet Entomol.
3. Verhaeghen K, Van Bortel W, Trung HD, Sochantha T, Coosemans M (2009) Absence of knockdown resistance suggests metabolic resistance in the main malaria vectors of the Mekong region. Malar J 8: 84.
4. Dabrowski JM, Balderacchi M (2013) Development and field validation of an indicator to assess the relative mobility and risk of pesticides in the Lourens River catchment, South Africa. Chemosphere 93: 2433-2443.
5. Dabrowski JM, Shadung JM, Wepener V (2014) Prioritizing agricultural pesticides used in South Africa based on their environmental mobility and potential human health effects. Environ Int 62: 31-40.
6. Singleton ST, Lein PJ, Farahat FM, Farahat T, Bonner MR, et al. (2013) Characterization of alpha-cypermethrin exposure in Egyptian agricultural workers. Int J Hyg Environ Health.
7. Tangena JA, Adiamoh M, D'Alessandro U, Jarju L, Jawara M, et al. (2013) Alternative Treatments for Indoor Residual Spraying for Malaria Control in a Village with Pyrethroid- and DDT-Resistant Vectors in The Gambia. PLoS One 8: e74351.
8. Chang XL, Xue YQ, Zhang AD, Zhu GD, Fang Q (2013) [Deltamethrin resistance, metabolic detoxification enzyme and kdr mutation in *Anopheles sinensis* in region along Huaihe River in Anhui Province]. Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi 25: 263-267.
9. Blumberg BJ, Trop S, Das S, Dimopoulos G (2013) Bacteria- and IMD pathway-independent immune defenses against *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. PLoS One 8: e72130.
10. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, et al. (2006) *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. PLoS Pathog 2: e52.
11. Dong Y, Das S, Cirimotich C, Souza-Neto JA, McLean KJ, et al. (2011) Engineered anopheles immunity to *Plasmodium* infection. PLoS Pathog 7: e1002458.
12. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. PLoS Pathog 5: e1000423.

13. Gendrin M, Christophides GK (2013) The *Anopheles* mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: InTech Open. pp. 525-548.
14. Briones AM, Shililu J, Githure J, Novak R, Raskin L (2008) *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. ISME J 2: 74-82.
15. Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, et al. (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 9047-9051.
16. Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C (2010) Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. Science 329: 1353-1355.
17. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, et al. (2011) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. Science 332: 855-858.
18. Beier MS, Pumpuni CB, Beier JC, Davis JR (1994) Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 31: 561-565.
19. Lowenberger CA, Kamal S, Chiles J, Paskewitz S, Bulet P, et al. (1999) Mosquito-*Plasmodium* interactions in response to immune activation of the vector. Exp Parasitol 91: 59-69.
20. Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE (2003) Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. J Med Entomol 40: 371-374.
21. Pumpuni CB, Beier MS, Nataro JP, Guers LD, Davis JR (1993) *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. Exp Parasitol 77: 195-199.
22. Meister S, Agianian B, Turlure F, Relogio A, Morlais I, et al. (2009) *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. PLoS Pathog 5: e1000542.
23. Boissiere A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, et al. (2012) Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. PLoS Pathog 8: e1002742.

24. Chavshin AR, Oshaghi MA, Vatandoost H, Pourmand MR, Raeisi A, et al. (2012) Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Trop* 121: 129-134.
25. Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK (2009) Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* 9: 96.
26. Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM (2012) Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol* 21: 5138-5150.
27. Manguin S, Ngo CT, Tainchum K, Juntarajumnong W, Michon AL, et al. (2013) Bacterial biodiversity in midgut of *Anopheles* mosquitoes, malaria vectors in Southeast Asia. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 549-576.
28. Tran TH, Nguyen TT, Nguyen HP, Boni MF, Ngo VT, et al. (2012) *In vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam. *Malar J* 11: 355.
29. Abe T, Honda S, Nakazawa S, Tuong TD, Thieu NQ, et al. (2009) Risk factors for malaria infection among ethnic minorities in Binh Phuoc, Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40: 18-29.
30. Thanh NV, Toan TQ, Cowman AF, Casey GJ, Phuc BQ, et al. (2010) Monitoring for *Plasmodium falciparum* drug resistance to artemisinin and artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam: 1998-2009. *Malar J* 9: 181.
31. Huong NM, Hewitt S, Davis TM, Dao LD, Toan TQ, et al. (2001) Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in a highly endemic area of southern Viet Nam: a study *in vivo* and *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 325-329.
32. Nguyen MH, Davis TM, Cox-Singh J, Hewitt S, Tran QT, et al. (2003) Treatment of uncomplicated falciparum malaria in southern Vietnam: can chloroquine or sulfadoxine-pyrimethamine be reintroduced in combination with artesunate? *Clin Infect Dis* 37: 1461-1466.
33. Garros C, Harbach RE, Manguin S (2005) Morphological assessment and molecular phylogenetics of the Funestus and Minimus groups of *Anopheles* (*Cellia*). *J Med Entomol* 42: 522-236.

34. Walton C, Handley JM, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RE, et al. (1999) Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med Vet Entomol* 13: 24-32.
35. Walton C, Somboon P, O'Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, et al. (2007) Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infect Genet Evol* 7: 93-102.
36. Roudiere L, Jacquot A, Marchandin H, Aujoulat F, Devine R, et al. (2009) Optimized PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. *J Microbiol Methods* 79: 156-165.
37. Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 68: 3691-3701.
38. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, et al. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6955-6959.
39. DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5685-5689.
40. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, et al. (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38: 3623-3630.
41. Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
42. Kampfer P, Lindh JM, Terenius O, Haghdoost S, Falsen E, et al. (2006) *Thorsellia anophelis* gen. nov., sp. nov., a new member of the *Gammaproteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 335-338.
43. Kampfer P, Terenius O, Lindh JM, Faye I (2006) *Janibacter anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of *Anopheles arabiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 389-392.
44. Djadid ND, Jazayeri H, Gholizadeh S, Rad Sh P, Zakeri S (2009) First record of a new member of *Anopheles* Hyrcanus Group from Iran: molecular identification, diagnosis, phylogeny, status of kdr resistance and *Plasmodium* infection. *J Med Entomol* 46: 1084-1093.
45. Gusmao DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M, Jr., Berbert-Molina MA, et al. (2010) Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms

associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop* 115: 275-281.

46. Riehle MA, Jacobs-Lorena M (2005) Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 699-707.
47. Straif SC, Mbogo CN, Toure AM, Walker ED, Kaufman M, et al. (1998) Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *J Med Entomol* 35: 222-226.

**Table 1:** Midgut bacterial flora displaying the number of bacteria per phylum linked to each *Anopheles* species.

Bacterial phylum	<i>Anopheles</i>								Total
	<i>dirus</i> (n = 33)	<i>maculatus</i> (n = 2)	<i>minimus</i> (n = 33)	<i>pampanai</i> (n = 4)	<i>rampae</i> (n = 6)	<i>sawadwongporni</i> (n = 12)	<i>scanloni</i> (n = 3)	<i>jeyporiensis</i> (n = 5)	
<i>Acidobacteria</i>	1		1			1		1	4
<i>Actinobacteria</i>	17	2	13	2		4			38
<i>Bacteroidetes</i>	4		2	1	1		1	1	10
<i>Firmicutes</i>	26	1	23	2	5	9	3	1	70
<i>Planctomycetes</i>			1						1
<i>Proteobacteria</i>	32	2	30	4	6	11	2	5	92
<i>Synergistetes</i>			1			1			2
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>5</b>	<b>71</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>217</b>



**Table 2:** 105 bacterial genera detected in midgut of *Anopheles* species from Binh Phuoc Province – Vietnam, with the number of specimens carrying each genus. Diversity index and total number of bacterial genera per *Anopheles* species are given at the bottom of the table.

