

Paludisme

Vecteurs de paludisme : du terrain à la génétique moléculaire Recherches en Afrique

Malaria vectors: from the field to genetics. Research in Africa

D. FONTENILLE⁽¹⁾, A. COHUET⁽¹⁾, P. AWONO-AMBENE^(2,3), P. KENGNE⁽¹⁾,
C. ANTONIO-NKONDJIO^(1,2), C. WONDJI^(1,2), F. SIMARD^(1,2)

(1) UR016 IRD (Caractérisation et contrôle des populations de vecteurs), Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5.
Email : didier.fontenille@mpl.ird.fr (*Tirés à part* : D. Fontenille).

(2) Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), BP 288, Yaoundé, Cameroun.

(3) Centre de Recherches Médicales, Institut de Recherches Médicales et des Plantes Médicinales (IMPM), Yaoundé, Cameroun.

Only about 60 Anopheline species transmit malaria among more than 3,000 mosquito species recorded in the world. In Africa, the major vectors are Anopheles gambiae, An. arabiensis, An. funestus, An. nili and An. moucheti. They all belong to species complexes or groups of closely related species that are very difficult to set apart on morphological grounds, but which may have highly variable behaviours and vectorial capacities. Understanding this complexity is of major importance in vector control programs or for implementing any public health intervention program such as drugs or vaccine trials.

Among the seven species of the complex, Anopheles gambiae s.s. shows a huge chromosomal polymorphism related to adaptation to specific natural or anthropic environments, from equatorial forested Africa to dry sahelian areas. Recent studies conducted in West and Central Africa suggest an incipient speciation into 2 molecular forms provisionally called M and S.

A similar evolutionary phenomenon is observed in An. funestus, in which sympatric populations carrying specific chromosomal paracentric inversions showed restricted gene flow. Distribution of species from An. nili group and An. moucheti complex is restricted to more humid regions of Africa. However in some areas these species play the major role in malaria transmission.

Comprehensive knowledge of transmission cycles and of behavioural and underlying genetic heterogeneities that exist within and among natural vector populations will thus benefit the whole area of malaria control and epidemiology. Molecular and genetic studies, as well as in depth monitoring of vector biology, have been recently facilitated by advances in functional and comparative genomics, including recent publication of the nearly complete genome sequence of An. gambiae. Challenge for the next years is to answer to the very simple question: why is an insect a vector?

Malaria. Vector. Molecular biology.

Parmi les plus de 3 000 espèces de moustiques décrites dans le monde, seule une soixantaine, appartenant au genre Anopheles, peut transmettre des Plasmodium à l'homme.

En Afrique, les vecteurs de Plasmodium appartiennent essentiellement à des complexes d'espèces, qui regroupent des espèces morphologiquement identiques mais ayant une biologie et des caractères génétiques variés. Ces différentes espèces ont des rôles vectoriels extrêmement différents. Les opérations de

contrôle vectoriel ou d'intervention en santé publique (vaccins, essais thérapeutiques, ...) doivent évaluer et prendre en compte cette hétérogénéité, qui a des conséquences épidémiologiques importantes.

Le complexe *Anopheles gambiae* est constitué de sept espèces différentes, dont l'espèce *An. gambiae* s.s. caractérisée par un exceptionnel polymorphisme d'inversions chromosomiques adaptées à des environnements très divers, et par une spéciation en cours en formes M et S. Parmi ce complexe certaines espèces sont non vectrices. Le rôle de l'Homme dans cette évolution récente reste à préciser, mais les populations à capacités vectorielles les plus élevées sont celles qui sont le plus liées aux comportements humains. Par la modification de l'environnement et de son mode de vie l'homme post-néolithique a lui-même créé les gîtes favorables à *An. gambiae* et les conditions de son expansion. Un phénomène identique semble exister chez l'espèce *An. funestus*, où adaptation à de nouveaux environnements et dérive génétique génèrent l'apparition actuelle de nouvelles espèces, à compétence vectorielle élevée. D'autres espèces plus inféodées au bloc forestier d'Afrique centrale, tels que les espèces du groupe *An. nili*, et les deux espèces probables du complexe *An. moucheti* sont également capables de transmettre les parasites du paludisme.

