

Interactions génétiques entre populations vectrices parasitaires et humaines: l'exemple du paludisme à *Plasmodium falciparum*

Génétique des populations anophéliennes.

S. Manguin (1), D. Fontenille (2), F. Chandre (3), L. Lochouarn (4), J. Mouchet (5), P. Kengne (1) & P. Guillet (6)

(1) IIRN - IRD (ex-ORSTOM), Ave Agropolis, BP 5045, Montpellier 34032, France.

(2) OCEAC, Yaoundé, Cameroun.

(3) IRD, Institut P. Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire.

(4) IRD, Institut Pasteur, Dakar, Sénégal.

(5) IRD, 213 rue La Fayette, 75480 Paris, France.

(6) OMS, Genève, Suisse.

Journée SPE du 13 octobre 1999 à l'Institut Pasteur à Paris : "Génétique et maladies infectieuses dans l'environnement tropical".

Summary: Anopheline Population Genetics.

Population genetic studies of vectors are essential for (i) the determination of their taxonomic status and consequently the definition of their vectorial role in the transmission of pathogenic agents; (ii) the evaluation of the species genetic variability and the estimation of their capacities of adaptation to selection pressure; (iii) an estimation of gene flow among populations in order to evaluate their degree of isolation and gene circulation, especially resistance genes. Among the malaria vectors taken as examples on three continents, Africa, South-East Asia and Latin America, the large majority of the species showed an important polymorphism.

The Gambiae Complex, which is by far the most studied one, includes at present 7 species with the recent description of *An. quadriannulatus A and B* from Ethiopia. *An. gambiae s.s.* includes itself 5 chromosomal forms. One of them, the Mopti form, should be considered as a species unto itself. For *An. arabiensis*, a strong differentiation has been observed among the populations from Senegal and the Indian Ocean Islands. The *kdr* mutation, which confers resistance to pyrethroid knockdown effect, has never been found either in the Mopti form, or *An. arabiensis*, indicating a restricted gene flow between these latter two and *An. gambiae s.s.* The speciation process of the Gambiae Complex seems to be a recent phenomenon due to environmental selection pressure. Species of the *Funestus* Group are distinguishable by morphological characters. The genetic study of *An. funestus s.s.* did not show the presence of a complex, in spite of high polymorphism and population structure.

Anophelines from eastern areas present an important biodiversity. The Minimus Complex includes two species, A and C, which are widely distributed in South-East Asia. Species A is strongly endophilic, on the contrary species C is at once more exophilic and zoophilic. The latter species might have been selected by DDT indoor house spraying. After numerous taxonomic investigations, the Dirus Complex includes now 7 species.

In Latin America, *An. pseudopunctipennis* clustered into three geographic populations which are under a speciation process. One covers North America and Guatemala, the other South America and Belize, whilst the last one is restricted to Grenada Island. On the contrary, *An. darlingi* showed little morphologic and genetic variability throughout the species geographic range suggesting the existence of a single species.

The main objective of these studies is to implement a more selective approach of vector control programs in relation to the incriminated species, their bioecology and their role in malaria transmission. The improvement of efficiency and selectivity of vector control is becoming a major goal in order to make the best out of the available tools and control the impact of interventions on the environment.

Résumé :

Les études de génétique des populations de vecteurs sont primordiales pour (i) la détermination de leur statut taxonomique et par voie de conséquence définir leur rôle dans la transmission d'un agent pathogène; (ii) l'évaluation de la variabilité génétique des espèces et l'estimation de leurs capacités d'adaptation aux pressions de sélection; (iii) l'estimation des flux géniques entre populations permettant d'appréhender leur degré d'isolement et la circulation des gènes, notamment de résistance. Parmi les vecteurs du paludisme pris en exemple sur trois continents, Afrique, Asie du Sud-est et Amérique latine, une large majorité des espèces présente un important polymorphisme.

Le complexe *Anopheles gambiae* qui est de loin le plus étudié, inclut maintenant 7 espèces avec la description récente d'*An. quadriannulatus A et B* en Ethiopie. *An. gambiae s.s.* comprend lui-même 5 formes chromosomiques. L'une d'entre elles, la forme Mopti, devrait être considérée comme une espèce à part entière. Chez *An. arabiensis*, une forte différenciation s'observe entre les populations du Sénégal et celle des îles de l'Océan Indien. La mutation *kdr*, conférant une résistance à l'effet

Key-words: Anopheles -
Malaria vector -
Species complex -
Population genetics -
Africa -
South-East Asia -
Latin America

Mots-clés : Anopheles -
Vecteur du paludisme -
Complexe d'espèces -
Génétique des populations -
Afrique -
Asie du Sud-est -
Amérique latine

knockdown des pyréthrinoides, n'a pas été trouvée chez la forme *Mopti*, ni chez *An. arabiensis*, indiquant un flux génique très restreint entre ces dernières et *An. gambiae* s.s. Le processus de spéciation du complexe *An. gambiae* semble être un phénomène récent d'adaptation aux pressions de sélection exercées par l'environnement. Les espèces du groupe *An. funestus* sont identifiables sur des caractères morphologiques. L'étude génétique d'*An. funestus* s.s. n'a pas permis de déterminer s'il s'agit d'un complexe, malgré un polymorphisme important et une forte structuration des populations.

Les anophèles de la région orientale présentent une biodiversité considérable. Le complexe *An. minimus* comprend deux espèces largement réparties en Asie du Sud-est. L'espèce A s'est révélée très endophile, alors que C est à la fois plus exophile et zoophile. Cette dernière espèce semblerait avoir été sélectionnée par les traitements intradomiciliaires au DDT. Après de nombreux remaniements taxonomiques, le complexe *An. dirus* comprend 7 espèces.