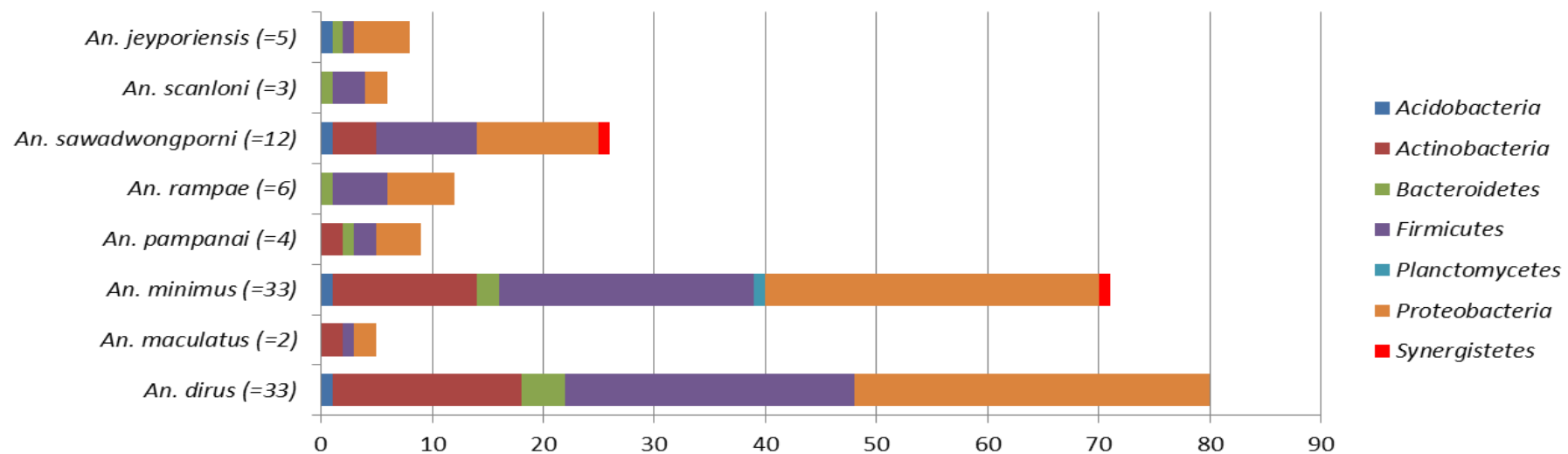
\*, Genera detected by culture method.

Phyla	Bacterial genera	<i>An. dirus</i> (n = 33)	<i>An. maculatus</i> (n = 2)	<i>An. minimus</i> (n = 33)	<i>An. pampanai</i> (n = 4)	<i>An. rampae</i> (n = 6)	<i>An. sawadwongporni</i> (n = 12)	<i>An. scanloni</i> (n = 3)	<i>An. jeyporiensis</i> (n = 5)	Total
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	1		1						2
	<i>Aciditerrimonas</i>	1		1	1					3
	<i>Aeromicrobium</i> *	1								1
	<i>Agrococcus</i> *	3	1	2			1			7
	<i>Arthrobacter</i> *	1					1			2
	<i>Brachybacterium</i> *	1								1
	<i>Brevibacterium</i> *	1								1
	<i>Corynebacterium</i> *	3	1	3						7
	<i>Curtobacterium</i> *	1								1
	<i>Dactylosporangium</i>			1						1
	<i>Herbiconiux</i> *			1						1
	<i>Intrasporangium</i>	1								1
	<i>Janibacter</i> *	3		1	1		1			6
	<i>Knoellia</i> *	1		1			1			3
	<i>Microbacterium</i> *	3		1			1			5
	<i>Micrococcus</i> *	1		2			1			4
	<i>Mycobacterium</i> *	1		1			1			3
	<i>Nocardia</i> *			1						1
	<i>Nocardioides</i> *			1			1			2
	<i>Piscicoccus</i>	1								1
<i>Propionibacterium</i>	6	1	9	1					17	
<i>Rhodococcus</i> *	1								1	
<i>Streptomyces</i> *	4	1	3	1					9	
<i>Terrabacter</i> *							1		1	
Bacteroidetes	<i>Cloacibacterium</i>	1			1	1				3
	<i>Dyadobacter</i> *	1								1
	<i>Flavobacterium</i>			1						1
	<i>Pedobacter</i> *	1								1
	<i>Planobacterium</i>					1				1
Firmicutes	<i>Acidaminococcus</i>			1						1
	<i>Aerococcus</i>			2						2
	<i>Anaeroarcus</i>	2								2
	<i>Anoxybacillus</i>	4		1		1	1			7
	<i>Bacillus</i> *	11		9	1			1	1	23
	<i>Clostridium</i>	3		9	2	3	4			21
	<i>Fingoldia</i>				1		1			2
	<i>Gemella</i>		1	1						2
	<i>Geobacillus</i>	3		1	1		1			6
	<i>Lactococcus</i>						1			1
	<i>Natroniella</i>	1		1						2
	<i>Paenibacillus</i>					1				1
	<i>Pediococcus</i>	1								1
	<i>Peptostreptococcus</i>	2		2	1	2	3			10
	<i>Staphylococcus</i> *	7		12	2	3	3	2		29
	<i>Streptococcus</i>	1						1		2
	<i>Thermoanaerobacterium</i>		1							1
<i>Tissierella</i>			2						2	

**Table 2:** (continued)

Proteobacteria	<i>Acidovorax</i>	3		1						4
	<i>Acinetobacter</i> *	7	1	5	3		2			18
	<i>Aeromonas</i>			2						2
	<i>Agrobacterium</i> *	3								3
	<i>Aquabacterium</i>					1	1			2
	<i>Asaia</i> *	1		5		1	1			8
	<i>Beijerinckia</i>	1			1					2
	<i>Bradyrhizobium</i>	1								1
	<i>Brevundimonas</i>	1		1					1	3
	<i>Burkholderia</i>	3		3				1	3	10
	<i>Campylobacter</i>	1								1
	<i>Candidatus Cyrtobacter</i>			1						1
	<i>Caulobacter</i>								2	2
	<i>Comamonas</i>	8		4			2	1		15
	<i>Curvibacter</i>							1		1
	<i>Daeguia</i>	1								1
	<i>Delftia</i>	7	1	5				1	2	16
	<i>Devosia</i>	1		1						2
	<i>Diplorickettsia</i>	1								1
	<i>Duganella</i>		1							1
	<i>Enhydrobacter</i>			1						1
	<i>Enterobacter</i> *	1								1
	<i>Erythrobacter</i>								1	1
	<i>Gluconacetobacter</i>	3								3
	<i>Haematobacter</i> *	1								1
	<i>Hydrogenophaga</i>								1	1
	<i>Hyphomicrobium</i>			1						1
	<i>Janthinobacterium</i>	1		1						2
	<i>Klebsiella</i> *	1								1
	<i>Luteimonas</i>					1				1
	<i>Lysobacter</i>	1		4	1	4	4			14
	<i>Massilia</i>	1		2			1			4
	<i>Methylobacterium</i>	1		1	1		2	1		6
	<i>Methylocystis</i>			1						1
	<i>Methylohalobius</i>	1					1			2
	<i>Moraxella</i> *			1						1
	<i>Nevskia</i>	1		1						2
	<i>Nitrosomonas</i>	1								1
	<i>Novosphingobium</i>	1							2	3
	<i>Orientia</i>			1						1
	<i>Pantoea</i> *	3		2						5
	<i>Paracoccus</i>	2	1	2		2				7
	<i>Peredibacter</i>			1						1
	<i>Proteus</i>	3	1	3	1					8
	<i>Pseudolabrys</i>	1								1
	<i>Pseudomonas</i>								2	2
<i>Rickettsia</i>			1						1	
<i>Rhodobacter</i>	1								1	
<i>Rubellimicrobium</i>	1				1				2	
<i>Simplicispira</i>								1	1	
<i>Sphingomonas</i>	2		3	2	2	2	1	1	13	
<i>Sphingopyxis</i>	1	1	1		1	2			6	
<i>Stenotrophomonas</i> *	1					1			2	
<i>Tepidimonas</i>	2		1						3	
<i>Thorsellia</i>							1		1	
<i>Variovorax</i>						1		1	2	
<i>Xenophilus</i> *	1								1	
Synergistetes				1			1		2	
	<b>Total</b>	<b>144</b>	<b>12</b>	<b>128</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>44</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>404</b>
	<b>Diversity Index</b>	<b>4.4</b>	<b>6.0</b>	<b>3.9</b>	<b>5.8</b>	<b>4.0</b>	<b>3.7</b>	<b>3.7</b>	<b>3.6</b>	<b>4.1</b>