La compréhension de ces cycles très variés de transmission nécessite de conduire des études de terrain en biologie des populations et des études de laboratoire en biologie moléculaire et génétique des populations. L'accès à la séquence du génome d'*Anopheles gambiae* ouvre de nouvelles perspectives en génomique et génomique fonctionnelle, et nous devrions être capables, dans les prochaines années, de répondre aux questions suivantes : quels gènes sont impliqués dans l'adaptation à l'environnement et dans la réponse des vecteurs aux *Plasmodium* ? En un mot, de commencer à comprendre pourquoi un insecte peut être vecteur.

Paludisme. Vecteurs. Biologie moléculaire.

INTRODUCTION

La transmission de *Plasmodium* à l'homme par les moustiques est un événement qui nécessite la rencontre et la compatibilité [1] de trois partenaires : l'homme, le vecteur et le parasite. Cette occurrence ne se produit que lorsque les conditions environnementales, avec ses composantes biologiques, physiques, climatiques et humaines, sont favorables. Concernant les vecteurs, sur près d'un million d'espèces d'insectes déjà répertoriées, et parmi les plus de 3 000 espèces de moustiques décrites dans le monde, seule une soixantaine, appartenant au genre *Anopheles*, est responsable de la transmission des *Plasmodium* à l'homme. L'étude des vecteurs et de la transmission vectorielle est un préalable indispensable non seulement à un contrôle efficace et ciblé des moustiques, mais également lors de recherches épidémiologiques sur la mortalité, la morbidité, l'efficacité thérapeutique, les essais vaccinaux, etc. L'interprétation des données épidémiologiques doit être replacée dans son contexte vectoriel : quelle est l'intensité de la transmission (nombre de piqûres infectantes qu'un homme reçoit par unité de temps) ? Quelles en sont les fluctuations au cours du temps (cycle nycthé-

méraux et saisonniers, variations inter-annuelles) ? Quelles sont les espèces vectrices ? Les différentes espèces transmettent-elles les mêmes espèces plasmodiales, les mêmes génotypes parasitaires ? La recherche des réponses à ces questions nécessite de conduire des études approfondies sur le terrain, en zone d'endémie, comme au laboratoire, faisant parfois appel aux techniques de biologie moléculaire et de génomique les plus récentes.

C'est en Afrique que l'impact du paludisme sur le développement est le plus grand. C'est sur ce continent que la transmission est la plus intense et que les cycles palustres sont les plus diversifiés. Dans la ville de Yaoundé au Cameroun par exemple, la transmission du paludisme par les moustiques varie de 3 à 33 piqûres infectantes par homme et par an dans les quartiers centraux [2, 3] jusqu'à environ 300 piqûres infectantes par homme et par an dans le quartier Simbock situé à la périphérie de la ville [4], où au moins quatre espèces d'anophèles différentes interviennent (*fig. 1*). De plus, les principaux vecteurs africains appartiennent tous à des complexes ou groupes d'espèces. Un complexe est un ensemble d'espèces différentes génétiquement, non interfécondes dans