En Amérique latine, les populations d'*An. pseudopunctipennis* se répartissent en 3 groupements géographiques en voie de spéciation. L'un est situé en Amérique du Nord et au Guatemala, un autre en Amérique du Sud et au Belize, et le troisième est confiné à l'île de Grenade. En contrepoint, *An. darlingi*, peu variable morphologiquement et génétiquement sur l'ensemble de son aire de répartition, représente une seule espèce.

L'objectif global de ces études est de mettre en œuvre une approche plus sélective des programmes de lutte antivectorielle, en fonction des espèces incriminées, de leur bio-écologie et de leur rôle dans la transmission. Améliorer l'efficacité et la sélectivité de la lutte antivectorielle est devenu un enjeu majeur afin de faire le meilleur usage possible des outils disponibles et de maîtriser l'impact des interventions sur l'environnement.

Introduction

Le paludisme reste la maladie parasitaire qui fait le plus de victimes dans le monde. Elle représente une des premières causes de morbidité et de mortalité et on lui attribue de 2 à 2,5 millions de morts par an, dont 80 % des cas surviennent en Afrique sud-saharienne. La lutte contre cette parasitose transmise par des moustiques du genre *Anopheles* repose essentiellement sur deux méthodes : l'une, préventive, par la mise en place d'opérations de lutte antivectorielle et de protection contre les vecteurs, et l'autre, curative, par le diagnostic précoce et l'administration de médicaments antipaludiques. La lutte contre les vecteurs implique en premier l'identification précise du statut taxonomique des populations d'anophèles, puis leur distribution géographique et, enfin, leur rôle vectoriel. De nombreux vecteurs appartiennent à des complexes d'espèces dont les différentes formes ou populations présentent une importance épidémiologique très variable. Leur rôle dans la transmission du paludisme est objectivé par leur compétence vectorielle (réceptivité de l'anophèle aux plasmodies humaines) sous contrôle génétique. Sur elle, se greffe leur capacité vectorielle qui prend en compte les paramètres biologiques et écologiques de la population anophélienne, tels que le taux d'anthropophilie, la longévité et le taux d'agressivité.

Depuis les travaux sur le complexe *An. maculipennis*, le premier étudié (23), de nombreux autres complexes d'espèces d'anophèles ont été dénombrés (41, 59). Leur étude a révélé la complexité du statut taxonomique de certains vecteurs qui appartiennent à un groupe composé de sous-groupes pouvant eux-mêmes renfermer un ou des complexes d'espèces ; tel est le cas des groupes *An. funestus*, *An. leucosphyrus*, *An. minimus* qui seront abordés plus loin. En plus d'une meilleure connaissance taxonomique, les études de génétique des populations de vecteurs permettent de déterminer leur niveau de polymorphisme qui reflète leurs capacités d'adaptation aux pressions de sélection environnementales. Elles permettent aussi de séparer les formes à fort potentiel de transmission de celles qui sont moins impliquées d'un point de vue épidémiologique, d'étudier les échanges géniques entre espèces, formes, populations et d'évaluer ainsi leur degré d'isolement génétique. La répartition très sélective des gènes de résistance

aux insecticides entre les différentes espèces du complexe *An. gambiae* s'est révélée, par exemple, être un bon indicateur de leur niveau d'isolement génétique. Dans le même temps, ces études génétiques permettent par exemple d'appréhender l'impact potentiel de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide sur la composition spécifique des populations de vecteurs. Dans l'éventualité encore lointaine d'utilisation de moustiques transgéniques inaptes à transmettre les plasmodies, il est essentiel d'étudier dès à présent la structuration génétique et les flux de gènes existant entre les populations ciblées pour la lutte.

Pour étayer nos propos sur l'intérêt de la génétique des populations d'anophèles et les nouvelles approches que les outils moléculaires actuels permettent d'envisager, quelques exemples de vecteurs du paludisme provenant de trois continents - Afrique, Asie du Sud-est et Amérique latine - sont exposés ci-après.

Vecteurs du paludisme en Afrique

Nos travaux concernent essentiellement trois vecteurs majeurs du paludisme en Afrique dont *Anopheles funestus* et deux espèces du complexe *An. gambiae*, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*. Les nombreuses études effectuées sur ce complexe d'espèces ont permis de faire des avancées considérables.

Études génétiques sur le complexe *An. gambiae*

Le complexe *An. gambiae* est sans aucun doute le plus étudié au monde, grâce entre autres aux travaux pionniers de DAVIDSON (14), HUNT (26), WHITE (58) et COLUZZI *et al.* (12), et ceci pour deux raisons principales : ce complexe d'espèces comprend les deux vecteurs majeurs du paludisme en Afrique, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*; et plus de 80 % des cas de paludisme dans le monde surviennent en Afrique tropicale qui n'héberge pourtant que 8 % de la population du globe. Ce complexe est composé d'au moins six espèces qui sont *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus* (A), *An. melas*, *An. merus* et *An. bwambae*. Récemment, HUNT *et al.* (27) ont décrit une septième espèce, *An. quadriannulatus* B, en Ethiopie. De plus, l'espèce *An. gambiae* s.s. se subdivise

elle-même en cinq formes géographiques distinctes : Forêt, Bissau, Bamako, Savane et Mopti, identifiées sur la base d'inversions au niveau des chromosomes paracentriques (6). La répartition de ces formes dépend essentiellement des conditions environnementales, telles que le climat et la nature des gîtes larvaires (54, 55). Ces six espèces sont aussi différenciables par PCR-rDNA (25, 48), de même que certains cytotypes dont Mopti et Savane-Bamako identifiables par PCR-RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism) (16). Des études sur le polymorphisme isoenzymatique des espèces du complexe *An. gambiae* ont montré qu'au Burkina Faso, où plusieurs cytotypes sont en sympatrie, et au Burundi, où *An. arabiensis* est prédominant à plus de 97 %, la structuration des populations d'une même espèce est telle qu'elle permet de différencier les populations endophages des exophages dans un même village (13, 51).

