

SYSTEMATIQUE ET BIOLOGIE DES ANOPHELES VECTEURS DE PLASMODIUM EN AFRIQUE, DONNEES RECENTES

D. FONTENILLE, A. COHUET, P.H. AWONO-AMBENE, C. ANTONIO-NKONDJIO, C. WONDJI, P. KENGNE, I. DIA, D. BOCCOLINI, J-B. DUCHEMIN, V. RAJAONARIVVELO, R. DABIRE, M. ADJA-AKRE, C. CEAINU, G. LE GOFF, F. SIMARD

Med Trop 2003 ; 63 : 247-253

RESUME • Un renouveau des recherches sur les vecteurs de *Plasmodium* en Afrique et le développement des techniques de génétique et biologie moléculaire, en particulier sous l'impulsion de l'OMS et du programme PAL du Ministère français de la recherche, a permis de mieux connaître la biologie et la systématique des principaux groupes de vecteurs. Cet article fait le point sur le complexe *Anopheles gambiae* et les formes M et S d'*An. gambiae* s.s., sur les espèces du groupe *An. funestus* et le polymorphisme génétique d'*An. funestus*, sur les quatre espèces du groupe *An. nili*, sur les deux espèces probables du complexe *An. moucheti* et sur *An. mascarensis*.

MOTS-CLES • Anophèles - Paludisme - Afrique - Spéciation.

SYSTEMATICS AND BIOLOGY OF ANOPHELES MOSQUITO VECTOR OF PLASMODIUM IN AFRICA: NEW DATA

ABSTRACT • Renewed interest in research on *Plasmodium* vectors in Africa and development of genetic and molecular biology techniques has been spearheaded by the WHO and the PAL+ program of the French research ministry. New findings have led to a better understanding of the systematics and biology of the main vector groups. The purpose of this article is to describe the newest data on the *Anopheles gambiae* complex and the M and S forms of *An. gambiae* s.s., on species in the *An. funestus* group and genetic polymorphism of *An. funestus*, on the two probable species in the *An. moucheti* complex, and on *An. mascarensis*.

KEY WORDS • Anopheles – Malaria – Africa – Speciation.

La transmission des *Plasmodium* et la biologie des principaux vecteurs en Afrique sont connues dans leurs grandes lignes depuis plus de 50 ans (1). La description puis l'identification des espèces vectrices se faisait alors sur des critères morphologiques, et des sous-divisions intitulées sous-espèces, formes, races, variétés, etc. étaient signalées sur la base de critères géographiques, comportementaux, de niveau de transmission palustre ou de petites différences morphologiques à un stade de développement donné de l'anophèle.

Dès le début du XX^e siècle, deux formes d'*Anopheles gambiae* Giles, 1902, étaient reconnues, une se développant en eau douce, l'autre en eau saumâtre. Plus tard, l'étude des croisements entre populations d'eau salée et d'eau douce (2), et l'étude de l'héritabilité de la résistance à la dieldrine par des croisements entre populations sensibles et résistantes à cet insecticide (3), ont permis de démontrer que *An. gambiae* était un ensemble d'espèces (d'abord nommées *An. gambiae* A, *An. gambiae* B, *An. melas*, *An. merus*), différentes génétiquement mais identiques morphologiquement. C'est ce qu'on appelle un complexe d'espèces. Puis, *An. gambiae* A lui-même (*An. gambiae* s.s.) s'est avéré être un regroupement de formes chromosomiques, les cytotypes, jusqu'à ce que récemment on découvre que ces cytotypes se regroupaient en au moins deux formes, M et S, dites moléculaires, pouvant être considérées comme deux vraies espèces (4) Les études se focalisent maintenant sur l'étude du génome d'*An. gambiae*.

« Jusqu'où iront-ils ? » entend t'-on parfois. Est-il nécessaire d'approfondir autant pour lutter contre le paludisme ? N'est ce pas un simple hobby d'entomologiste ?