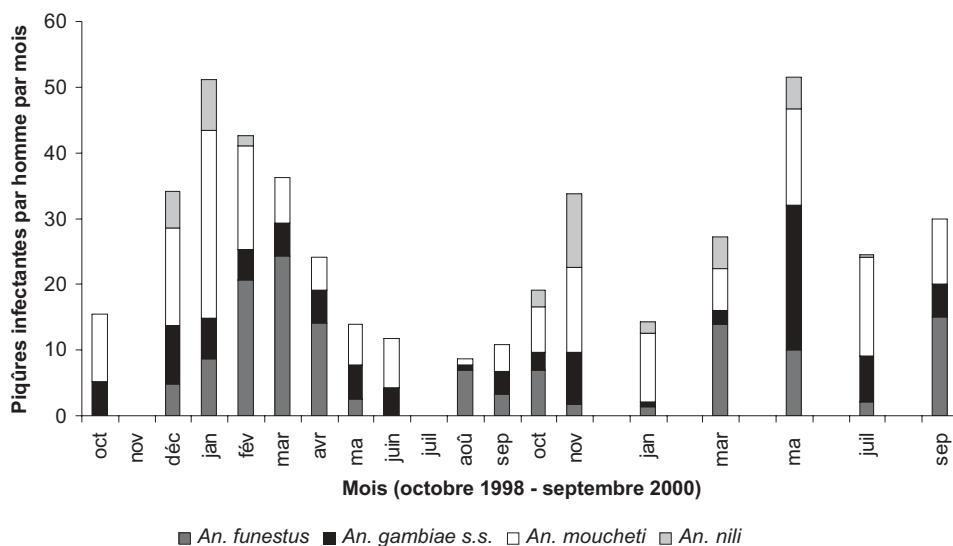


FIG. 1. — Taux d'inoculation entomologique mensuel de *Plasmodium falciparum* par les différentes espèces vectrices, à Simbock, Cameroun, d'octobre 1998 à septembre 2000.

la nature, mais identiques morphologiquement. À l'intérieur d'un groupe d'espèces de petites différences morphologiques peuvent être observées à un stade donné du développement de l'insecte. Le complexe *An. gambiae*, les groupes *Funestus*, *Nili* et *Moucheti* sont les plus importants [5]. D'autres vecteurs secondaires ou d'importance locale peuvent également être impliqués dans la transmission (*An. paludis*, *An. hancocki*, *An. pharoensis*, *An. mascarensis*, etc.). Le rôle des espèces et populations de vecteurs dans la transmission de *Plasmodium* n'est encore que partiellement connu et fait actuellement l'objet d'études menées en parallèle sur le terrain et au laboratoire, que nous allons détailler ci-dessous.

DES VECTEURS VARIÉS

Le complexe *An. gambiae* regroupe sept espèces : *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* et *An. quadriannulatus* B.

Les larves d'*An. melas* et *An. merus* se développent en eau saumâtre. *Anopheles bwambae* est inféodé à la forêt de Semliki en Uganda où ses larves se développent dans les sources minérales qu'on ne trouve que dans cette région. Bien que

capables de transmettre les *Plasmodium* humains, ces trois espèces n'ont qu'un rôle local et d'appoint dans la transmission du paludisme. Les deux espèces d'*An. quadriannulatus*, quant à elles, sont essentiellement zoophiles (elles se nourrissent préférentiellement sur animaux) et ne sont donc pas impliquées dans la transmission de pathogènes humains. Les vecteurs majeurs dans ce complexe sont *An. gambiae stricto sensu* et *An. arabiensis* qui ont une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent africain, *An. gambiae* étant plutôt adapté aux zones de forêt et de savane alors qu'*An. arabiensis* se retrouve dans des environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara [6, 7]. Leur zone de recouvrement est cependant très importante et on les trouve souvent en sympatrie sur une grande partie du continent. Leur propension à se gorger sur homme plutôt que sur bétail, leur faculté à pénétrer dans les maisons et à coloniser des gîtes larvaires créés par l'homme en font d'excellents vecteurs de *Plasmodium* [8, 9]. Cette adaptation est très probablement la conséquence d'une co-évolution récente avec l'homme lorsqu'il est passé d'un mode de vie nomade de chasseur-cueilleur à cultivateur-éleveur sédentaire il y a environ 2 500 ans, créant de nouvelles niches écologiques [10]. Les sept espèces du complexe *An. gambiae* étant identiques