**Figure 1:** Microbiota composition of *Anopheles* species, displayed by bacterial phylum detected in each species.



## IV. Discussion

Les communautés bactériennes de 11 espèces d'*Anopheles*<sup>1</sup> de populations sauvages de 2 Provinces, Dak Nong et Binh Phuoc, du centre-sud Vietnam, ont été explorées en appliquant deux méthodes, la culture bactérienne et la PCR-TTGE du gène 16S. Les résultats obtenus ont montré que 90,5% des spécimens d'*Anopheles* étaient colonisés par des bactéries. Les communautés bactériennes de ces anophèles étaient très diverses avec la dominance de bactéries du Phylum *Proteobacteria* observée dans les populations d'anophèles des 2 provinces. Certains de ces taxa bactériens sont considérés comme étant impliqués dans la résistance d'espèces d'*Anopheles* au développement de *Plasmodium*, tels qu'*Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea* [14,15,156,170].

Parmi les bactéries identifiées, 18 genres bactériens de 4 Phyla, dont *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*, ont été répertoriés chez les spécimens d'*Anopheles* collectés. La flore bactérienne de l'estomac des moustiques collectés dans la Province de Dak Nong a montré la présence, dans 5 espèces d'*Anopheles*, de 30 genres bactériens appartenant à 4 phyla, alors que dans les 8 espèces d'*Anopheles* collectés dans la Province Binh Phuoc, 105 genres de bactéries appartenant à 7 phyla ont été répertoriés. Toutefois, notons que le nombre de spécimens étudiés par la méthode de culture à Dak Nong (52/100, soit 52%) a été moindre que ceux de Binh Phuoc (100% de spécimens étudiés). Ces résultats nous ont permis de constater qu'il existe à la fois une communauté bactérienne communes dans les populations d'*Anopheles* des 2 provinces, au même titre que certains genres bactériens sont spécifiques à chaque province, en lien avec les spécificités écologiques de chacun des sites de collecte. Cette constatation est en accord avec les résultats montrés par Boissière et al. [20,93] sur les bactéries présentes chez *An. gambiae* du Cameroun [20] et nos résultats comparant la communauté bactérienne d'espèces d'*Anopheles* collectés en Thaïlande et au Vietnam [93]. Ces études ont montré qu'il n'y avait pas de lien entre les bactéries et les espèces-hôtes d'*Anopheles* et qu'il s'agit de l'influence des sites d'étude sur la biodiversité de la flore bactérienne dans l'estomac des anophèles.

Compte tenu des limites des méthodes dans la recherche sur les communautés bactériennes de l'estomac des anophèles [18,93], nous avons utilisé 2 approches différentes, l'une par culture bactérienne et l'autre moléculaire par PCR-TTGE, afin de détecter un large spectre de

---

<sup>1</sup> *An. barbumbrosus*, *An. crawfordi*, *An. dirus*, *An. gigas*, *An. jeyporiensi*, *An. maculatus*, *An. minimus*, *An. pampanai*, *An. rampae*, *An. sawadwongporni*, *An. scanloni*.

bactéries. Les résultats obtenus ont montré la colonisation de l'estomac d'*Anopheles* du Vietnam par un grand nombre de bactéries (116 genres affiliés à 7 phyla), dont des bactéries originales décrites uniquement chez les *Anopheles*, tels que *Janibacter anophelis* et *Thorsellia anophelis* [159,160], mais aussi des bactéries majeures dont certains genres considérés dominants dans la flore bactérienne d'autres espèces d'*Anopheles*, comme : *Acinetobacter* [18,20,93,184]. Ce résultat nous a conforté dans le choix et la combinaison des 2 méthodes utilisées pour cette étude et qui seront appliquées dans les études ultérieures.

Un des objectifs de cette étude sur les bactéries symbiontes des *Anopheles* était de détecter certaines espèces bactériennes identifiées dans la littérature comme associée à l'infection palustre chez les anophèles et pouvant avoir un influence sur la résistance de l'hôte aux parasites pathogènes. Cependant, le faible nombre de spécimens d'*Anopheles* infectés par *Plasmodium*, détectés parmi nos échantillons, n'a pas permis d'approfondir le sujet. Nous montrons cependant que les 2 spécimens d'*Anopheles* infectés par *P. vivax* étaient colonisés par 6 taxa bactériens et qu'il existe une association significative entre *Acinetobacter* sp. et l'infection à *P. vivax* chez ces anophèles. Cette association devra bien sûr être vérifiée avec un plus grand nombre d'échantillons infectés. Les 5 autres taxa (*Geobacillus* sp., *Luteimonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Rubellimicrobium* sp. et *Sphingomonas* sp.) n'ont aucune implication significative liée à l'infection de ces *Anopheles*. Les études précédentes ont mis en évidence l'implication de bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, tels que *Enterobacter*, *Serratia* et *Pantoea* [14,15,156,170], dans la réduction du développement de *Plasmodium* chez les *Anopheles*. D'autre part, nous avons montré, dans une étude récente, la présence de bactéries du genre *Acinetobacter* dans l'estomac des *Anopheles* de Thaïlande et du Vietnam [93], la même constatation a été faite chez des vecteurs du paludisme du Cameroun [20] et de l'Iran [18]. Pourtant, aucun lien particulier entre la double présence d'*Acinetobacter* et de *Plasmodium* chez les anophèles n'a été décrit dans ces travaux.

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse a permis de définir la faune anophélienne de Dak Nong et Binh Phuoc, deux provinces voisines du centre sud du Vietnam, localisées à la frontière avec le Cambodge dans une région à paludisme endémique. Une grande diversité de la faune anophélienne a été trouvée avec 24 espèces d'*Anopheles*, dont des vecteurs majeurs appartenant aux Complexes Dirus, Minimus et Groupe Maculatus. Parmi ces vecteurs majeurs, *An. dirus*, espèce présente dans les sites d'étude des 2 provinces, était l'espèce dominante (74,3%) à Binh Phuoc, associée à *An. minimus* identifié que dans cette province. A Dak Nong, l'espèce dominante était *An. maculatus* (48,7%) considéré comme un vecteur secondaire au Vietnam. L'application systématique de méthodes moléculaires pour l'identification précise des espèces appartenant à des complexes ou groupe d'*Anopheles*, nous a permis d'identifier *An. rampae*, espèce du Groupe Maculatus (*An. maculatus* forme K) dans la Province de Binh Phuoc, et d'y révéler, pour la première fois au Vietnam, la présence d'*An. scanloni*. Cette espèce, dont la distribution connue se répartit du sud du Myanmar jusqu'au sud de la Thaïlande, appartient au Complexe Dirus qui comprend au total 8 espèces. La présence d'*An. scanloni* au Vietnam augmente à 3 le nombre d'espèces jumelles de ce complexe au Vietnam (*An. dirus*, *An. scanloni*, *An. aff. takasagoensis*) et représente une extension majeure de sa distribution vers l'est. Ainsi, cette étude montre qu'il est primordial d'appliquer des méthodes fiables, comme les techniques moléculaires, pour identifier avec le plus de précision possible la composition en espèces d'*Anopheles* des sites d'étude et plus particulièrement pour appréhender de façon sûre la présence d'espèces vectrices, primaires et secondaires, et de les différencier des espèces non-vectrices, afin d'appliquer des stratégies de lutte antivectorielle ciblées et adaptées.