S'il est vrai que les entomologistes ont la description facile, c'est que la « Nature » elle-même s'en est donnée à cœur joie dans la diversité. Près de 900 000 espèces d'insectes sont déjà signalées, représentant plus de 80 % des espèces animales décrites. 10 000 nouvelles espèces d'in-

• Travail du réseau de recherche PAL+ « *Anopheles* d'Afrique » (D.F., directeur de recherche IRD, Montpellier ; A.C., étudiante en thèse, IRD, Montpellier ; P.A.A., Chercheur IMPM, Yaoundé, Cameroun ; C.A.-N., étudiant en thèse, OCEAC, Yaoundé, Cameroun ; C.W., étudiant en thèse, OCEAC, Yaoundé, Cameroun, P.K. chercheur, IRD-Université Montpellier 2, Montpellier ; I.D., chercheur IRD - Institut Pasteur, Dakar, Sénégal ; D.B., Chercheur, ISS, Rome, Italie ; J-B.D., chercheur, Cermes, Niamey, Niger ; V.R., étudiante en thèse, IRD - Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar ; R.D., chercheur, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso ; M.A.-A., étudiant en thèse, Centre Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire ; C.C., chercheur, Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar ; G.L.G., Technicien, IRD - Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar, F.S., Chargé de Recherche, IRD - OCEAC, Yaoundé, Cameroun.

• Correspondance : D. FONTENILLE, LIN, IRD, BP 64501, 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier, Cedex 5, France • Fax : +33 (0)4 67 54 20 44 • E-mail : courriel : didier.fontenille@mpl.ird.fr •

sectes sont publiées chaque année, et on estime entre 2 et 30 millions le nombre d'espèces restant à découvrir. A titre d'exemple, da Cunha Ramos et Brunhes, dans un ouvrage à paraître en 2003 décrivent 48 nouvelles espèces malgaches de moustiques du genre *Uranotaenia* (5).

En ce qui concerne les vecteurs de Plasmodium, cette recherche de la précision n'est pas qu'un pur exercice académique visant à ajouter un nom dans un catalogue. Bien sûr, il serait plus simple de se contenter d'un seul vecteur de Plasmodium (l'*Anopheles*), mais la réalité est beaucoup plus complexe. La connaissance de la systématique a un intérêt très concret dans les stratégies de contrôle actuelles et futures. Viendrait-il à l'idée d'un parasitologiste de regrouper dans une même entité les 4 Plasmodium humains, à un bactériologiste de dire que toutes les souches d'*Echerichia coli* se valent, à un virologiste que les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont équivalents en terme de pathogénicité ? De la même manière, il y a souvent des différences extrêmement importantes en terme de transmission palustre entre deux espèces d'anophèles d'un même complexe. Leur biologie, et par la même les méthodes de contrôle à mettre en place, ne sont pas les mêmes, sans parler de la possibilité que ces différentes espèces ou populations transmettent des génotypes de Plasmodium de pathogénicité, virulence, phénotype clinique différents.

Par ailleurs, si le concept d'espèce au sens biologique que lui donne Mayr (6) «une espèce est un groupe de populations naturelles réellement ou potentiellement inter-fécondes, isolées du point de vue reproductif des autres groupes équivalents», est utile pour décrire et élaborer des stratégies de lutte, ce sont bien les populations spatio-temporelles de vecteurs (c.a.d. des individus d'une même espèce en un lieu et un temps donnés), en relation avec les populations humaines et plasmodiales qui constituent l'unité réellement fonctionnelle d'un système vectoriel.

Le programme PAL+ du Ministère français de la Recherche a permis à un réseau d'entomologistes médicaux français et africains de conduire des recherches sur les vecteurs africains et malgaches, et d'explorer cette complexité. Cet article présente des données récentes obtenues entre 2000 et 2003 sur les principaux groupes ou complexes d'anophèles vecteurs en Afrique.

LE COMPLEXE ANOPHELES GAMBIAE

Le complexe *An. gambiae* regroupe aujourd'hui sept espèces : *An. gambiae* et *An. arabiensis*, deux des vecteurs majeurs de plasmodium en Afrique, ainsi que *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* et *An. quadriannulatus B* récemment décrits en Ethiopie par Hunt et al. (7).

An. melas, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* et *An. quadriannulatus B*, ont un rôle nul ou faible dans l'épidémiologie de la transmission du paludisme. Leur distribution est localisée. En revanche *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont une aire de répartition extrêmement vaste sur

tout le continent africain, *An. gambiae* étant plutôt adapté aux zones de forêt et de savane humide alors qu'*An. arabiensis* peuple les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara (8). La zone de recouvrement de ces deux espèces est cependant très importante et on les trouve souvent en sympatrie. De plus, elles apparaissent extrêmement bien adaptées à l'homme et son environnement, d'une part en termes de préférences trophiques, puisqu'elles présentent toutes les deux un très fort taux d'anthropophilie; d'autre part, c'est auprès de l'homme qu'elles trouvent les gîtes larvaires et les gîtes de repos qui leur conviennent le mieux (9-11).