morphologiquement, leur identification s'est d'abord faite par l'observation d'inversions chromosomiques spécifiques sur les chromosomes polytènes des femelles à un stade précis du développement ovarien [11]. Depuis une douzaine d'années, on utilise un test PCR (polymerase chain reaction) spécifique d'espèce, basé sur le polymorphisme observé au niveau des ADN ribosomiaux (rDNA). Cet outil moléculaire permet d'identifier rapidement les spécimens collectés sur le terrain à n'importe quel stade de leur développement [12]. *An. gambiae stricto sensu* s'est adaptée à des environnements très différents, des régions équatoriales humides aux régions sahéliennes. Ces adaptations sont en grande partie liées à la présence d'inversions chromosomiques polymorphes observées notamment sur le chromosome 2. Cinq « formes chromosomiques » ont ainsi été définies en Afrique de l'Ouest en fonction de ces inversions : les formes « forêt », « savane », « Bamako », « Bissau » et « Mopti » [11, 13, 14]. Elles se répartissent principalement selon le degré d'aridité du milieu. Ainsi, la forme « forêt », caractérisée par l'arrangement standard (pas d'inversion) sur les deux bras du chromosome 2, peuple les environnements les plus humides, les formes « savane » ou « Mopti » se retrouvant dans des environnements plus secs. La difficulté à travailler sur les chromosomes polytènes a conduit plusieurs équipes à rechercher des marqueurs moléculaires de ces formes chromosomiques. Des mutations fixées sur les fragments intergéniques des rDNA différenciant « Mopti », d'une part, et « savane-Bamako », d'autre part, ont été identifiées sur des populations du Mali, du nord de la Côte d'Ivoire et du Burkina Faso. Un test PCR a été développé permettant de différencier les formes, dites moléculaires, M et S [15-17]. Il est cependant rapidement apparu que l'association « Mopti » = M et « savane/Bamako » = S n'était pas respectée dans d'autres pays [18]. Cependant, quelles que soient les régions d'Afrique, il a été clairement observé que les flux de gènes entre la forme M et la forme S sont très réduits, démontrant un phénomène de spéciation en cours [16, 18, 19]. Dans le Sud Cameroun, par exemple, tous les *An. gambiae* appartiennent à la forme chromosomique « forêt », non inversée. Ils se répartissent cependant entre formes moléculaires M et S, parfois dans le même village. Ainsi à Simbock, où les deux formes sont sym-

patriques et également vectrices, une analyse génétique basée sur le polymorphisme de loci microsatellites a montré que les populations M et S sont significativement différenciées. De plus, l'absence d'hybride M-S confirme que, dans cette région au moins, la séparation en deux espèces distinctes est en voie d'achèvement [20]. La spéciation entre les formes moléculaires peut avoir un impact en termes de lutte antivectorielle. La mutation Kdr, par exemple, qui procure une résistance croisée aux pyréthrinoides et au DDT et que l'on peut mettre en évidence par un test PCR, a initialement été identifiée et détectée uniquement chez la forme moléculaire S, alors que les spécimens M, même retrouvés en sympatrie, ne présentaient que l'allèle sensible [21]. Cette résistance se retrouve maintenant également chez les formes M et, depuis peu, chez *An. arabiensis* [22]. D'autres mécanismes de résistance, soit de type mutationnel, soit de type métabolique, ont également été mis en évidence chez des populations d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Ouest ou du centre [23].

Les espèces du groupe *Anopheles funestus* sont mal connues et encore peu étudiées. Parmi la dizaine d'espèces décrites sur la base de très discrets caractères morphologiques sur les larves ou les adultes, seul *An. funestus stricto sensu* est réellement vecteur de *Plasmodium*. *Anopheles confusus*, *An. lesoni*, *An. rivulorum*, *An. rivulorum-like*, *An. brucei*, *An. parensis*, *An. aruni*, *An. vaneedeni* ne sont généralement pas anthropophiles [9, 24], bien que des *Plasmodium* humains ont été rarement observés chez *An. rivulorum* en Tanzanie [25] et qu'*An. vaneedeni* a pu être infesté expérimentalement [26].