Des marqueurs microsatellites, préalablement utilisés pour cartographier le génome des espèces du complexe *An. gambiae* (66), ont fourni un outil remarquable pour l'étude de la structuration génétique des populations (30, 31). Ces marqueurs ont montré que, dans une même région, des différences importantes dans la structure des populations peuvent être observées entre plusieurs cytotypes, surtout si les marqueurs microsatellites utilisés sont localisés sur le chromosome 2 sur lequel se trouvent la plupart des inversions discriminantes (30). En revanche, pour un même cytotype, les flux géniques à une large échelle géographique sont importants (31).

An. arabiensis, une autre espèce du complexe et aussi excellent vecteur, a indirectement bénéficié de ces recherches puisque la majorité des séquences microsatellites identifiées sur *An. gambiae* s.s. sont également présentes chez *An. arabiensis* (50). Nos résultats ont montré une différenciation génétique forte entre des populations d'*An. arabiensis* du Sénégal et celles des îles de l'Océan Indien (50), alors qu'à une échelle géographique plus petite (quelques centaines de kilomètres), les populations apparaissent peu structurées, démontrant ainsi la présence de flux géniques importants.

Marqueurs moléculaires de résistance aux pyréthrinoides

La résistance d'*An. gambiae* aux pyréthrinoides résulte, entre autres, de la mutation de la cible de l'insecticide qui est le canal sodium. Celle-ci confère une résistance à l'effet knock-down (*kdr*) par une augmentation de l'insensibilité nerveuse d'*An. gambiae* aux pyréthrinoides (39). Cette mutation d'un seul nucléotide (TTA en TTT), correspondant au changement de la leucine en phénylalanine, est mise en évidence par une technique PCR de type PASA (Polymorphism of Allele Specific Amplification) qui permet de révéler le génotype des moustiques homozygotes résistants (RR), sensibles (SS), ou hétérozygotes (RS). Cette possibilité de travailler au niveau de l'individu a considérablement élargi les champs d'investigation en matière de résistance aux insecticides, limités auparavant aux essais biologiques et à quelques tests complémentaires utilisables seulement par quelques spécialistes.

Cette PCR diagnostique nous permet d'étudier la répartition et la prévalence de la mutation *kdr* dans les populations naturelles d'*An. gambiae* s.s. en Afrique et d'effectuer un suivi longitudinal de la résistance aux pyréthrinoides dans les populations cibles (7, 8).

Nos résultats ont montré que cette mutation *kdr* est déjà bien implantée dans les populations naturelles d'*An. gambiae* s.s. en Afrique de l'Ouest puisqu'on la retrouve en Côte d'Ivoire,

au Burkina Faso, au Bénin et au Sénégal avec des fréquences qui peuvent dépasser 80 %, même dans des zones où aucun programme de lutte antivectorielle n'a été pratiqué. De nombreux exemples, notamment chez les anophèles, ont démontré sans ambiguïté que la résistance aux insecticides a été sélectionnée avant tout par l'utilisation massive des insecticides en agriculture, notamment le DDT dans les années 60, puis les pyréthrinoides (7, 32, 40).

La mutation *kdr* que nous n'avions jusqu'à présent trouvée qu'en Afrique de l'Ouest vient tout récemment d'être détectée par notre équipe dans une population d'*An. gambiae* s.s. de Bangui, en République Centrafricaine. Ce résultat montre l'intérêt de déterminer si la mutation *kdr* provient d'un événement moléculaire unique qui se serait étendu aux pays voisins, ou si plusieurs mutations seraient survenues indépendamment. Dans ce cas, le risque serait de voir s'installer la multiplication des foyers de résistance partout où la pression de sélection s'intensifiera, notamment par la mise en place à grande échelle de moustiquaires imprégnées. Une illustration en a été donnée par RAYMOND et PASTEUR (46) qui ont démontré que la résistance aux insecticides chez le moustique *Culex pipiens*, induite par une estérase et observée dans le monde entier, provenait en fait d'une seule et même mutation, qui s'est progressivement répandue grâce à la remarquable capacité de déplacement actif et passif (par avion, bateau, véhicule routier...) de ce moustique.

L'étude de la répartition de la résistance *kd* par PCR dans les populations naturelles d'*An. gambiae* nous a aussi permis d'évaluer indirectement le coût génétique (fitness cost) de la résistance en l'absence de traitements insecticides et les perspectives d'évolution de la résistance en fonction des pressions insecticides d'origine agricole et/ou domestique.

L'utilisation de ce marqueur moléculaire sélectionné, basé sur la résistance aux insecticides, nous a également permis d'étudier certains membres du complexe *An.gambiae*. En effet, jusqu'ici la mutation *kdr* n'a été trouvée que chez *An. gambiae* s.s. forme Savane. On ne l'a encore jamais identifiée ni chez la forme Mopti, ni chez *An. arabiensis*, pourtant couramment trouvées toutes deux en sympatrie avec la forme Savane (9). Ce résultat confirme l'isolement génétique existant non seulement entre les espèces *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*, mais également entre les formes géographiques d'une même espèce. En effet, dès 1985, COLUZZI *et al.* avaient montré par des études cytogénétiques que les formes Mopti et Bamako ne présentaient pas d'hybrides. Il en est de même pour Mopti et Savane dont l'absence de flux génique entre les populations a été confirmée par les techniques de PCR (9, 16). Ainsi, la forme Mopti, encore rattachée à *An. gambiae* s.s., devrait être considérée comme une espèce à part entière. Bien qu'elle soit parfaitement interféconde au laboratoire avec les autres formes, la présence d'une barrière pré-copulatoire dans les populations naturelles est fortement suspectée. Ce processus de spéciation entre les formes d'*An. gambiae* s.s. semble relativement récent et serait survenu à la suite de la régression des zones de forêt et du développement de l'agriculture (11).