Les erreurs d'identification d'espèces d'*Anopheles* dues à des variations morphologiques conditionnées par des changements environnementaux, climatiques ou géographiques ont été reconnues parmi des espèces du genre d'*Anopheles*, dont les espèces du Groupe Hyrcanus. La large distribution en régions Asiatique et Paléarctique des espèces du Groupe Hyrcanus, pouvant avoir un rôle dans la transmission du paludisme et de la FLB, ont montré les difficultés dans la taxonomie et donc l'identification des espèces de ce Groupe. Notre étude a permis de clarifier la relation entre *Anopheles crawfordi* et l'espèce proche, *An. dangi*, qui n'avait été décrite qu'au Vietnam en 1987. Cette espèce n'avait jamais fait l'objet d'une description formelle et internationalement reconnue. Ainsi, en combinant des approches morphologiques et moléculaires, nous avons montré qu'*An. dangi* n'est qu'une variation

morphologique d'*An. crawfordi* et doit dorénavant être considéré comme le synonyme de cette dernière.

La détection de 2 spécimens infectés par *Plasmodium vivax* a été révélée chez *An. dirus* et *An. pampanai* de Binh Phuoc, avec un taux d'infection de 0,41% (2/486) parmi les spécimens de cette province et un taux spécifique de 0,28% (1/361) pour *An. dirus* et 20% (1/5) pour *An. pampanai*. Aucun spécimen n'a été trouvé infecté par un des trois parasites, *P. falciparum*, *P. knowlesi* et *Wuchereria bancrofti*, quelle que soit la province. Dans le contexte de transmission du paludisme en continu, d'une faune anophélienne diverse, observée dans cette région, et de la présence de vecteurs majeurs et secondaires, ce faible taux d'infection global, ainsi que l'infection élevée d'un vecteur secondaire (*An. pampanai*) due au faible échantillonnage, suggèrent la nécessité de réaliser d'autres études sur les vecteurs le long de la frontière entre le Vietnam et le Cambodge afin d'évaluer le rôle vectoriel des espèces d'anophèles dans ces provinces. Le fait qu'aucun spécimen parmi 765 n'était porteur du nématode *Wuchereria bancrofti*, nous encourage à continuer le programme de lutte antivectorielle intégrant le traitement des patients avec une médication de masse afin d'arriver à éliminer la filariose de Bancroft au Vietnam.

En complément de l'étude sur la biodiversité des espèces d'*Anopheles* au centre-sud Vietnam et de leur implication dans la transmission des agents du paludisme, cette étude a aussi exploré la flore bactérienne de l'estomac d'espèces d'*Anopheles*. Ce travail a montré que la flore bactérienne dans l'estomac des *Anopheles* du centre-sud Vietnam est diverse, composée d'au moins 116 genres bactériens appartenant à 7 phyla et que certaines bactéries pourraient avoir une influence sur le développement de *Plasmodium* chez les *Anopheles*. Cette capacité prometteuse devrait faire l'objet d'études plus poussées afin d'envisager une approche biologique du contrôle des vecteurs et de la transmission du paludisme. Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*), qui sont considérées dans la littérature comme pouvant avoir une implication dans la résistance des *Anopheles* dans le développement de *Plasmodium*, étaient présentes dans les spécimens d'*Anopheles* des deux provinces. En dehors de l'exploration des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, nous avons montré qu'il existe un lien significatif entre les bactéries du genre *Acinetobacter* et la présence de *Plasmodium vivax* chez 2 espèces d'*Anopheles* du Vietnam. Malgré le faible effectif de notre étude, c'est la première fois que la communauté bactérienne de l'estomac de spécimens d'*Anopheles* naturellement infectés par *Plasmodium* est décrite. Nous avons également montré une association positive entre la colonisation de l'estomac des *Anopheles*



par des bactéries du genre *Acinetobacter* et la présence de *Plasmodium vivax*. L'étude des bactéries symbiontes pouvant réduire le développement des *Plasmodium* chez les *Anopheles* vecteurs est un projet prometteur développé dans de nombreuses publications récentes. Dans le contexte du contrôle de la transmission des agents pathogènes, basée sur les bactéries des moustiques, ces résultats préliminaires sur la flore bactérienne des vecteurs sont encourageants et des travaux de recherche doivent être développés afin de trouver d'autres approches potentiellement applicables et d'établir une stratégie intégrée de gestion de la lutte antivectorielle et du contrôle du paludisme au Vietnam.

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

- Figure 1 : Cycle du *Plasmodium* dans un *Anopheles* vecteur, indiquant les obstacles à franchir (épithélium cellulaire et matrices extracellulaires) et le nombre de parasites normalement trouvés à chaque stade de développement
- Figure 2 : Carte du Vietnam avec la localisation des Provinces de Dak Nong et de Binh Phuoc dans le cadre rouge. La commune de Dak Ngo (Province de Dak Nong) et de Bu Gia Map (Province de Binh Phuoc) sont localisées par les triangles violet et jaune, respectivement.
- Figure 3 : Cycle biologique de *Plasmodium* spp.
- Figure 4 : Cycle biologique de *Wuchereria bancrofti*
- Figure 5 : Activités du GPELF et étapes séquentielles recommandées par l'OMS.
- Figure 6: Sites de collectes dans la Province de Dak Nong.
- Figure 7: Sites de collectes dans la Province de Binh Phuoc.
- Figure 8 : Distribution actuelle d'*Anopheles scanloni* (Complexe Dirus)
- Figure 9 : Mécanismes de résistance des colonies de bactéries contre l'infection due à *Plasmodium*.

## TABLEAU

- Tableau 1 : Distribution des espèces d'*Anopheles* du Vietnam basée sur la littérature publiée pendant la période 2005 – 2013.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Buck AA, Anderson RI, MacRae AA (1978) Epidemiology of poly-parasitism. I. Occurrence, frequency and distribution of multiple infections in rural communities in Chad, Peru, Afghanistan, and Zaire. *Tropenmed Parasitol* 29: 61-70.
2. Michael E, Bundy DA (1997) Global mapping of lymphatic filariasis. *Parasitol Today* 13: 472-476.
3. Manguin S, Bangs MJ, Pothikasikorn J, Chareonviriyaphap T (2010) Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infect Genet Evol* 10: 159-177.
4. Manguin S, Garros C, Dusfour I, Harbach RE, Coosemans M (2008) Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: an updated review. *Infect Genet Evol* 8: 489-503.
5. Manguin S, Carnevale P, Mouchet J, Coosemans M, Julvez J, et al. (2008) Biodiversity of malaria in the world. Montrouge, France. 464 p.
6. WHO (2012) World Malaria Report. Geneva, Switzerland: WHO Press. 195 p.
7. WHO (2013) Lymphatic filariasis: a handbook of practical entomology for national lymphatic filariasis elimination programmes. 1211 Geneva 27, Switzerland: WHO Press. 107 p.
8. Corbel V, N'Guessan R (2013) Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes: New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 579-633.
9. Harbach RE (2013) The phylogeny and classification of *Anopheles*. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. InTech Open Access Publisher ed. Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher. pp. 3-55.
10. Sinden RE, Billingsley PF (2001) *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol* 17: 209-212.
11. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V (2003) The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* 78: 675-683.
12. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog* 5: e1000423.
13. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, et al. (2006) *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog* 2: e52.

14. Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE (2003) Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol* 40: 371-374.
15. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, et al. (2011) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* 332: 855-858.
16. Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA (2005) Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol* 21: 568-572.
17. Briones AM, Shililu J, Githure J, Novak R, Raskin L (2008) *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. *ISME J* 2: 74-82.
18. Chavshin AR, Oshaghi MA, Vatandoost H, Pourmand MR, Raeisi A, et al. (2012) Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Trop* 121: 129-134.
19. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, et al. (2010) Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb Ecol* 60: 644-654.
20. Boissiere A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, et al. (2012) Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog* 8: e1002742.
21. Djadid ND, Jazayeri H, Raz A, Favia G, Ricci I, et al. (2011) Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. *PLoS One* 6: e28484.
22. GSO (2011) Generale Statistics Office: Statistics data. Hanoi, Vietnam: Generale statistics office.
23. Schuftan C, Le DC. The successful fight against malaria in Vietnam; 2001; Hanoi - Vietnam. pp. 30-35.
24. Marchand RP, Culleton R, Maeno Y, Quang NT, Nakazawa S (2011) Co-infections of *Plasmodium knowlesi*, *P. falciparum*, and *P. vivax* among Humans and *Anopheles dirus* Mosquitoes, Southern Vietnam. *Emerg Infect Dis* 17: 1232-1239.
25. Garros C, Marchand RP, Quang NT, Hai NS, Manguin S (2005) First record of *Anopheles minimus* C and significant decrease of *An. minimus* A in central Vietnam. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 139-143.

26. Garros C, Van Nguyen C, Trung HD, Van Bortel W, Coosemans M, et al. (2008) Distribution of *Anopheles* in Vietnam, with particular attention to malaria vectors of the *Anopheles minimus* complex. *Malar J* 7: 11.
27. Dusfour I, Harbach RE, Manguin S (2004) Bionomics and systematics of the Oriental *Anopheles sundaicus* complex in relation to malaria transmission and vector control. *Am J Trop Med Hyg* 71: 518-524.
28. Erhart A, Ngo DT, Phan VK, Ta TT, Van Overmeir C, et al. (2005) Epidemiology of forest malaria in central Vietnam: a large scale cross-sectional survey. *Malar J* 4: 58.
29. Mekong malaria III (2013): Towards malaria elimination in the Greater Mekong Subregion. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44: 307.
30. Meyrowitsch DW, Nguyen DT, Hoang TH, Nguyen TD, Michael E (1998) A review of the present status of lymphatic filariasis in Vietnam. *Acta Trop* 70: 335-347.
31. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, et al. (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024.
32. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, et al. (2008) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 46: 165-171.
33. Cox-Singh J, Singh B (2008) Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol* 24: 406-410.
34. Nakazawa S, Marchand RP, Quang NT, Culleton R, Manh ND, et al. (2009) *Anopheles dirus* co-infection with human and monkey malaria parasites in Vietnam. *Int J Parasitol* 39: 1533-1537.
35. Thang ND, Erhart A, Hung le X, Thuan le K, Xa NX, et al. (2009) Rapid decrease of malaria morbidity following the introduction of community-based monitoring in a rural area of central Vietnam. *Malar J* 8: 3.
36. Nguyen HV, Van den Eede P, Van Overmeir C, Thang ND, Hung le X, et al. (2012) Marked age-dependent prevalence of symptomatic and patent infections and complexity of distribution of human *Plasmodium* species in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 87: 989-995.
37. Cox-Singh J (2009) *Knowlesi* malaria in Vietnam. *Malar J* 8: 269.
38. Van den Eede P, Van HN, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc TN, et al. (2009) Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malar J* 8: 249.

39. Van Nam N, de Vries PJ, Van Toi L, Nagelkerke N (2005) Malaria control in Vietnam: the Binh Thuan experience. *Trop Med Int Health* 10: 357-365.
40. Tran TH, Dolecek C, Pham PM, Nguyen TD, Nguyen TT, et al. (2004) Dihydroartemisinin-piperaquine against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Vietnam: randomised clinical trial. *Lancet* 363: 18-22.
41. Tran TH, Nguyen TT, Nguyen HP, Boni MF, Ngo VT, et al. (2012) *In vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam. *Malar J* 11: 355.
42. Hung LQ, Vries PJ, Giao PT, Nam NV, Binh TQ, et al. (2002) Control of malaria: a successful experience from Viet Nam. *Bull World Health Organ* 80: 660-666.
43. Nguyen DS, Dao BH, Nguyen PD, Nguyen VH, Le NB, et al. (1993) Treatment of malaria in Vietnam with oral artemisinin. *Am J Trop Med Hyg* 48: 398-402.
44. Verle P, Ruyen NT, Huong NT, Be NT, Kongs A, et al. (1998) A simple field test for detecting pyrethroids on impregnated nets. *Trop Med Int Health* 3: 833-836.
45. Trung HD, Van Bortel W, Sochantha T, Keokenchanh K, Quang NT, et al. (2004) Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia. *Trop Med Int Health* 9: 230-237.
46. Trung HD, Bortel WV, Sochantha T, Keokenchanh K, Briet OJ, et al. (2005) Behavioural heterogeneity of *Anopheles* species in ecologically different localities in Southeast Asia: a challenge for vector control. *Trop Med Int Health* 10: 251-262.
47. Khai PN, Van NT, Lua TT, Huu VT, Dang DT, et al. (2000) The situation of malaria along the Vietnam-Lao PDR border and some related factors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31 Suppl 1: 99-105.
48. Van Bortel W, Trung HD, Thuan le K, Sochantha T, Socheat D, et al. (2008) The insecticide resistance status of malaria vectors in the Mekong region. *Malar J* 7: 102.
49. Huong NM, Hewitt S, Davis TM, Dao LD, Toan TQ, et al. (2001) Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in a highly endemic area of southern Viet Nam: a study *in vivo* and *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 325-329.
50. Ngo T, Duraisingh M, Reed M, Hipgrave D, Biggs B, et al. (2003) Analysis of *pfprt*, *pfmdr1*, *dhfr*, and *dhps* mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *Am J Trop Med Hyg* 68: 350-356.