L'identification précise de l'espèce dans le groupe est donc d'une grande importance pour la lutte anti-vectorielle sur le terrain. Ainsi en Tanzanie et en Afrique du Sud, alors que des moustiques persistaient après traitement insecticide, on a cru à un échec du contrôle d'*An. funestus*. Il s'est avéré que seuls des individus d'*An. parensis*, d'*An. rivulorum* ou d'*An. vaneedeni* s'étaient maintenus. Plus récemment, *An. parensis* a été trouvé en abondance dans des maisons au Kenya, mais il n'était pas impliqué dans la transmission et ne nécessitait donc pas de contrôle [27]. Comme pour le complexe *An. gambiae*, une PCR multiplexe a pu être développée pour différencier les espèces du groupe *An. funestus* [28, 29].

Depuis une dizaine d'années on a pris conscience que l'espèce *An. funestus sensu stricto* elle-même ne constituait pas une entité homogène à travers l'Afrique. Elle colonise des environnements très divers, son comportement trophique et de repos peut être très contrasté, et la capacité de différentes populations à transmettre les *Plasmodium* est très variable. Des études de cytogénétique réalisées d'ouest en est sur le continent Africain ont montré que cette espèce présente au moins 11 inversions chromosomiques sur les chromosomes 2 et 3 [30-34]. Au Burkina Faso, de forts déficits d'hétérozygotes couplés à des déséquilibres de liaisons significatifs entre certaines inversions chromosomiques, ont conduit Costantini *et al.* [35] à émettre l'hypothèse de l'existence de deux formes chromosomiques sympatriques dénommées Kiribina et Folonzo, pouvant témoigner d'un phénomène de spéciation en cours chez *An. funestus*. Ces données ont été récemment confirmées par une étude de la structuration génétique des populations réalisée à l'aide de marqueurs microsatellites (Costantini : communication personnelle). Des observations suggérant une subdivision en formes chromosomiques ont également été faites au Sénégal [33] et au Cameroun, où les individus sont de forme standard dans le nord et de forme inversée dans le sud, avec un fort déficit d'hybrides en certains points de la zone de recouvrement [36]. Comme pour *An. gambiae* un gradient de fréquence d'inversions observé du sud au nord, suggère que la présence de ces inversions reflète un mécanisme d'adaptation à l'environnement et au climat. Ces observations de cytogénétique en Afrique de l'Ouest mettent en évidence des flux de gènes restreints entre les formes chromosomiques, alors qu'au Kenya [37] ou à Madagascar la différenciation en « cytotypes » n'est pas pertinente, malgré la présence d'inversions, en particulier sur le chromosome 3. Au Cameroun pourtant, l'analyse de la structure génétique des populations basée sur la comparaison des fréquences génotypiques d'allèles microsatellites, a révélé que des échanges géniques importants continuent d'avoir lieu entre populations cytogénétiquement structurées, la distance géographique entre populations restant le facteur majeur de différenciation génétique.

Parmi les autres vecteurs contribuant à la transmission des *Plasmodium* humains en Afrique, les

groupes Nili et Moucheti, ont fait l'objet de recherches récentes. Le groupe Nili est actuellement constitué de quatre espèces : *An. nili s.s.*, *An. somalicus*, *An. carnevalei* et une nouvelle espèce récemment décrite, *An. ovengensis* [38]. *An. nili* a une large distribution le long des cours d'eau de région forestière et de savane, alors que les trois autres espèces semblent n'être présentes qu'en région équatoriale ou très humide. Seul *An. somalicus* n'est pas vecteur parmi ces quatre espèces. Un test PCR a été développé pour identifier ces espèces, morphologiquement très proches [39]. Le statut taxonomique d'*An. moucheti* reste encore à préciser [40]. Les larves de ce groupe se développent dans les rivières à cours lent d'Afrique centrale. Des observations sur la morphologie et le comportement de différentes populations ont conduit à entreprendre des études de génétique, qui montrent que ce groupe compte très probablement au moins deux espèces (Antonio Nkondjio et Kengne, communication personnelle).