Caractérisation génétique d'*An. funestus*

Contrairement à *An. gambiae* s.l., les espèces du groupe *An. funestus* sont beaucoup moins connues. On sait depuis les années 1930 que ce groupe englobe plusieurs espèces proches ne pouvant être différenciées que par de discrets caractères morphologiques chez les larves ou les adultes. Dans la révision récente du genre *Anopheles* (24), le groupe *An. funestus* est composé de quatre espèces et d'un sous-groupe comprenant

lui-même quatre espèces, qui sont respectivement *An. brucei*, *An. confusus*, *An. fuscivenosus* et *An. rivulorum*, déterminables au stade larvaire ; et *An. aruni*, *An. funestus*, *An. parensis* et *An. vaneedeni* identifiables par de légères différences morphologiques au stade imaginal (17).

L'identification précise de l'espèce dans le groupe est d'une très grande importance pour la lutte antivectorielle. En effet, à l'exception d'*An. funestus* qui est un excellent vecteur, les autres espèces semblent essentiellement zoophiles et ne sont que peu ou pas impliquées dans la transmission des *Plasmodium* à l'homme. Ainsi, en Tanzanie et en Afrique du Sud, alors que des traitements par pulvérisations intra-domiciliaires avaient éliminé *An. funestus*, quelques individus persistaient. Selon la région, il s'est avéré, par une étude minutieuse des individus présents après traitement, qu'il s'agissait d'*An. parensis*, *An. rivulorum* ou *An. vaneedeni*, espèces peu ou pas vectrices (15, 60). En Afrique australe, KOEKEMOER *et al.* (28, 29) ont pu différencier *An. funestus* et *An. vaneedeni* par PCR-RFLP, et *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. rivulorum* et *An. lesoni* par PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism).

À l'intérieur même de l'espèce *An. funestus*, il est important de savoir si toutes les populations ont les mêmes compétences et capacités vectorielles. *Anopheles funestus* lui-même est très polymorphe, biologiquement et génétiquement. Des études de cytogénétique réalisées essentiellement au Burkina Faso et au Sénégal, et dans une moindre mesure au Mali, à Madagascar et en Afrique du Sud, ont montré l'extrême hétérogénéité de cette espèce, sans que l'on puisse encore dire de façon formelle s'il s'agit d'un complexe (3, 4, 5, 33). L'analyse des inversions chromosomiques a montré l'existence de trois populations au Sénégal, préalablement différenciées sur la base de leur degré d'anthropophilie (33). Par contre, le comportement endophile et anthropophile d'*An. funestus* de Madagascar et du continent africain s'est révélé identique, alors que ses habitats larvaires sont très différenciés. À Madagascar, ils sont constitués à plus de 90 % de rizières (38), alors que, sur le continent africain, on ne trouve pratiquement jamais cette espèce dans ce type d'habitat. Ces données confortent l'hypothèse qu'*An. funestus* pourrait bien être un complexe d'espèces.

Vecteurs du paludisme en Asie du Sud-est

La région orientale présente une biodiversité considérable en ce qui concerne les Anophèles. Au cours des 50 dernières années, la plupart des espèces étudiées morphologiquement, puis par des techniques cytogénétiques, biochimiques ou moléculaires se sont révélées comme autant de complexes d'espèces, tels que *An. barbirostris*, *An. culicifacies*, *An. dirus*, *An. fluvialis*, *An. leucosphyrus*, *An. maculatus*, *An. minimus* pour ne citer que les principaux. Ces complexes d'espèces comprennent les vecteurs majeurs du paludisme en Asie du Sud-est qui, du fait de leur écologie très différente, couvrent une large partie de cette région où le paludisme demeure un problème majeur de santé publique. Parmi les vecteurs les plus importants en Asie du Sud-est, nous avons retenu *An. minimus* et *An. dirus*.

Anopheles minimus

Anopheles minimus a longtemps été considéré comme le vecteur majeur du paludisme dans les collines boisées d'Asie du Sud-est où ses larves vivent dans les eaux courantes et ombrées

du Népal à Taïwan et du sud de la Chine au sud de la Thaïlande.

Ce vecteur fait partie du groupe *An. minimus* qui comprend 10 espèces (24) dont *An. aconitus*, *An. filipinae*, *An. flavirostris*, *An. fluvialis*, *An. lesoni*, *An. mangyanus*, *An. minimus* A et C, *An. pampanai* et *An. varuna*. Ces espèces sont difficiles à séparer au stade imaginal.

Il est important de mentionner que les groupes *An. minimus* (région orientale) et *An. funestus* (région afrotropicale) contiennent des espèces morphologiquement très proches qui ne sont différenciables que sur la base de leur séparation géographique. *Anopheles lesoni* en est un exemple type. Une analyse cladistique des réarrangements chromosomiques au sein du groupe *An. funestus* (19, 45) a montré que cette espèce devrait dorénavant être classée dans le groupe *An. minimus* (24) malgré sa répartition afrotropicale.

Au sein du groupe *An. minimus*, se trouve également le complexe *An. minimus* composé d'au moins deux espèces, A et C, identifiées en Chine du sud (64, 65), en Thaïlande (20, 53) et au Vietnam (56), ainsi qu'une "Forme B", décrite dans l'Ile de Hainan (65). Ces deux espèces, de même qu'*An. aconitus*, *An. varuna*, et *An. pampanai* peuvent être déterminées par électrophorèse de deux systèmes isoenzymatiques, *Mdh* et *Odh*, dont seul le dernier permet de séparer *An. minimus* A et C. Récemment, une technique par PCR d'analyse de l'ADN ribosomal de régions variables connues, "single strand conformational polymorphisms" (SSCPs), a été développée afin d'identifier quatre espèces du groupe *An. minimus*, qui sont *An. aconitus*, *An. varuna* et *An. minimus* A et C (49). Nos travaux, basés sur l'utilisation d'amorces courtes (10 bases) de type RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), confirment la présence d'*An. minimus* A et C au Vietnam, espèces qui peuvent être en sympatrie, et celle d'*An. minimus* A au Cambodge (KENGNE et MANGUIN, comm. pers.).