Le démantèlement de ce complexe d'espèces s'est fait initialement par l'étude des croisements entre populations-espèces à biologie et/ou répartition différentes, la plupart des croisements donnant des mâles F1 stériles (7, 12). Puis l'étude du polymorphisme des chromosomes polytènes par la technique cytogénétique a révélé l'existence d'inversions chromosomiques diagnostiques, permettant de caractériser les différents membres du complexe (13). On dispose aujourd'hui d'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 (14).

Le potentiel adaptatif d'*An. gambiae* s.s. à des environnements très différents est en grande partie lié 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: les formes Forêt, Savane, Bamako, Bissau et Mopti (13, 15, 16) qui se répartissent principalement en fonction du 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 de forêt et de savane les plus humides, les formes Savane ou Mopti se retrouvant quant à elles dans des environnements plus secs, voire très arides.

Depuis la fin des années 90, plusieurs équipes de recherche ont appliqué une approche moléculaire à cette problématique de spéciation chez *An. gambiae*. Ainsi l'étude des fragments intergéniques des rDNA, a permis de définir des sites RFLP différenciant Mopti d'une part et Savane-Bamako d'autre part. Il a alors été possible de synthétiser des amorces pour une PCR spécifique permettant de révéler deux profils différents qu'on a appelés M et S (17, 18). Si au Mali, au Burkina-Faso et en Côte d'Ivoire tous les spécimens Mopti appartiennent à la forme M alors que Savane et Bamako présentent toujours le profil S, ce n'est pas le cas dans les autres régions d'Afrique (4). Cependant, quelles que soient les régions, il a été clairement démontré que les flux de gènes entre la forme M et la forme S sont très réduits, démontrant un phénomène de spéciation en cours (4, 18, 19).

Dans le Sud Cameroun l'ensemble des individus capturés se rattache cytologiquement à la forme chromosomique « forest ». En revanche, ils se répartissent entre

formes moléculaires M et S, parfois dans le même village. Ainsi, dans le village de Simbock, où les deux formes sont sympatriques, une analyse de la différenciation génétique basée sur le polymorphisme de *loci* microsatellites, montre que les populations M et S sont significativement différentes. De plus, le fait qu'aucun hybride MS n'ait été trouvé confirme que dans cette région au moins, la séparation en deux espèces distinctes est en voie d'achèvement (20). Nos travaux en cours s'intéressent maintenant aux causes et aux mécanismes génétiques à l'origine de cette spéciation et à l'étude d'éventuelles différences de capacité et compétence vectorielle entre ces espèces naissantes.

Ces recherches devraient être facilitées par l'accès récent à la séquence presque complète du génome d'*An. gambiae*. En effet l'intérêt d'*An. gambiae*, comme vecteur et comme modèle, a conduit un consortium d'équipes à réaliser son séquençage par une stratégie de *shotgun* (séquençage aléatoire global). Deux banques BAC génomiques ont été constituées, une à partir de moustiques entiers, l'autre à partir des ovaires. Les plasmides contenaient des inserts de trois tailles (2,5 kb, 10 kb et 50 kb). La séquence de ce génome a été publiée en 2002 (21). Malgré des problèmes méthodologiques dus au polymorphisme de départ des moustiques utilisés pour le séquençage, 8987 scaffolds (séries de séquences positionnées) ont été validés pour 278 mégabases qui coderaient pour environ 14 000 gènes. La connaissance, même imparfaite, du génome a permis de classer les protéines prédites par les outils bio-informatiques, en grands groupes d'intérêt, par exemple récepteurs liés à l'olfaction, protéines liées à l'immunité des anophèles, ou liées à la digestion des repas de sang, ou encore intervenant dans la résistance aux insecticides. Tous les gènes codant pour ces protéines pourraient être autant de nouvelles cibles pour le contrôle de la transmission.

LE GROUPE ANOPHELES FUNESTUS

Les espèces du groupe *An. funestus* sont mal connues. On sait, depuis les années 1930, que ce groupe se compose de plusieurs espèces proches qui ne peuvent être différenciées que par de très discrets caractères sur les larves ou les adultes. *An. funestus*, *An. confusus*, *An. leesoni*, *An. rivulorum* et *An. brucei* sont déterminables au stade larvaire, alors que les espèces du sous groupe *funestus* : *An. funestus*, *An. parensis*, *An. aruni* et *An. vaneedeni* peuvent être identifiés par de petites différences morphologiques chez les adultes (10). Leur biologie et leur capacité vectorielle sont très différentes. A l'exception d'*An. funestus*, ces espèces semblent essentiellement zoophiles. Des *Plasmodium* humains n'ont été trouvés que chez *An. funestus* qui est un excellent vecteur, à capacité vectorielle élevée, et très rarement chez *An. rivulorum* en Tanzanie (22). *An. vaneedeni* a pu être infesté expérimentalement (23).