EN GUISE DE CONCLUSION PROVISOIRE

Grâce aux outils de la biologie moléculaire et aux études de génétique des populations, notre compréhension des cycles de transmission du paludisme observés sur le terrain a considérablement progressé ces dernières années. Des tests simples et faciles à mettre en œuvre, basés sur la PCR, nous permettent aujourd'hui d'identifier rapidement les différentes espèces au sein des complexes d'anophèles, de mesurer les niveaux de différenciation génétique entre populations, de rechercher certains mécanismes de résistance aux insecticides et de les détecter de manière précoce, avant que ceux-ci n'aient de conséquences opérationnelles. Nos connaissances des interrelations entre les différents acteurs du cycle (Homme, *Plasmodium*, moustiques) et leur environnement devraient être facilitées par l'accès récent aux séquences du génome de *Plasmodium falciparum*, de l'Homme et d'*An. gambiae*, qui code pour environ 14 000 gènes [41].

À titre d'exemple, plusieurs équipes se sont intéressées, ces dernières années, aux gènes du comportement, en particulier de recherche d'un repas de sang. Par des procédés bio-informatiques et en comparant les génomes de la drosophile et d'*An. gambiae*, 79 récepteurs potentiels à

odeur et 76 récepteurs potentiels au goût ont été identifiés [42]. Ces recherches pourraient déboucher sur le développement de pièges basés sur l'attraction. C'est cependant dans le domaine de l'immunité des anophèles contre les *Plasmodium* que les recherches ont le plus progressé. Les moustiques ont la capacité de montrer une réponse immunitaire efficace contre les agents pathogènes, impliquant une voie cellulaire *via* des hémocytes et humorale *via* des peptides antimicrobiens [43-49]. Cette réponse, probablement fruit d'une longue co-évolution entre les insectes et les agents pathogènes, maintient un équilibre entre le vecteur et le parasite [50, 51]. Des lignées d'*Anopheles gambiae* réfractaires à *Plasmodium berghei* (*Plasmodium* de rongeur) ont cependant été sélectionnées, des moustiques encapsulant *P. falciparum* ont été observés sur le terrain, et les bases génétiques de la réponse immune ont pu être partiellement appréhendées [52, 54]. De nombreux gènes de l'immunité intervenant dans la reconnaissance des pathogènes, la modulation et la régulation des signaux ou la synthèse de protéines effectrices sont maintenant identifiés, mais aucun n'est pour le moment seul responsable du caractère réfractaire des anophèles aux *Plasmodium* [55-58].

De nouvelles perspectives en génomique structurale et fonctionnelle s'offrent à nous, et nous devrions être capables, dans les prochaines années, de mieux comprendre pourquoi et comment un insecte peut être vecteur, et par là-même d'imaginer de nouvelles méthodes de contrôle [59]. Une des voies que l'Organisation Mondiale de la Santé encourage à explorer est le développement de moustiques transgéniques. La transgénèse est maintenant maîtrisée dans plusieurs laboratoires et des gènes d'intérêt ont été identifiés. L'utilisation de moustiques transgéniques sur le terrain se heurtera cependant à de nombreux obstacles tels que le maintien d'une capacité de reproduction avec les populations naturelles pour les moustiques génétiquement modifiés [60], la présence de plusieurs espèces vectrices et de populations génétiquement structurées dans chaque espèce, et enfin, comme pour chaque méthode de lutte, l'acceptation de cette approche par les populations humaines [61-62].

REMERCIEMENTS : Ces travaux ont bénéficié de financements du programme PAL+ du Ministère Français de la Recherche, de l'OMS-TDR (financements N° A20727 à CAN, N° 990831 à PAA), et de l'IRD.