L'hétérogénéité observée dans le comportement alimentaire d'*An. minimus* (42, 43) en Thaïlande n'est pas totalement expliquée par la reconnaissance de ces deux espèces, A et C. Cependant, dans le nord du Vietnam (Province de Hoa Binh), *An. minimus* C a été trouvée plus exophage et zoophile que l'espèce A qui possède un comportement fortement endophile avec des densités cinq fois supérieures à l'intérieur des maisons (56). L'espèce C semblerait avoir été sélectionnée par les traitements intradomiciliaires au DDT. Plus surprenant encore, des populations d'*An. minimus* se sont adaptées à des eaux stagnantes au Vietnam (citerne) et au Myanmar (puits). Ces populations, d'abord suspectées de ne pas appartenir au complexe *An. minimus*, ce sont pourtant révélées être des populations d'*An. minimus* A par analyse isoenzymatique, rDNA-PCR (ITS2) et RAPD-PCR (KENGNE et MANGUIN, comm. pers.).

Anopheles dirus

Anopheles dirus est le vecteur majeur du paludisme dans les zones de forêts et de clairières au Bangladesh, au Cambodge, en Chine du Sud, dans l'est de l'Inde, au Myanmar, en Thaïlande et au Vietnam. Au Laos, sa présence est fortement suspectée mais non encore démontrée.

Anopheles dirus appartient au groupe *An. leucosphyrus*, qui englobe des vecteurs parmi les plus importants d'Asie du Sud-est. Ce groupe comprend, entre autres, les complexes *An. dirus* et *An. leucosphyrus* composés respectivement de sept et quatre espèces (24). Ces dernières comprennent *An. balabacensis*, *An. introlatus* et *An. leucosphyrus* A et B. Le complexe

An. dirus regroupe les sept espèces suivantes : *Anopheles dirus* s.s. (ou A), B, C, D, E, *An. nemophilous* (F) et *An. takasagoensis* (1, 2). Leur identification était à l'origine basée sur des caractères cytotaxonomiques distinctifs portant sur les chromosomes polyténes et mitotiques. En Thaïlande, quatre espèces du complexe (A, B, C et D) sont différenciables par analyse isoenzymatique (21), utilisation de sondes d'ADN (44) et RFLP (63). Récemment, une PCR allèle-spécifique a été développée (57) afin de détecter des différences fixes sur l'ITS2 de l'ADN ribosomal de chacune des espèces. Cette méthode permet la différenciation de cinq des sept espèces du complexe *An. dirus*, qui sont *An. dirus* s.s. (A), B, C, D, et *An. nemophilous* (F). La répartition et le degré d'implication de chaque espèce dans la transmission du paludisme sont encore mal connus, quelle que soit la région d'Asie du Sud-est considérée. Les espèces qui ont été à ce jour répertoriées en Thaïlande sont au nombre de cinq, *An. dirus* A, B, C, D et F, (1, 2); de deux en Chine du sud, *An. dirus* A sur l'île de Hainan et D dans la Province du Yunnan (61, 62). Au Vietnam (KENGNE et MANGUIN, comm. pers.) et sur la côte est de l'Inde (47), seuls *An. dirus* A et E respectivement ont été identifiés par PCR allèle-spécifique. Les espèces A et D sont d'efficaces vecteurs de plasmodies humaines, contrairement aux espèces B, C et *An. nemophilous* (F) qui est très exophile et zoophile. Par contre, le pouvoir vecteur de l'espèce E (sud-ouest de l'Inde) et celui d'*An. takasagoensis* (Taïwan) restent à étudier.

Vecteurs du paludisme en Amérique latine

Dans les régions néotropicales, le paludisme reste la maladie parasitaire la plus répandue. Jusque récemment, le statut taxonomique de deux des vecteurs majeurs, *An. pseudopunctipennis* et *An. darlingi*, était particulièrement confus et n'avait été étudié que sur une petite partie de leur aire de répartition. De ce fait, deux études portant sur la clarification de leur statut taxonomique ont été entreprises sur l'ensemble de leur répartition géographique afin de mieux appréhender leur implication dans la transmission du paludisme.

Anopheles pseudopunctipennis

Anopheles pseudopunctipennis est le vecteur majeur du paludisme dans les zones montagneuses néotropicales avec une distribution géographique étendue puisque cette espèce se rencontre du sud des États-Unis (40°N) au nord de l'Argentine (30°S). Elle est souvent la seule espèce vectrice à une altitude supérieure à 600 m et transmet le paludisme jusqu'à 2800 m en Bolivie (18, 22). La comparaison par analyse isoenzymatique de 42 populations d'*An. pseudopunctipennis* provenant de dix pays du continent américain représentatifs de la vaste distribution de l'espèce, nous a permis d'identifier trois groupements géographiques répartis de la façon suivante : l'un comprend les populations d'Amérique du Nord (États-Unis, Mexique) et du Guatemala; le deuxième, celles d'Amérique du sud (Argentine, Chili, Colombie, Equateur, Pérou) et du Belize; et le troisième, celles de l'île de Grenade (Caraïbes). Les deux premiers groupements de populations se rejoignent au niveau d'une zone dite de convergence située en Amérique Centrale, entre l'est du Guatemala et le sud du Belize. Toutefois, bien que des flux géniques aient été mis en évidence entre ces trois groupements, il semblerait qu'ils soient en voie de spéciation (36). La population de l'île de Grenade, géographiquement isolée, possède un taux de polymorphisme

très bas (12,1 %) comparativement aux populations du continent (39,4-78,8 %) (34). Cet isolement ne permet pas d'entretenir un flux génique suffisant avec celles du continent américain, aussi cette population devrait-elle être considérée comme étant une espèce distincte. Cette constatation vient d'être confirmée par les travaux de COETZEE *et al.* (10) qui, par les techniques classiques de cytogénétique, ont mis en évidence l'existence d'un complexe de trois espèces correspondant aux trois groupements de populations préalablement identifiés par MANGUIN *et al.* (36).