L'identification précise de l'espèce dans le groupe est donc d'une très grande importance pour la lutte anti-vectorielle. Ainsi, en Tanzanie et en Afrique du Sud, alors que des traitements par pulvérisations intra-domiciliaires

avaient éliminé *An. funestus*, quelques spécimens persistaient. Selon la région, il s'est avéré, par une étude minutieuse des individus persistant après traitement, qu'il s'agissait d'*An. parensis*, *An. rivulorum* ou *An. vaneedeni*. Depuis 1998, plusieurs techniques de biologie moléculaire permettent de différencier des espèces du groupe *An. funestus*. Koekemoer et al. ont développé des méthodes basées sur la PCR-RFLP puis la PCR-SSCP, puis ce groupe a proposé récemment une PCR multiplexe basée sur des différences de séquences dans les ITS2 du rDNA, et qui permet d'identifier *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. rivulorum*, *An. leesoni* et *An. parensis* (24-26).

En 2003, Cohuet et Coll (27) ont mis en évidence, sur des critères biologiques, morphologiques et génétiques un nouveau taxon, proche de *An. rivulorum*, présent du Burkina Faso au Cameroun et se différenciant bien des populations d'*An. rivulorum* d'Afrique du Sud où l'espèce a été décrite initialement. Ce nouveau taxon nommé provisoirement «*An. rivulorum-like*» ne semble pas avoir de rôle vecteur. La PCR multiplexe a été complétée par une amorce spécifique du taxon «*An. rivulorum-like*» et rend donc à présent possible l'identification de 6 espèces du groupe *An. funestus*.

A l'intérieur même de l'espèce *An. funestus* il est important de savoir si toutes les populations, caractérisées par leur structure génétique, ont la même compétence et capacité vectorielle. *An. funestus* est très polymorphe, biologiquement et génétiquement. Des études de cytogénétique réalisées du Sénégal à Madagascar ont montré l'extrême hétérogénéité de cette espèce, qui présente au moins 11 inversions chromosomiques paracentriques sur les chromosomes 2, 3 et 5 (28-31).

Au Burkina Faso, de forts déséquilibres d'Hardy-Weinberg couplés à des déséquilibres de liaisons significatifs entre certaines inversions chromosomiques, ont conduit Costantini et Coll (32) à émettre l'hypothèse de l'existence de deux formes chromosomiques sympatriques dénommées Kiribina et Folonzo avec un polymorphisme contrasté, témoignant probablement d'un phénomène de spéciation en cours chez *An. funestus*.

Au Sénégal, ce sont trois populations qui peuvent être individualisées sur la base des inversions chromosomiques. Deux de ces formes chromosomiques se trouvent en sympatrie, avec un fort déficit d'hybrides suggérant, comme au Burkina Faso, deux populations génétiquement isolées (31). Les mêmes observations ont été faites au Cameroun, où une forme chromosomique est présente dans le Nord et une autre au Sud, avec un fort déficit d'hybrides en zone de recouvrement (Cohuet et Coll non publié). Toutes ces observations d'Afrique de l'Ouest, suggèrent des flux de gènes restreints entre les formes chromosomiques, alors qu'au Kenya (33) ou à Madagascar la différenciation en «*cytotypes*» est beaucoup moins nette.

L'analyse des structures génétiques des populations basée sur la comparaison des fréquences génotypiques d'allèles microsatellites a donné des résultats à première vue contradictoires avec ceux de la cytogénétique. Les différentes populations sont apparues beaucoup moins isolées

génétiqnement que ne le laissait penser la structuration caryotypique. Même dans les zones hybrides du Sénégal et du Cameroun, où les formes chromosomiques étaient structurées, l'équilibre de Hardy-Weinberg a été respecté. Ces résultats suggèrent que les inversions chromosomiques sont essentiellement une réponse adaptative à l'environnement, et que des flux de gènes entre formes existent, même si les hybrides sont rares, probablement à cause de la perturbation de la méiose liés aux réarrangements chromosomiques chez ces individus, ou à une capacité reproductive inférieure des hybrides.

La question sur laquelle nous travaillons maintenant est de savoir si la restriction des échanges génétiques due aux inversions chromosomiques est suffisante pour générer un phénomène de spéciation, qui serait génétiquement observable en dehors des inversions concernées.