RÉFÉRENCES

1. Euzet L, Combes C. Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. Mem Soc Zool France 1980 ; 40 : 239-85.
2. Manga L, Robert V, Messi J, Desfontaine M, Carnevale P. Le paludisme urbain à Yaoundé, Cameroun. Une étude entomologique dans deux quartiers centraux. Mem Soc R Belge Ent 1992 ; 35 : 155-62.
3. Nimpaye H, Van Der Kolk M, Fontenille D, Boudin C. Le paludisme urbain à Yaoundé (Cameroun) en 2000. Étude entomologique dans le quartier central « Dakar ». Bull Liais Doc OCEAC 2001 ; 34 : 11-4.
4. Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, Meunier JY, Zebaze-Kemleu S, Nyambam R, et al. High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. J Med Entomol 2002; 39: 350-5.
5. Fontenille D, Simard F. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27: 357-75.
6. White GB. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 1974; 68: 278-301.
7. Coetzee M, Craig M, Le Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. Parasitol Today 2000; 16: 74-7.
8. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). 2nd ed. Johannesburg: The South African Institute for Medical Research, 1968: 343 p.
9. Gillies MT, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara. Johannesburg: The South African Institute for Medical Research, 1987: 143 p.
10. Coluzzi M. *Plasmodium falciparum* en Afrique subsaharienne. Spéciation récente des vecteurs, transmissibilité, évolution de la pathogénèse/contrôle de la maladie et capacité vectorielle. Ann Inst Pasteur Actualités 2002 ; 81-99.
11. Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979; 73: 483-97.
12. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex

- by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 520-9.
13. Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* 1985; 52: 45-63.
 14. Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankaré O, *et al.* The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 1998; 40: 477-511.
 15. Favia G, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon NF, Toure YT, Coluzzi M, *et al.* Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 1997; 6: 377-83.
 16. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA (rDNA) polymorphisms discriminating chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 2001; 10: 19-23.
 17. Fanello C, Santolamazza F, Della Torre A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol* 2002; 16: 461-4.
 18. Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-Yovo J, Favia G, Petrarca V, *et al.* Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 2001; 10: 9-18.
 19. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou-Yovo J, Darriet F, Diabate A, *et al.* Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* 1999; 41: 319-22.
 20. Wondji C, Simard F, Fontenille D. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol* 2002; 11: 11-9.
 21. Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, *et al.* Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 230-4.
 22. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Dabire KR, Simard F, Ouedraogo JB, *et al.* First report of a *kdr* mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. *J Am Mosq Control Assoc* 2004; 20: 195-6.
 23. Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, *et al.* Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 2003; 423: 136-7.
 24. Coetzee M, Fontenille D. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem Mol Biol* 2004; 34: 599-605.
 25. Wilkes TJ, Matola YG, Charlwood JD. *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol* 1996; 10: 108-10.
 26. De Meillon B, Van Eeden GJ, Coetzee L, Coetzee M, Meiswinkel R, Du Toit CLN, *et al.* Observation on a species of the *Anopheles funestus* subgroup, a suspected exophilic vector of malaria parasites in northeastern Transvaal, South Africa. *Mosq News* 1977; 37: 657-61.
 27. Kamau L, Koekemoer LL, Hunt RH, Coetzee M. *Anopheles parensis*: the main member of the *Anopheles funestus* species group found resting inside human dwellings in Mwea area of central Kenya toward the end of the rainy season. *J Am Mosq Control Assoc* 2003; 19: 130-3.
 28. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 804-11.
 29. Cohuet A, Simard F, Toto JC, Kengne P, Coetzee M, Fontenille D. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon, and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 200-5.
 30. Lochouart L, Dia I, Boccolini D, Coluzzi M, Fontenille D. Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 607-12.
 31. Boccolini D, Sabatini A, Sanogo E, Sagnon N, Coluzzi M, Costantini C. Chromosomal and vectorial heterogeneities in *Anopheles funestus* from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* 1994; 36 (Suppl 1): 20.
 32. Boccolini D, Sagnon N, Toure YT. Chromosomal polymorphism in *Anopheles funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia* 1998; 40 (Suppl 1): 14.
 33. Dia I, Lochouart L, Boccolini D, Costantini C, Fontenille D. Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* 2000; 7: 179-84.
 34. Sharakhov I, Braginets O, Grushko O, Cohuet A, Guelbeogo WM, Boccolini D, *et al.* A microsatellite map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. *J Hered* 2004; 95: 29-34.
 35. Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* 1999; 41: 595-611.