Anopheles darlingi : le contre exemple ou l'anticomplexe

L'exemple de cette espèce représente un des rares cas où les différences observées, tant d'un point de vue morphologique que biologique, ne sont pas corrélées avec un isolement génétique.

Anopheles darlingi est le vecteur le plus efficace de la région néotropicale. Il transmet le paludisme dans les zones humides de basse altitude (< 550 m). Sa distribution recouvre deux régions géographiques distinctes, l'une très vaste est située en Amérique du sud et s'étend de la Colombie au nord-est de l'Argentine, couvrant entre autres tout le bassin amazonien; l'autre plus réduite est localisée en Amérique centrale, soit du sud du Mexique, du Belize, du Guatemala, au Honduras et occasionnellement au Salvador. Cette espèce n'a jamais été récoltée entre ces deux régions du Nicaragua au Panama (35). La séparation géographique entre ces deux populations, les nombreuses variations morphologiques, comportementales et biologiques décrites dans la littérature ont fait suspecter l'existence d'un complexe d'espèces (52).

Nous avons comparé différentes populations d'*An. darlingi* collectées en Amérique Centrale (Belize) et en Amérique du Sud (Bolivie, Brésil, Colombie, Guyane française, Pérou, Venezuela) en utilisant quatre techniques : isoenzymes, RAPD-PCR, rDNA-PCR (séquence ITS2) et morphologie. Les résultats des quatre techniques ont parfaitement convergé, montrant que toutes les populations d'*An. darlingi*, même géographiquement éloignées (Belize et sud du Brésil), appartiennent à une seule et même espèce (37). La relative homogénéité morphologique et génétique des spécimens étudiés tend à démontrer que la population d'Amérique centrale serait en fait originaire d'Amérique du Sud. De plus, compte tenu de sa distribution limitée en Amérique centrale, son introduction semble être récente et cette espèce pourrait s'étendre au-delà de ses limites actuelles (37). L'anthropophilie et l'endophagie, comportements qui font de cette espèce le vecteur majeur en Amérique du Sud, peuvent faire craindre une éventuelle extension du paludisme en Amérique centrale.

Discussion et conclusions

La caractérisation précise des vecteurs du paludisme a toujours été une préoccupation majeure de l'entomologiste médical car la connaissance de leur statut taxonomique constitue un préalable indispensable à la connaissance de leurs rôles respectifs dans la transmission des maladies. Elle permet également, en identifiant la cible, d'améliorer l'efficacité des campagnes de lutte antivectorielle préventive. Les nouveaux outils aujourd'hui disponibles permettent d'améliorer l'identification des espèces et de faire progresser les connaissances dans l'écologie, la biologie et l'épidémiologie. L'utilisation d'outils moléculaires de plus en plus performants a donné un nouvel élan à l'étude des complexes d'anophèles, conduisant à la des-

cription de nouvelles espèces et à une réorganisation plus sûre des données phylogénétiques.

Même si le concept d'espèce est toujours défini comme la capacité des individus d'un même groupe à se reproduire, les techniques qui permettent leur identification ont fortement évolué. Les limitations de l'approche morphologique ont entraîné un besoin croissant de développer d'autres méthodes basées sur la génétique, ce qui a eu pour conséquence, en retour, de révolutionner l'approche du concept d'espèce.

Les outils de la génétique moléculaire ont ouvert, dans le domaine des complexes d'espèces, de formidables champs d'investigations entomologiques qui permettent désormais de préciser le rôle de chaque espèce dans la transmission et de caractériser les populations de vecteurs. Cette caractérisation a permis par exemple de mieux aborder l'étude des facteurs qui conditionnent l'évolution des populations et leur adaptation aux contraintes diverses (modifications de l'environnement, utilisation des insecticides ...).

L'objectif global est de mettre en œuvre une approche plus sélective des programmes de lutte antivectorielle, en fonction des espèces incriminées, de leur bio-écologie et de leur rôle dans la transmission. Améliorer l'efficacité et la sélectivité de la lutte antivectorielle est devenu un enjeu majeur afin de faire le meilleur usage possible des outils disponibles et de maîtriser l'impact des interventions sur l'environnement.

Il est d'autant plus important d'étudier et de différencier les espèces au sein des complexes que celles-ci possèdent des caractéristiques écologiques, comportementales et vectorielles distinctes. En revanche, les études qui tendent à séparer les populations sur la seule base des variations génétiques semblent déraisonnables. En effet, il faut se garder des séparations trop poussées au niveau des espèces et des formes qui ne prendraient pas en compte les différences observées dans l'écologie, le comportement des populations et leur rôle dans la transmission, quel que soit l'intérêt académique que ces découpages pourraient revêtir.

Remerciements

Les auteurs remercient le support de l'OMS pour l'étude des vecteurs africains; la Commission européenne (projet INCO-DC ERB351PL961213) pour l'étude des vecteurs d'Asie du Sud-est; et la National Aeronautics and Space Administration (projet NASA W-16306), l'Uniformed Services University of the Health Sciences (projets USUHS R087DO et R087EL), et tout particulièrement Dr Donald R ROBERTS (USUHS), pour l'étude des vecteurs d'Amérique latine.

