

Année : 2016 N° d'ordre : 195



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Entomologie

Présentée par :

Abdoulaye NIANG

**Etude du système de reproduction d'*Anopheles gambiae* s.l. :
mécanismes d'isolement reproductif entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*
et facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles**

Soutenue le 18 Février 2016 devant le jury composé de :

Jury	Président	Pr Oumar GAYE	FMPOS/UCAD
	Rapporteurs	Pr Frederic TRIPET	Keele University (UK)
		Pr Sékou F. TRAORE	FMPOS/USTTB (Mali)
		Pr Roch K. DABIRE	IRSS (Burkina Faso)
	Examineurs	Pr Ousmane FAYE	FST/UCAD
		Dr Ibrahima DIA	IPD (Sénégal)
		Dr Cheikh SOKHNA	IRD (Sénégal)
	Directeur de thèse	Dr Abdoulaye DIABATE	IRSS (Burkina Faso)

JE RENDS GRÂCE À ALLAH LE TOUT PUISSANT ET SON PROPHÈTE MOHAMED PAIX ET SALUT SUR LUI

Je dédie ce travail

A la mémoire de ma mère Bineta Coumba BA, ton affection était pour nous le meilleur des réconforts. Ton attachement envers nous était si grand au point que tu t'es toujours sacrifiée pour ne pas nous voir souffrir. « Yaye », je regrette que tu ne sois pas là en ce jour qui t'aurait fait autant de plaisir mais je m'en remets à la Volonté Divine qui t'a arrachée ce Vendredi 03 avril 2015. Nous nous souviendrons toujours que tu étais une maman adorable. Que la terre te soit légère et qu'Allah Le Tout Puissant t'accorde son pardon et accueille ton âme dans son plus haut paradis ! Amen

A la mémoire de mon père Hamady Moussa NIANG, tu resteras pour moi le symbole de la liberté, la vérité et de l'humilité dans ce bas monde mais aussi le symbole de la crainte à Allah. « Baaba » saches que tu nous as quittés très jeunes mais ton souvenir restera à jamais dans nos mémoires. Que la terre te soit légère et qu'Allah Le Tout Puissant t'accorde son pardon et accueille ton âme dans son plus haut paradis ! Amen

A la mémoire de ma très chère grand-mère Binta Banal DIENG, je n'exprimerai jamais assez l'amour et l'admiration que j'ai pour toi. Si je suis ici aujourd'hui, c'est parce que tu étais la hier pour moi. « Yaye Tokossel », tu m'as appris à supporter dans la dignité, la faim, la pauvreté et la souffrance, le partage et le respect d'autrui, la patience et la persévérance. Que la terre te soit légère et qu'Allah Le Tout Puissant t'accorde son pardon et accueille ton âme dans son plus haut paradis ! Amen

A la mémoire de ma grand-mère Coumba Doya KANTE, « Yaye Maodo » tu nous as inculqué des valeurs culturelles et morales qui suffisent pour nous, tes fils et petit-fils à rester unis à vie. Que la terre te soit légère et qu'Allah Le Tout Puissant t'accorde son pardon et accueille ton âme dans son plus haut paradis ! Amen

A ma mère Selly Coumba NDIAYE, tu as assuré la partie bâton de mon éducation de base avant de m'envoyer à l'école. « Neene », Je ne saurais te remercier jamais assez. Qu'Allah Le Tout Puissant te garde encore longtemps parmi nous et en très bonne santé !

A la mémoire de ma grand-mère Hinna DIALLO. Voilà encore 20 ans que tu nous as quittés mais nous gardons toujours précieusement en mémoire les valeurs que tu nous as inculquées. Que la terre te soit légère et qu'Allah Le Tout Puissant t'accorde son pardon et accueille ton âme dans son plus haut paradis ! Amen.

De par mes leçons spirituelles transmises par ces dames de fer « beedo Sokhnabee » je serais tant que possible, particulièrement attentif à toutes les femmes du monde.

A ma très chère épouse Aïssata NDIAYE NIANG, la rose du grand désert et à mon fils Seydou BA NIANG dit Dr DIABATE, Burkina ou NIANG FASO, « Keccangel calingel miñedee ».