LE GROUPE *ANOPHELES NILI*

Anopheles nili est largement répandu en Afrique tropicale (33) et apparaît comme le vecteur majeur de Plasmodium dans certaines zones rurales forestières en Afrique centrale (34). Les larves d'*An. nili* s.l. sont typiques des végétations bordant les rives des rivières et les fleuves de ces zones forestières. Des variations morphologiques, écologiques et éthologiques ont été observées dans les populations d'*An. nili* par plusieurs auteurs (9, 35, 36) suggérant qu'*An. nili* s.l. est un groupe d'espèces. Sur la base des critères morphologiques, trois espèces, *An. nili* s.s., *An. somalicus*, et *An. carnevalei* ont été décrites au sein de ce groupe. Très récemment, Awono-Ambene *et Coll* ont mis en évidence une nouvelle forme morphologique dénommée «forme *Oveng*», en zone forestière du Sud Cameroun (résultats non publiés).

Cependant, l'identification précise des membres du groupe *An. nili* est souvent difficile, voire impossible, dans les conditions de terrain, en raison de différences morphologiques mineures sur les larves ou les adultes, parfois rendues peu visibles lorsque les femelles ont perdu des écailles suite à leur capture. De ce fait, la distribution de chaque espèce ainsi que leur degré d'implication dans la transmission du paludisme sont mal connus.

Afin de vérifier la pertinence de la classification morphologique dans le groupe *An. nili*, nous avons examiné les variations de séquences des régions ITS1 et ITS2 (*Internal non coding Transcribed Spacer 1* et 2) et du domaine D3 de l'ADN ribosomique de différentes espèces ou formes de ce groupe. L'analyse a concerné *An. nili* s.s., *An. carnevalei*, *An. somalicus* et la «forme *Oveng*» capturés au Cameroun, de même que des spécimens du Burkina Faso, de Côte d'Ivoire et du Sénégal.

L'analyse de séquences de ces régions ITS1, ITS2 et domaine D3 de rDNA des espèces et formes a révélé quatre groupes de génotypes, qui correspondent bien aux 3 espèces et à la «forme *Oveng*». La comparaison des séquences de groupe à groupe, d'ITS2 par exemple, a permis d'obtenir des distances génétiques (d) variant de 0.14

à 0.20. Ces valeurs de distances sont supérieures à celles qu'on observe généralement entre populations ou individus de la même espèce, et sont de niveau inter-spécifique, similaires à ce qu'on observe entre espèces du groupe *An. funestus* (26, 37) ou du complexe *An. quadrimaculatus* (37). En ce basant sur la variation de séquence d'ITS2 des espèces du groupe *An. nili*, une méthode d'amplification par PCR allèle spécifique a été développée (39).

La PCR multiplexe développée, en permettant l'identification à tous les stades, y compris de spécimens mal conservés, facilite l'étude de la répartition, de la biologie et du rôle vecteur des 4 espèces connues du complexe *An. nili*, à travers l'Afrique.

Nous disposons pour le moment de très peu d'information sur *An. somalicus*, qui semble exophile et zoophile, et ne joue donc probablement aucun rôle dans la transmission des Plasmodium. Ce n'est pas le cas d'*An. nili*, d'*An. carnevalei* et de la «forme *Oveng*», qui sont tous 3 vecteurs. En effet, des taux d'infestation des glandes salivaires dépassant 3 % ont pu être observés chez *An. nili*, et des taux entomologiques d'inoculation de plus de 100 piqûres infectantes par homme par an ont été signalés. Une étude conduite en 2002 dans un village du Sénégal oriental a montré que 56 piqûres infectantes par homme par an pouvaient être dues à cette espèce, que l'on avait négligé jusqu'à présent dans ce pays (40). De même *An. carnevalei* est peu connu. Des individus infectés par *P. falciparum*, ont été capturés sur homme, démontrant ainsi son rôle vecteur et son caractère, au moins en partie, anthropophile. Ce moustique a été signalé au Cameroun et en Côte d'Ivoire, mais sa répartition doit être beaucoup plus large.

En ce qui concerne la «forme *Oveng*», les résultats morphologiques, biologiques et génétiques permettent de conclure sans ambiguïté que nous sommes en présence d'une nouvelle espèce à part entière (Awono-Ambene *et Coll*, non publié). Cette nouvelle espèce, dont la biologie est encore peu connue, sera dénommée *An. ovengensis*, du nom du village *Oveng* situé dans la forêt de Campo au Sud Cameroun. Des femelles ont été capturées piquant l'homme pendant la nuit. Le taux d'agressivité variaient entre 50 et 300 piqûres par homme par nuit, le long des rivières où étaient situés les gîtes. Cette espèce a été très rarement capturée au repos à l'intérieur des maison suggérant un comportement plutôt exophile. Des taux d'infestation plasmoidale moyens de 0,4 à 1,9 % ont été observés dans le Sud Cameroun.