51. Van Bortel W, Chinh VD, Berkvens D, Speybroeck N, Trung HD, et al. (2009) Impact of insecticide-treated nets on wild pyrethroid resistant *Anopheles epiroticus* population from southern Vietnam tested in experimental huts. *Malar J* 8: 248.
52. Verhaeghen K, Van Bortel W, Trung HD, Sochantha T, Coosemans M (2009) Absence of knockdown resistance suggests metabolic resistance in the main malaria vectors of the Mekong region. *Malar J* 8: 84.
53. Sinou V, Quang LH, Pelleau S, Huong VN, Huong NT, et al. (2011) Polymorphism of *Plasmodium falciparum* Na(+)/H(+) exchanger is indicative of a low in vitro quinine susceptibility in isolates from Viet Nam. *Malar J* 10: 164.
54. Vythilingam I, Sidavong B, Chan ST, Phonemixay T, Vanisaveth V, et al. (2005) Epidemiology of malaria in Attapeu Province, Lao PDR in relation to entomological parameters. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 833-839.
55. Van Bortel W, Trung HD, Hoi LX, Van Ham N, Van Chut N, et al. (2010) Malaria transmission and vector behaviour in a forested malaria focus in central Vietnam and the implications for vector control. *Malar J* 9: 373.
56. Peeters Grietens K, Xuan XN, Van Bortel W, Duc TN, Ribera JM, et al. (2010) Low perception of malaria risk among the Ra-glai ethnic minority in south-central Vietnam: implications for forest malaria control. *Malar J* 9: 23.
57. Marchand RP, Tuyen NQ, Hoanh NQ, Vien NT (1996) The Khanh Phu malaria research project. Hanoi. 168 p.
58. Abe T, Honda S, Nakazawa S, Tuong TD, Thieu NQ, et al. (2009) Risk factors for malaria infection among ethnic minorities in Binh Phuoc, Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40: 18-29.
59. Erhart A, Thang ND, Hung NQ, Toi le V, Hung le X, et al. (2004) Forest malaria in Vietnam: a challenge for control. *Am J Trop Med Hyg* 70: 110-118.
60. Sanh NH, Van Dung N, Thanh NX, Trung TN, Van Co T, et al. (2008) Forest malaria in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 79: 652-654.
61. Bui HM, Clements AC, Nguyen QT, Nguyen MH, Le XH, et al. (2011) Social and environmental determinants of malaria in space and time in Viet Nam. *Int J Parasitol* 41: 109-116.
62. WHO (2011) World malarial report. Geneva, Switzerland: Worl Health Organisation. pp. 270.



63. IMPEQN (2013) Malaria situation in the Centre and Highlands region: Statistic data of 2012 18 January 2013 ed. Quy Nhon - Vietnam: Epidemiology department - Institute of Malaria, Parasitology and Entomology - Quy Nhon.
64. Do MC, Beebe NW, Van VN, Quang TL, Lein CT, et al. (2010) Vectors and malaria transmission in deforested, rural communities in north-central Vietnam. *Malar J* 9: 1-12.
65. Pongvongsa T, Ha H, Thanh L, Marchand RP, Nonaka D, et al. (2012) Joint malaria surveys lead towards improved cross-border cooperation between Savannakhet province, Laos and Quang Tri province, Vietnam. *Malar J* 11: 262.
66. Nguyen VQ (2005) Chemical method applicable for the areas with low malarial prevalence in Bac Kan province National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology NIMPE - Ha Noi. 30 p.
67. Tran QT (2005) Epidemiological studies of malaria and malarial prevention measures applicable at Son La hydro-electrical areas. Institute of Malaria, Parasitology and Entomology: IMPE - Hanoi. 50 p.
68. Erhart A, Thang ND, Xa NX, Thieu NQ, Hung LX, et al. (2007) Accuracy of the health information system on malaria surveillance in Vietnam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 216-225.
69. Mak JW (1981) Filariasis in Southeast Asia. *Ann Acad Med Malays* 10: 112-119.
70. Scott AL (1999) Lymphatic-dwelling filariae; Pasvol G, Hoffman SL, editors. Farrer Road, Singapore Imperial College Press.
71. Michael E, Bundy DA, Grenfell BT (1996) Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. *Parasitol* 112 ( Pt 4): 409-428.
72. Srividya A, Das PK, Subramanian S, Ramaiah KD, Grenfell BT, et al. (1996) Past exposure and the dynamics of lymphatic filariasis infection in young children. *Epidemiol Infect* 117: 195-201.
73. WHO (1994) Lymphatic filariasis infection and disease: control strategies. Report of a consultative meeting held at the Universiti Sains Malaysia, Penang. Malaysia. . WHO Geneva. 39 p.
74. Montresor A, Cong DT, Sinuon M, Tsuyuoka R, Chanthavisouk C, et al. (2008) Large-scale preventive chemotherapy for the control of helminth infection in Western Pacific countries: six years later. *PLoS Negl Trop Dis* 2: 278.

75. Nguyen DA (2006) Study on lymphatic filariasis characteristic in Khanh Vinh district, Khanh Hoa province and intervention effectiveness [Thesis in vietnamese]. Hanoi: University of Medicine. 134 p.
76. Mai TT (2013) Lymphatic filariasis Ninh Thuan: Department of health - Ninh Thuan Province.
77. IMPE, editor (2008) Keys to identify the *Anopheles* mosquitoes (Adults-Pupae-Larvae). Hanoi: Department of Entomologie - Institute of Malariology, Parasitology and Entomology. 62 p.
78. Takano KT, Nguyen NT, Nguyen BT, Sunahara T, Yasunami M, et al. (2010) Partial mitochondrial DNA sequences suggest the existence of a cryptic species within the Leucosphyrus Group of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae), forest malaria vectors, in northern Vietnam. *Parasit Vectors* 3: 1-16.
79. Van Bortel W, Harbach RE, Trung HD, Roelants P, Backeljau T, et al. (2001) Confirmation of *Anopheles varuna* in Vietnam, previously misidentified and mistargeted as the malaria vector *Anopheles minimus*. *Am J Trop Med Hyg* 65: 729-732.
80. Sungvornyothin S, Garros C, Chareonviriyaphap T, Manguin S (2006) How reliable is the humeral pale spot for identification of cryptic species of the Minimus Complex? *J Am Mosq Control Assoc* 22: 185-191.
81. Walton C, Somboon P, Harbach RE, Zhang S, Weerasinghe I, et al. (2007) Molecular identification of mosquito species in the *Anopheles annularis* group in southern Asia. *Med Vet Entomol* 21: 30-35.
82. Suwonkerd W, Ritthison W, Ngo CT, Tainchum K, Bangs MJ, et al. (2013) Vector biology and malaria transmission in Southeast Asia. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: INTECH. pp. 273 - 325.
83. Dusfour I, Linton YM, Cohuet A, Harbach RE, Baimai V, et al. (2004) Molecular evidence of speciation between island and continental populations of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), a principal malaria vector taxon in Southeast Asia. *J Med Entomol* 41: 287-295.
84. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Chareonviriyaphap T, Patil AP, et al. (2011) The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 4: 89.

85. Vu DC (2006) Distribution of *Anopheles* mosquito, the malarial transmission vector in some forested habitat, located in northern part of Vietnam. Hanoi: IMPE-Hanoi. 40 p.
86. Vu TP, editor (1998) Epidemiologie du paludisme et lutte antipaludique au Vietnam. Edition médicale ed. Hanoi-Vietnam.
87. Van Bortel W, Trung HD, Manh ND, Roelants P, Verle P, et al. (1999) Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. Trop Med Int Health 4: 257-265.
88. Van Bortel W, Trung HD, Roelants P, Backeljau T, Coosemans M (2003) Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles minimus* A in Vietnam. Heredity (Edinb) 91: 487-493.
89. Thang ND, Erhart A, Speybroeck N, Xa NX, Thanh NN, et al. (2009) Long-Lasting Insecticidal Hammocks for controlling forest malaria: a community-based trial in a rural area of central Vietnam. PLoS One 4: e7369.
90. Garros C, Van Bortel W, Trung HD, Coosemans M, Manguin S (2006) Review of the Minimus Complex of *Anopheles*, main malaria vector in Southeast Asia: from taxonomic issues to vector control strategies. Trop Med Int Health 11: 102-114.
91. Obsomer V, Defourny P, Coosemans M (2007) The *Anopheles dirus* complex: spatial distribution and environmental drivers. Malar J 6: 26.
92. Obsomer V, Dufrene M, Defourny P, Coosemans M (2013) *Anopheles* species associations in Southeast Asia: indicator species and environmental influences. Parasit Vectors 6: 136.
93. Manguin S, Ngo CT, Tainchum K, Juntarajumnong W, Michon AL, et al. (2013) Bacterial biodiversity in midgut of *Anopheles* mosquitoes, malaria vectors in Southeast Asia. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 549-576.
94. Ngo CT, Harbach RE, Garros C, Parzy D, Le HQ, et al. (2013) Taxonomic assessment of *Anopheles crawfordi* and *An. dangi* of the Hyrcanus Group of subgenus *Anopheles* in Vietnam. Acta Trop 128: 623-629.
95. Le Sueur D, Sharp BL (1991) Temperature-dependent variation in *Anopheles merus* larval head capsule width and adult wing length: implications for anopheline taxonomy. Med Vet Entomol 5: 55-62.
96. Le Sueur D, Sharp BL, Appleton CC (1992) Dark-scaled areas on adult *Anopheles* mosquitoes are selectively affected by temperature-related size variation. Med Vet Entomol 6: 369-372.