Références bibliographiques

- BAIMAI V, HARBACH RE & KIJCHALAO U - Cytogenetic evidence of a fifth species within the taxon *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Am Mosq Control Assoc*, 1988, **4**, 333-338.
- BAIMAI V, POOPITTAYASATAPORN A & KIJCHALAO U - Cytological differences and chromosomal rearrangements in four members of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Genome*, 1988, **30**, 372-379.
- BOCCOLINI D, RAKOTOSON R, RALISOA O, SABATINI A, RANDRIANARISOA E & COLUZZI M - Polimorfismo cromosomico di *Anopheles funestus* in Madagascar. *Parassitologia*, 1992, **34**, 14-15.
- 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**, 20.
- BOCCOLINI D, SAGNON N & TOURÉ YT - Chromosomal polymorphism in *Anopheles funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia*, 1998, **40**, 14.
- BRYAN JH, DI DECO MA, PETRARCA V & BULLINI L - Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.str. in The Gambia, West Africa. *Genetica*, 1982, **59**, 167-176.
- CHANDRE F, DARRIET F, MANGA L, AKOGBETO M, FAYE O *et al.* - Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bull OMS*, 1999, **77**, 230-234.
- CHANDRE F, DARRIET F, MANGUIN S, BRENGUES C, CARNEVALE P & GUILLET P - Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc*, 1999, **15**, 53-59.
- CHANDRE F, MANGUIN S, BRENGUES C, DOSSOU YOVO J, DARRIET F *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**, (sous-presses).
- COETZEE M, ESTRADA-FRANCO JG, WUNDERLICH CA & HUNT RH - Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg*, 1999, **60**, 649-653.
- COLUZZI M, PETRARCA V & DI DECOMA - Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool*, 1985, **52**, 45-63.
- 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.
- COOSEMANS M, SMITS A & ROELANTSP - Intraspecific isozyme polymorphism of *Anopheles gambiae* in relation to environment, behavior, and malaria transmission in southwestern Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **58**, 70-74.
- DAVIDSON G - *Anopheles gambiae* complex. *Nature*, 1962, **19**, 907.
- DE MEILLON B, VAN EEDEN GJ, COETZEE L, COETZEE M, MEISWINKEL R *et al.* - Observation on a species of the *Anopheles funes* - *tus* subgroup Giles in Tanganyika. *Bull OMS*, 1977, **30**, 23-28.
- FAVIA G, DELLA TORRE A, BAGAYOKO M, LANFRANCOTTI A, SAGNON N *et al.* - Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol*, 1997, **6**, 377-383.
- GILLIES MT & COETZEE M - *A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara*. South African Inst. Med Research, Johannesburg, 1987, 143 pp.
- GORHAM JR, STOJANOVICH CJ & SCOTT H G - Illustrated key to the anopheline mosquitoes of western South America. *Mosq Syst*, 1973, **5**, 97-156.
- GREEN CA - Cladistic analysis of mosquito chromosome data (*Anopheles* (Cellia) Myzomyia). *J Heredity*, 1982, **73**, 2-11.
- GREEN CA, GASS RF, MUNSTERMANN LE & BAIMAI V - Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. *Med Vet Entomol*, 1990, **4**, 25-34.
- GREEN CA, MUNSTERMANN LE, TAN SG, PANYIM S & BAIMAI V - Populations genetic evidence for species A, B, C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs for their identification. *Med Vet Entomol*, 1992, **6**, 29-36.
- HACKETT LW - The malaria of the Andean region of South America. *Rev Inst SalubEnferm Trop*, 1945, **6**, 239-252.
- HACKETT LW & MISSIROLI A - The varieties of *Anopheles maculipennis* and their relation to the distribution of malaria in Europe. *Riv Malariol*, 1935, **14**, 45-109.
- HARBACH RE - Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull Entomol Research*, 1994, **84**, 331-342.
- HARBACH RE, TOWNSON H, MUKWAYA LG & ADENIRAN T - Use of rDNA-PCR to investigate the ecological distribution of *Anopheles bwambae* in relation to other members of the *Anopheles gambiae* complex of mosquitoes in Bwamba County, Uganda. *Med Vet Entomol*, 1997, **11**, 329-334.
- HUNT RH - A cytological technique for the study of the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 1973, **15**, 137-139.
- HUNT RH, COETZEE M & FETTENEM - The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, **92**, 231-235.
- KOEKEMOER LL, COETZEE M & HUNT RH - HpaII endonuclease distinguishes between two species in the *Anopheles funestus* group. *Insect Mol Biol*, 1998, **7**, 273-277.
- 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, (sous-presses).