LE COMPLEXE *ANOPHELES MOUCHETI*

An. moucheti s.l. est un vecteur important du paludisme dans les localités situées le long des cours d'eau en Afrique équatoriale (9). Les études effectuées dans le groupe *An. moucheti* ont permis d'identifier 3 formes morphologiques : *An. moucheti moucheti* (la forme typique), *An. moucheti nigériensis* et *An. moucheti bervoetsi* décrit pour la première fois en République Démocratique du Congo (RDC). Lors de sa mise au point sur le groupe *An. moucheti*

au Cameroun, Brunhes *et Coll* ont considéré, sur la base des critères morphologiques, qu'*An. m. nigériensis* était synonyme d'*An. m. moucheti* et qu'*An. m. bervoetsi* était une sous espèce d'*An. m. moucheti* (41). Plus récemment, des études isoenzymatiques et des suivis de descendance ont montré que différentes populations géographiques du Cameroun, regroupant les 3 formes morphologiques, appartenaient à une unique espèce (42).

Malgré ces données, le statut taxonomique et le rôle vectoriel d'*An. moucheti* au niveau africain restaient flous. Pour y voir plus clair, nous avons analysé et comparé les séquences de plusieurs régions d'ADN notamment les fragments ITS1, ITS2 et D3 de l'ADN ribosomique, et cytochrome b mitochondrial de spécimens d'*An. moucheti* capturés au Cameroun, en RDC et en Ouganda. Les spécimens d'*An. moucheti* du Cameroun ont montré un faible niveau de variation nucléotidique, sans corrélation avec les formes morphologiques, confirmant la probable homogénéité d'*An. moucheti* dans ce pays.

De même, la diversité génétique entre les spécimens d'*An. moucheti* d'Ouganda et du Cameroun, pourtant géographiquement éloignés, est très faible ($d=0.001$) et suggère que les populations de ces deux pays appartiennent au même taxon. En revanche, les séquences des spécimens d'*An. m. bervoetsi* de RDC sont très différentes de ceux du Cameroun ou d'Ouganda, les distances génétiques entre spécimens du Cameroun et de RDC atteignant jusqu'à 0.15 pour la séquence ITS1. Ces valeurs sont largement supérieures aux valeurs de divergence intra-espèces que l'on trouve dans la littérature. Des résultats préliminaires utilisant les marqueurs microsatellites (43) montrent également des différences importantes entre les populations du Cameroun et de RDC. Il apparaît donc, qu'à l'échelle africaine, on soit en présence d'au moins deux taxons. Dans le but d'étudier la répartition géographique des membres du groupe, et leur rôle dans la transmission palustre, une PCR allèle spécifique du groupe *An. moucheti* a été développée pour distinguer *An. moucheti* d'*An. m. bervoetsi*.

ANOPHELES MASCARENSIS

Anopheles mascarensis, est un moustique endémique de Madagascar et de l'Archipel des Comores (Anjouan et Mohéli). Il a été reconnu comme vecteur de Plasmodium en 1990, à partir d'échantillonnage de l'Ile Sainte Marie, sur la côte Est de Madagascar. Depuis, il a été retrouvé porteur de *P. falciparum* dans plusieurs régions du Sud et de l'Est de la grande île (44, 45).

Malgré de nombreuses recherches, cette espèce n'a en revanche jamais été trouvée infectée sur les hautes terres, où elle apparaît essentiellement zoophile et exophile. La question s'est donc naturellement posée de savoir si les populations côtières, de régions plus chaudes, et les populations des hautes terres appartenaient à la même espèce. Deux hypothèses ont été confrontées, la première étant la présence de deux espèces différentes, dont une non vectrice

sur les hautes terres, la seconde hypothèse attribuant ces différences d'infectivité essentiellement à des capacités vectorielles différentes de populations colonisant des milieux écologiquement et climatiquement très différents.

La comparaison morphométrique entre des spécimens de la côte et des hautes terres n'a pas permis de mettre en évidence de différence. Plusieurs analyses génétiques ont été entreprises portant sur des comparaisons de séquences des fragments ITS et D3 du rDNA, et du gène de la cytochrome oxydase II sur le DNA mitochondrial. Seul ce dernier marqueur est polymorphe, les deux précédents étant strictement identiques dans les différentes populations testées. Ces analyses ont été complétées par une étude basée sur 6 amorces RAPD, déterminant 19 marqueurs.