97. Harrison BA (1980) The Myzomyia Series of *Anopheles (Cellia)* in Thailand, with emphasis on intra-interspecific variations (Diptera: Culicidae); Institute CotAE, editor: Contrib. Amer. Ent. Inst. 195 p.
98. Singh OP, Nanda N, Dev V, Bali P, Sohail M, et al. (2010) Molecular evidence of misidentification of *Anopheles minimus* as *Anopheles fluviatilis* in Assam (India). Acta Trop 113: 241-244.
99. Hwang UW, Yong TS, Ree HI (2004) Molecular evidence for synonymy of *Anopheles yatsushiroensis* and *An. pullus*. J Am Mosq Control Assoc 20: 99-104.
100. Phuc HK, Ball AJ, Son L, Hanh NV, Tu ND, et al. (2003) Multiplex PCR assay for malaria vector *Anopheles minimus* and four related species in the Myzomyia Series from Southeast Asia. Med Vet Entomol 17: 423-428.
101. Foley DH, Beebe N, Torres E, Saul A (1996) Misidentification of a Philippine malaria vector revealed by allozyme and ribosomal DNA markers. Am J Trop Med Hyg 54: 46-48.
102. Ma Y, Xu J (2005) The Hyrcanus group of *Anopheles (Anopheles)* in China (Diptera: Culicidae): species discrimination and phylogenetic relationships inferred by ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 sequences. J Med Entomol 42: 610-619.
103. Hwang UW (2007) Revisited ITS2 phylogeny of *Anopheles (Anopheles)* Hyrcanus group mosquitoes: reexamination of unidentified and misidentified ITS2 sequences. Parasitol Res 101: 885-892.
104. Reid JA (1953) The *Anopheles Hyrcanus* Group in South-east Asia (Diptera: Culicidae). Bulletin of entomological research. London: Commonwealth Institute of Entomology, 41, Queen's gate, S.W.7.: South Essex Recorders, LTD. pp. 76.
105. Simpson TW (1951) A note on filariasis among the natives of Okinawa, with particular reference to possible transmission of *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles hyrcanus sinensis*. Am J Trop Med Hyg 31: 614-616.
106. Sen P (1956) *Anopheles hyrcanus* as a vector of filariasis in West Bengal. Nature 178–750: 749-750.
107. Nguyen DM, Tran DH, Harbach RE, Elphick J, Linton YM (2000) A new species of the Hyrcanus Group of *Anopheles*, subgenus *Anopheles*, a secondary vector of malaria in coastal areas of southern Vietnam. J Am Mosq Control Assoc 16: 189-198.
108. Rueda LM, Kim HC, Klein TA, Pecor JE, Li C, et al. (2006) Distribution and larval habitat characteristics of *Anopheles* Hyrcanus group and related mosquito species (Diptera: Culicidae) in South Korea. J Vector Ecol 31: 198-205.

109. Rueda LM, Zhao T, Ma Y, Gao Q, Ding ZG, et al. (2007) Updated distribution records of the *Anopheles (Anopheles) hyrcanus* species-group (Diptera: Culicidae) in China. *Zootaxa* 1407: 43-55.
110. Park MH, Choochote W, Kim SJ, Somboon P, Saeung A, et al. (2008) Nonreproductive isolation among four allopatric strains of *Anopheles sinensis* in Asia. *J Am Mosq Control Assoc* 24: 489-495.
111. Rueda LM, Li C, Kim HC, Klein TA, Foley DH, et al. (2010) *Anopheles belenrae*, a potential vector of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea. *J Am Mosq Control Assoc* 26: 430-432.
112. Poncon N, Toty C, Kengne P, Alten B, Fontenille D (2008) Molecular evidence for similarity between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae), sympatric potential vectors of malaria in France. *J Med Entomol* 45: 576-580.
113. Hwang UW, Tang LH, Kobayashi M, Yong TS, Ree HI (2006) Molecular evidence support that *Anopheles anthropophagus* from China and *Anopheles lesteri* from Japan are the same species. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 324-329.
114. Gao Q, Beebe NW, Cooper RD (2004) Molecular identification of the malaria vectors *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in central China using polymerase chain reaction and appraisal of their position within the Hyrcanus group. *J Med Entomol* 41: 5-11.
115. Min GS, Choochote W, Jitpakdi A, Kim SJ, Kim W, et al. (2002) Intraspecific hybridization of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) strains from Thailand and Korea. *Mol Cells* 14: 198-204.
116. IMPE, editor (1987) Keys to identify the *Anopheles* in Vietnam (Adult - Pupae - Larvae). Printed in the Hanoi Architectural University ed. Hanoi: Department of Entomology. Institute of Malariology, Parasitology and Entomology. 66 p.
117. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
118. Durnez L, Coosemans M (2013) Residual Transmission of Malaria: An Old Issue for New Approaches. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 671-704.
119. Dicko A, Doumbo O (2011) Efficacy of RTS,S malaria vaccine given with EPI vaccines. *Lancet Infect Dis* 11: 722-723.

120. Manguin S, Boete C (2011) Global Impact of Mosquito Biodiversity, Human Vector-Borne Diseases and Environmental Change In: Lopez JP, editor. The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity: InTech. pp. 27-50.
121. Garros C, Harbach RE, Manguin S (2005) Morphological assessment and molecular phylogenetics of the Funestus and Minimus groups of *Anopheles (Cellia)*. J Med Entomol 42: 522-236.
122. Garros C, Koekemoer LL, Coetzee M, Coosemans M, Manguin S (2004) A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. Am J Trop Med Hyg 70: 583-590.
123. Walton C, Handley JM, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RE, et al. (1999) Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. Med Vet Entomol 13: 24-32.
124. Manguin S, Kengne P, Sonnier L, Harbach RE, Baimai V, et al. (2002) SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. Med Vet Entomol 16: 46-54.
125. Walton C, Somboon P, O'Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, et al. (2007) Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. Infect Genet Evol 7: 93-102.
126. Burkot TR, Williams JL, Schneider I (1984) Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 33: 783-788.
127. Sandeu MM, Moussiliou A, Moiroux N, Padonou GG, Massougbedji A, et al. (2012) Optimized Pan-species and speciation duplex real-time PCR assays for *Plasmodium* parasites detection in malaria vectors. PLoS One 7: e52719.
128. Cunha MG, Medina TS, Oliveira SG, Marinho AN, Pova MM, et al. (2009) Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Acta Trop 111: 35-38.
129. Lucchi NW, Poorak M, Oberstaller J, DeBarry J, Srinivasamoorthy G, et al. (2012) A new single-step PCR assay for the detection of the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. PLoS One 7: e31848.
130. Rao RU, Atkinson LJ, Ramzy RM, Helmy H, Farid HA, et al. (2006) A real-time PCR-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in blood and mosquitoes. Am J Trop Med Hyg 74: 826-832.