36. Cohuet A, Dia I, Simard F, Raymond M, Rousset F, Antonio-Nkondjio C, *et al.* Gene flow between chromosomal forms of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon, Central Africa, and its relevance in malaria fighting. *Genetics* 2005; 169: 301-11.
37. Kamau L, Hunt R, Coetzee M. Analysis of the population structure of *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from western and coastal Kenya using paracentric chromosomal inversion frequencies. *J Med Entomol* 2002; 39: 78-83.
38. Awono-Ambene HP, Kengne P, Simard F, Antonio-Nkondjio C, Fontenille D. Description and bionomics of *Anopheles (Cellia) ovengensis* (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from South Cameroon. *J Med Entomol* 2004; 41: 561-8.
39. Kengne P, Awono-Ambene P, Antonio-Nkondjio C, Simard F, Fontenille D. Molecular identification of members of the *Anopheles nili* group, African malaria vectors. *Med Vet Entomol* 2003; 17: 167-74.
40. Antonio-Nkondjio C, Simard F, Cohuet A, Fontenille D. Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles moucheti*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric South Cameroon populations. *Infect Genet Evol* 2002; 2: 69-72.
41. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, *et al.* The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; 298: 129-49.
42. Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrysal MA, *et al.* G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; 298: 176-8.
43. Hoffmann JA, Reichhard JM, Hetru C. Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 8-13.
44. Dimopoulos G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol* 2003; 5: 3-14.
45. Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J* 1998; 17: 6115-23.
46. Dimopoulos G, Müller HM, Levashina EA, Kafatos FC. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 79-88.
47. Richman AM, Dimopoulos G, Seeley D, Kafatos FC. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *EMBO J* 1997; 16: 6114-9.
48. Tahar R, Boudin C, Thierry I, Bourgoïn C. Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 2002; 21: 6673-80.
49. Meister S, Koutsos AC, Christophides GK. The *Plasmodium* parasite-a 'new' challenge for insect innate immunity. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1473-82.
50. Hogg JC, Hurd H. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae s.l.* in North East Tanzania. *Parasitology* 1997; 114: 325-31.
51. Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* 2004; 303: 2030-2.
52. Collins FH, Sakai RK, Vernick KD, Paskewitz S, Seeley DC, Miller LH, *et al.* Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 1986; 234: 607-10.
53. Schwartz A, Koella JC. Melanization of *Plasmodium falciparum* and C-25 sephadex beads by field-caught *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Southern Tanzania. *J Med Entomol* 2002; 39: 84-8.
54. Niaré O, Markianos K, Vloz J, Oduol F, Touré A, Bagayko M, *et al.* Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. *Science* 2002; 298: 213-6.
55. Oduol F, Xu J, Niaré O, Natajara R, Vernick KD. Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11397-402.
56. Dimopoulos G, Casavant TL, Chang S, Scheetz T, Roberts C, Donohue M, *et al.* *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6619-24.
57. Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, *et al.* Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; 298: 159-65.
58. Blandin S, Levashina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol Immunol* 2004; 40: 903-8.
59. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev* 2004; 198: 127-48.
60. Catteruccia F, Godfray HC, Crisanti A. Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science* 2003; 299: 1225-7.
61. Macer D. Ethical, legal and social issues of genetically modified disease vectors in public health. *Social, Economic and Behavioural Research. Special Topics No.1 TDR/STR/SEB/ST/03.1, OMS-TDR, 2003; 54 pages.*
62. Organisation Mondiale de la Santé, TDR. *Insect Vectors and Human Health. Report of the Scientific Working Group meeting Geneva, 12-16 August, 2002, TDR/SWG/VEC/03.1 2003; 80 pages.*