Tous les résultats concordent et n'apportent aucun argument en faveur de la présence de plusieurs unités taxonomiques chez *An. mascarensis* à Madagascar. Les différences de comportement et de taux d'infestations observés entre populations géographiques seraient essentiellement dus à des environnements différents. Il convient donc d'en tenir compte dans les stratégies de lutte anti-vectorielle à Madagascar.

CONCLUSION

La diversité des écosystèmes africains, et les changements qu'ils connaissent sous l'effet des activités humaines, font que les systèmes vectoriels palustres sont très variés, et en perpétuelle évolution. La systématique des vecteurs de Plasmodium reflète bien cette diversité et, alors que l'on croyait bien connaître les vecteurs majeurs, on s'aperçoit, par des observations de terrain approfondies, renforcées par des études de génétique et de biologie moléculaire, que la situation est plus complexe que prévue. De vraies espèces cryptiques existent parmi les complexes *An. gambiae*, *An. nili* et *An. moucheti*. Chez *An. gambiae* s.s. des populations sont structurées, montrant des phénomènes de spéciation en cours. D'autres observations sont pour le moment plus difficiles à interpréter, reflétant probablement des adaptations locales de populations à divers environnements sans que des barrières génétiques aient encore pu se mettre en place, comme chez *An. funestus*. Enfin d'autres espèces, telle que *An. mascarensis*, paraissent homogènes. La connaissance des espèces et des populations est nécessaire si on veut rendre la lutte anti-vectorielle la plus efficace possible. Par ailleurs la compréhension de la génétique des populations, de la systématique et de la phylogénie des espèces vectrices, pourra permettre de retracer l'histoire naturelle et l'évolution des systèmes vectoriels palustres en Afrique ■

Remerciements • Nous tenons à remercier Louis Mukwaya, Vincent Robert, Zeinab Annan, Thierry Baldet, Fabrice Chandre, pour leur participation à ce travail, sur le terrain ou au laboratoire. P.H. Awono-Ambene, C. Antonio-Nkondjio et C. Wondji ont bénéficié de financements OMS-TDR. L'essentiel des résultats présentés a été obtenu grâce à un financement PAL+ du Ministère Français de la Recherche.