30. LANZARO GC, TOURE YT, CARNAHAN J, ZHENG L, DOLO G *et al.*- Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in West Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**, 14260-14265.
31. LEHMANN T, HAWLEY WA, KAMAU L, FONTENILLE D, SIMARD F & COLLINSFH - Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, 1996, **77**, 192-200.
32. LINES JD - Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes? A look at evidence. *Parasitol Today*, 1988, **4**, 17-20.
33. LOCHOUARN L, DIA I, BOCCOLINI D, COLUZZI M & FONTENILLE D - Bionomical and cytogenetic of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, **92**, 607-612.
34. MANGUIN S, PEYTON EL, JAMES A C & ROBERTS DR - Apparent changes in the abundance and distribution of *Anopheles* species on Grenada Island. *J Am Mosq Control Assoc*, 1993, **9**, 403-407.
35. MANGUIN S, ROBERTS DR, ANDRE RG, REJMANKOVA E & HAKRE S - Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. *J Med Entomol*, 1996, **33**, 205-211.
36. MANGUIN S, ROBERTS DR, PEYTON EL, FERNANDEZ-SALAS I, BARRETO M *et al.*- Biochemical systematics and population genetics of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **53**, 362-377.
37. MANGUIN S, WILKERSON R, CONN JE, RUBIO-PALIS Y, DANOFF-BURG JA & ROBERTS DR - Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2 and morphologic markers. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, **60**, 364-376.
38. MARRAMA L, RAJAONARIVÉLO E, LAVENTURE S & RABARISON P - *Anopheles funestus* et la riziculture sur les Plateaux de Madagascar. *Cahiers Santé*, 1995, **5**, 358-361.
39. MARTINEZ-TORRES D, CHANDRE F, WILLIAMSON MS, DARRIET F, BERGE JB *et al.*- Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molec Biol*, 1998, **7**, 179-184.
40. MOUCHET J - Agriculture and vector resistance. *Insect Sci Appli*, 1988, **9**, 297-302.
41. MUNSTERMANN LE - Mosquito systematics: Current status, new trends, associated complications. *J Vector Ecol*, 1995, **20**, 129-138.
42. NUTSATHAPANA S, SAWASDIWONGPHORN P, CHITPRAROP U & CULLEN JR - The behaviour of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. *Bull Ent Res*, 1986, **76**, 303-312.
43. NUTSATHAPANA S, SAWASDIWONGPHORN P, CHITPRAROP P, CULLEN JR, GASS RF & GREEN CA - A mark-release-recapture demonstration of host-preference heterogeneity in *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) in a Thai village. *Bull Ent Res*, 1986, **76**, 313-320.
44. PANYIM S, YASOTHORNRIKUL S, TUNGPRADUBKUL S, BAIMAI V, ROSENBERG R *et al.*- Identification of isomorphic malaria vectors using a DNA probe. *Am J Trop Med Hyg*, 1988, **38**, 47-49.
45. PAPE T - Cladistic analyses of mosquito chromosome data in *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst*, 1992, **24**, 1-11.
46. RAYMOND M & PASTEUR N - Evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: The migration hypothesis of amplified esterase genes. In: Brown TM (Eds), *Molecular genetics and evolution of pesticide resistance*, ACS Symposium Series, Washington DC, 1996, pp. 90-96.
47. SAWADIPANICH Y, BAIMAI V & HARRISON BA - *Anopheles dirus* species E: chromosomal and crossing evidence for another member of the *dirus* complex. *J Am Mosq Control Assoc*, 1990, **6**, 477-481.
48. SCOTT J A, BROGDON WG & COLLINS FH - Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, **49**, 520-529.
49. SHARPE R G, HIMS MM, HARBACH RE & BUTLIN RK - PCR based methods for identification of species of the *Anopheles minimus* group: allele specific amplification and single strand conformation polymorphism. *Med Vet Entomol*, 1999, (sous-press).
50. SIMARD F, FONTENILLE D, LEHMANN T, GIROD R, BRUTUS L *et al.*- High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and Eastern Outer Islands. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, **60**, 1000-1009.
51. SMITS A, ROELANTS P, VAN BORTEL W & COOSEMANS M - Enzyme polymorphisms in the *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) complex related to feeding and resting behavior in the Imbo Valley, Burundi. *J Med Entomol*, 1996, **33**, 545-553.
52. STEINER WWM, NARANG S, KITZMILLER JB & SWOFFORD DL - Genetic divergence and evolution in neotropical *Anopheles* (Subgenus *Nyssorhynchus*). In: STEINER WWM, TABACHNICK JW, RAI KS, NARANG S (Eds), *Recent developments in the genetics of insect disease vectors*, Stipes Publishing Comp, Champaign, IL, 1982, pp. 523-550.
53. SUCHARIT S, KOMALAMISRA N, LEEMINGSAWAT S, APIWATHANASORN C & THONGRUNGKIAT S - Population genetics studies on the *Anopheles minimus* complex in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health*, 1988, **19**, 717-723.
54. TOURE YT, PETRARCA V, TRAORÉ SF, COULIBALY A, MAIGA HM *et al.*- Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.s. in Mali, West Africa. *Genetica*, 1994, **94**, 213-223.
55. TOURE YT, PETRARCA V, TRAORÉ SF, COULIBALY A, MAIGA HM *et al.*- The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia*, 1999, **40**, (sous-press).
56. VAN BORTEL W, TRUNG HD, MANH ND, ROELANTS P, VERLE P & COOSEMANS M - Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. *Trop Med Intern Health*, 1999, **4**, 257-265.
57. WALTON C, HANDLEY JM, KUVANGKADILOK C, COLLINS FH, HARBACH RE *et al.*- Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med Vet Entomol*, 1999, **13**, 24-32.
58. WHITE GB - *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1974, **68**, 278-301.
59. WHITE GB - The place of morphological studies in the investigation of *Anopheles* species complex. Document OMS VBC/SC/76.14, 1976, 21 pp.
60. WILKES TJ, MATOLA YG & CHARLWOOD JD - *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol*, 1996, **10**, 108-110.
61. XU JN & QU FY - Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. *Med Vet Entomol*, 1997, **11**, 134-138.
62. XU SB & QU FY - Studies on chromosomes of thirteen species of anophelines mosquitoes of China. *J Med College People's Liberation Army*, 1991, **6**, 286-291.
63. YASOTHORNRIKUL S, PANYIM S & ROSENBERG R. Diagnostic restricted fragment patterns of DNA from the four isomorphic species of *Anopheles dirus*. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health*, 1988, **19**, 703-708.
64. YU YUAN - Studies on the two forms of *Anopheles minimus* Theobald, 1901 in China (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst*, 1987, **19**, 143-145.
65. YU YUAN & LI M - Notes on the two forms of *Anopheles* (*Cellia*) *minimus* Theobald, 1901 in Hainan Island. *J Parasitol Parasit Disease*, 1984, **2**, 95-98.
66. ZHENG L, BENEDICT MQ, CORNEL AJ, COLLINS FH & KAFATOS FC - An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 1996, **143**, 941-952.