131. Rao RU, Huang Y, Bockarie MJ, Susapu M, Laney SJ, et al. (2009) A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 365-370.
132. Snounou G, Singh B (2002) Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med* 72: 189-203.
133. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN (1993) Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 58: 283-292.
134. Beier JC, Koros JK (1991) Anatomical dissemination of circumsporozoite protein in wild Afrotropical *Anopheles* affects malaria sporozoite rate determination by ELISA. *Med Vet Entomol* 5: 81-85.
135. Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franco AS, Snounou G, et al. (2000) *Plasmodium* sp.: optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp.) samples. *Exp Parasitol* 94: 269-272.
136. Durnez L, Van Bortel W, Denis L, Roelants P, Veracx A, et al. (2011) False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. *Malar J* 10: 195.
137. Vo TK, Bigot P, Gazin P, Sinou V, De Pina JJ, et al. (2007) Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 422-428.
138. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK (2009) Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol* 47: 975-980.
139. Divis PC, Shokoples SE, Singh B, Yanow SK (2010) A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. *Malar J* 9: 344.
140. Ayala D, Caro-Riano H, Dujardin JP, Rahola N, Simard F, et al. (2011) Chromosomal and environmental determinants of morphometric variation in natural populations of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon. *Infect Genet Evol* 11: 940-947.
141. Paredes-Esquivel C, Donnelly MJ, Harbach RE, Townson H (2009) A molecular phylogeny of mosquitoes in the *Anopheles barbirostris* Subgroup reveals cryptic species: implications for identification of disease vectors. *Mol Phylogenet Evol* 50: 141-151.

142. Paredes-Esquivel C, Harbach RE, Townson H (2011) Molecular taxonomy of members of the *Anopheles hyrcanus* group from Thailand and Indonesia. *Med Vet Entomol* 25: 348-352.
143. Baimai V, Kijchalao U, Sawadwongporn P, Green CA (1988) Geographic distribution and biting behaviour of four species of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 19: 151-161.
144. Poopittayasataporn A, Baimai V (1995) Polytene chromosome relationships of five species of the *Anopheles dirus* complex in Thailand. *Genome* 38: 426-434.
145. Muenworn V, Sungvornyothin S, Kongmee M, Polsomboon S, Bangs MJ, et al. (2009) Biting activity and host preference of the malaria vectors *Anopheles maculatus* and *Anopheles sawadwongporni* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vector Ecol* 34: 62-69.
146. Singh S, Prakash A, Yadav RN, Mohapatra PK, Sarma NP, et al. (2012) *Anopheles (Cellia) maculatus* group: its spatial distribution and molecular characterization of member species in north-east India. *Acta Trop* 124: 62-70.
147. Wu S, Pan JY, Wang XZ, Zhou SS, Zhang GQ, et al. (2009) *Anopheles pseudowillmori* is the predominant malaria vector in Motuo County, Tibet Autonomous Region. *Malar J* 8: 46.
148. Nguyen TA (1993) Malaria in Vietnam. Environment, prevention and treatment. *Bull Soc Pathol Exot* 86: 494-499.
149. Ochomo EO, Bayoh NM, Walker ED, Abongo BO, Ombok MO, et al. (2013) The efficacy of long-lasting nets with declining physical integrity may be compromised in areas with high levels of pyrethroid resistance. *Malar J* 12: 368.
150. Chang XL, Xue YQ, Zhang AD, Zhu GD, Fang Q (2013) [Deltamethrin resistance, metabolic detoxification enzyme and kdr mutation in *Anopheles sinensis* in region along Huaihe River in Anhui Province]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi* 25: 263-267.
151. Ferguson HM, Dornhaus A, Beeche A, Borgemeister C, Gottlieb M, et al. (2010) Ecology: a prerequisite for malaria elimination and eradication. *PLoS Med* 7: 7.
152. Dillon RJ, Dillon VM (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 49: 71-92.
153. Gendrin M, Christophides GK (2013) The *Anopheles* mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Rijeka, Croatia: InTech Open. pp. 525-548.



154. Straif SC, Mbogo CN, Toure AM, Walker ED, Kaufman M, et al. (1998) Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *J Med Entomol* 35: 222-226.
155. Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM (2012) Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol* 21: 5138-5150.
156. Wang Y, Gilbreath TM, 3rd, Kikutla P, Yan G, Xu J (2011) Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One* 6: e24767.
157. Lindh JM, Terenius O, Faye I (2005) 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl Environ Microbiol* 71: 7217-7223.
158. Terenius O, de Oliveira CD, Pinheiro WD, Tadei WP, James AA, et al. (2008) 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *J Med Entomol* 45: 172-175.
159. Kampfer P, Lindh JM, Terenius O, Haghdoost S, Falsen E, et al. (2006) *Thorsellia anophelis* gen. nov., sp. nov., a new member of the *Gammaproteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 335-338.
160. Kampfer P, Terenius O, Lindh JM, Faye I (2006) *Janibacter anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of *Anopheles arabiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 389-392.
161. Kampfer P, Matthews H, Glaeser SP, Martin K, Lodders N, et al. (2011) *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2670-2675.
162. Lindh JM, Borg-Karlson AK, Faye I (2008) Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta Trop* 107: 242-250.
163. Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, Grisez L, Tailliez P, et al. (2005) Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Syst Appl Microbiol* 28: 640-660.
164. Tak V, Mathur P, Varghese P, Misra MC (2013) *Elizabethkingia meningoseptica*: an emerging pathogen causing meningitis in a hospitalized adult trauma patient. *Indian J Med Microbiol* 31: 293-295.

165. Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, et al. (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 9047-9051.
166. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, et al. (2008) Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. Curr Biol 18: 1087-1088.
167. Bando H, Okado K, Guelbeogo WM, Badolo A, Aonuma H, et al. (2013) Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. Sci Rep 3: 1641.
168. Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB (2011) Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Parasitol Res 109: 1179-1187.
169. Favia G, Ricci I, Marzorati M, Negri I, Alma A, et al. (2008) Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. Adv Exp Med Biol 627: 49-59.
170. Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, et al. (2012) Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 9.
171. Dong Y, Das S, Cirimotich C, Souza-Neto JA, McLean KJ, et al. (2011) Engineered anopheles immunity to *Plasmodium* infection. PLoS Pathog 7: e1002458.
172. Meister S, Agianian B, Turlure F, Relogio A, Morlais I, et al. (2009) *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. PLoS Pathog 5: e1000542.
173. Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C (2010) Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. Science 329: 1353-1355.
174. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. Annu Rev Genet 38: 525-552.
175. Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, et al. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. Nature 428: 7.
176. Nossa CW, Oberdorf WE, Yang L, Aas JA, Paster BJ, et al. (2010) Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. World J Gastroenterol 16: 4135-4144.
177. Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221-271.

178. Case RJ, Boucher Y, Dahllof I, Holmstrom C, Doolittle WF, et al. (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 73: 278-288.
179. Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 68: 3691-3701.
180. Roudiere L, Jacquot A, Marchandin H, Aujoulat F, Devine R, et al. (2009) Optimized PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. *J Microbiol Methods* 79: 156-165.
181. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, et al. (2011) Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 158: 390-396.
182. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, et al. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6955-6959.
183. DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5685-5689.
184. Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK (2009) Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* 9: 96.