REFERENCES

- 1 - MACDONALD G - The epidemiology and control of malaria. Oxf. Univ Press ed, Londres, 1957, 201 p.
- 2 - PATERSON HE - Direct evidence for the specific distinctness of form A, B and C of the *Anopheles gambiae* complex. *Cahiers ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie* 1965; **3-4** : 179-180.
- 3 - DAVIDSON G - The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex. *Rivista di Malariologia* 1964; **13** : 167-183.
- 4 - DELLA TORRE A, FANELLO C, AKOGBETO M *et Coll* - Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 2001; **10** : 9-18.
- 5 - DA CUNHA RAMOS H, BRUNHES J - Insecta Diptera Culicidae Uranotaenia, Collection Faune de Madagascar, volume 91, IRD Éditions - CIRAD - Publications scientifiques du MNHN, 2003.
- 6 - MAYR E - Systematics and the origin of species. University press ed, Columbia, 1942.
- 7 - HUNT RH, COETZEE M, FETTENE M - The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; **92** : 231-235.
- 8 - COETZEE M, CRAIG M, LE SUEUR D - Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* 2000; **16** : 74-77.
- 9 - GILLIES MT, DE MEILLON B - The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). The South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 2nd Ed., 1968, 343pp.
- 10 - GILLIES MT, COETZEE M - A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 1987, 143 pp.
- 11 - 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 Actualites* 2002; 81-99.
- 12 - WHITE GB - *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974; **68** : 278-301.
- 13 - 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** : 483-497.
- 14 - 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** : 520-529.
- 15 - COLUZZI M, PETRARCA V, DI DECO MA - Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* 1985; **52** : 45-63.
- 16 - TOURE YT, PETRARCA V, TRAORE SF *et Coll* - The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 1998; **40** : 477-511.
- 17 - FAVIA G, TORRE AD, BAGAYOKO M *et Coll* - Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 1997; **6** : 377-383.
- 18 - FAVIA G, LANFRANCOTTI A, SPANOS L *et Coll* - Molecular characterization of ribosomal DNA (rDNA) polymorphisms discriminating chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 2001; **10** : 19-23.
- 19 - CHANDRE F, MANGUIN S, BRENGUES C *et Coll* - 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** : 319-322.
- 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** : 11-19.
- 21 - HOLT RA *et Coll* - The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; **298** : 129-149.
- 22 - WILKES TJ, MATOLA YG, CHARLWOOD JD - *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol* 1996; **10** : 108-110.
- 23 - DE MEILLON B, VAN EEDEN GJ, COETZEE L *et Coll* - 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** : 657-661.
- 24 - KOEKEMOER LL, COETZEE M, HUNT RH - HpaII endonuclease distinguishes between two species in the *Anopheles funestus* group. *Insect Mol Biol* 1998; **7** : 273-277.
- 25 - KOEKEMOER LL, LOCHOUARN L, HUNT RH, COETZEE M - Single-strand conformation polymorphism analysis for identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *J Med Entomol* 1999; **36** : 125-130.
- 26 - 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** : 804-811.
- 27 - COHUET A, SIMARD F, TOTO JC *et Coll* - Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon, and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg* 2003 (in press).
- 28 - LOCHOUARN L, DIA I, BOCCOLLINI D *et Coll* - Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; **92** : 607-612.
- 29 - BOCCOLINI D, SABATINI A, SANOGO E *et Coll* - Chromosomal and vectorial heterogeneities in *Anopheles funestus* from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* 1994; **36 Suppl 1** : 20.
- 30 - 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.
- 31 - DIA L, LOCHOUARN L, BOCCOLINI D *et Coll* - Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* 2000; **7** : 179-184.
- 32 - COSTANTINI C, SAGNON N, ILBOUDO-SANOGO E *et Coll* - Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* 1999; **41** : 595-611.
- 33 - 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.
- 34 - HAMON J, MOUCHET J - Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. *Med Trop* 1961; **21** : 643-660.
- 35 - CARNEVALE P, LE GOFF G, TOTO JC, ROBERT V - *Anopheles nili* as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon. *Med Vet Entomol* 1992; **6** : 135-138.
- 36 - BRUNHES J, LE GOFF G, GEOFFROY B - Afrotropical anopheline mosquitoes. III. Description of 3 new species: *Anopheles carnevalei* sp. n., *An. hervyi* sp. n. and *An. dualaensis* sp.n. and resurrection of *An. rageaui* Mattingly and Adam. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; **15** : 552-558.
- 37 - HACKETT BJ, GIMNIG J, GUELBEOGO W *et Coll* - Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol* 2000; **9** : 369-374.
- 38 - CORNEL AJ, COLLINS FH - PCR of the ribosomal DNA intergenic spacer regions as a method for identifying mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. In «Species diagnostics protocols PCR and other nucleic acid methods. Methods in molecular Biology». Vol 50. CLAPP JP, éditeur. Humana press ed, NJ Totowa, 1996, pp 321-332.

- 39 - KENGNE P, AWONO-AMBENE P, ANTONIO-NKONDJIO C *et Coll* - Molecular identification of members of the *Anopheles nili* group, African malaria vectors. *Med Vet Entomol* 2003; **17** : 167-174.
- 40 - DIA I, DIOP T, RAKOTOARIVONY I *et Coll* - Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera : Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol* 2003; **40** : (sous presse).
- 41 - BRUNHES J, LE GOFF G, MANGA L, GEOFFROY B - Anophèles afro-tropicaux. IV - Mise au point sur les espèces et sous-espèces du groupe *Anopheles (Cellia) mouchei*; réhabilitation d'*An. (C.) multinctus* et d'*An. (Cellia) garnhami basilewskyi*. *Annales de la Société entomologique de France* 1998; **34** : 397-405.
- 42 - ANTONIO-NKONDJIO C, SIMARD F, COHUET A, FONTENILLE D - Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles mouchei*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric South Cameroon populations. *Infection, genetics and evolution* 2002; **45** : 1-4.
- 43 - ANNAN Z, KENGNE P, BERTHOMIEU A *et Coll* - Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the mosquito *Anopheles mouchei*, malaria vector in Africa. *Molecular Ecology Notes* 2003; **3** : 56-58.
- 44 - FONTENILLE D, CAMPBELL GH - Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar ? *Am J Trop Med Hyg* 1992; **46** : 28-30.
- 45 - MARRAMA L, LAVENTURE S, RABARISON P, ROUX J - *Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947) : vecteur principal du paludisme dans la région de Fort dauphin (Sud-Est de Madagascar). *Bull Soc Pathol Exot* 1999; **92** : 136-138.
-