A mes tantes et mamans Comba Aïssata DIENG, Aïssata Hinna, Coumba Hinna, feu Fatim Hinna, Hawo Boubou NDIAYE, feu Farmata Hamady NIANG, Coumba Hamady Sy, Binta Dickel NDIAYE, Khady KANE, Faty DIOP, Houleye DIALLO, Banal DIALLO, Fama DIALLO, Aissata Coumba DIALLO, Maïrame NDIAYE, Penda COUNOU, Coumba SAMBA, Nané BA, Maïrame WOPPA, Yoby SOW et Barou SARR.

Merci pour les bénédictions, le soutien sans faille et la joie que vous me donnez à chaque fois.

A mes frères et sœurs Moussa NIANG et son épouse Koudy DIALLO, Démba NIANG et son épouse Woppa DEME, Abou NIANG, Amadou NIANG, Adama NIANG, Farba NIANG, Abdou DIOUF NIANG, Aliou DIA, Hamady SOW, Abda NIANG, Docka NIANG, Oumar NIANG, Djouma NIANG, Amy NDIAYE, Maimouna, Mbossé, Coumba NIANG, Salamata NIANG, Harry NIANG, Selly NIANG, Hawo NDIAYE, Kadja Maloum SY, Dieynaba NDIM, Toulaye DIA et les autres.

A mes chers pères Samba Hinna NIANG, feu Altiné NDIAYE, Samba Sira NDIAYE, feu Baaba Nawel DIA, Hamady Doya KANTE, Sik Oumar DIALLO, Boubou Sarra DIALLO, Ibra MBAYGOU, Démba NGuiro BA, Gourmo DIALLO, feu Kalidou BALLA, feu Harrane Walla DEME, Malal DIENG, feu BA Démba.

A mes chers oncles Mama DIALLO et son épouse Fama DIA, Kalidou DEME, Abdoulaye KANE, Syleymani NDIAYE, Ismaïla NDIAYE, Iba BARRY, Yéro Poulo DIALLO, Démba DIDE, Yamou DIALLO, Djiby SOW, Yéro DIENG, Idy DIALLO, Thierno Djiby Tambadou, Thierno Allassane DIOL, Thierno Mamadou LY, Thierno Hamé TALLA, Thierno Tidiany TALLA, Amadou Abou NDIAYE, Daouda KANDE.

A la mémoire de mon grand-frère Amadou Démba BA. Voilà 23 ans que tu n'es plus mais nous nous souvenons et souviendrons toujours de tes paroles plaines d'amour, de sagesse et de spiritualité.

Qu'Allah Le Tout Puissant t'accorde son pardon et accueille ton âme dans son plus haut paradis !
Amen

A mes grands frères Djibril DIALLO, Samba Mody DIALLO, Démba DIENG, Bathia DIENG, Djiby DIA, Yoro NDIAYE, Ablaye NDIAYE, Djiby NDIAYE, Démba DIOULDE, Lamine DIOP, Samba NDIAYE, Malal DIALLO, Djiby DIOP, Dierry SARRE, Oumar SARRE, Mamoudou SORO, Abdoul BA et les autres.

A mes petits frères et sœurs Banal, Zalika, Kaba, Abou, Mama SY, Seikou, Ablaye, Néné, Balla DIALLO, Alpha BA, feu Samba NDIAYE, Bocara BA, Mamoudou, Abdoulaye SOW, Moussa DIALLO, Amadou Tidiane KA, Mamadou DIALLO, Mouhamed BA, Ibrahima Diallo, Ablaye AWE, Lybé Diallo et les autres.

A tous mes ami(e)s d'enfance Idy BA, Salif, Yéro, Idy SY, Idy Hawa, Mamadou Ibra, Boubou, Amadou Kalidou, Samba Kalidou, Hamady Fa Diop, Balla DIENG, Elimane, Mousse Ngounou, Démba SY, Eh Hadji BA, Eliyass BA, Bocara NDIAYE, Zob, Younouss, Hamidou, Amadou T SECK, Ciré LY, Ibrahima BA, Rougui, Hapsa, Mariata, Hawa SY, Niamey DIALLO, Tacko BA, Sileymane Gorry BA, Hamady DIALLO, Ousmane DIA, Mamadou DIOP, Mariata TALL, Hamath Koné, El Hadji BA, Dianga DIALLO, Marké, Fama LY, Aissatou LABOU, Daba DIONE et les autres.

A mes chers amis je pense en particulier à Sada et son épouse Ndeye NDIAYE, Seydou BA et son épouse Haby, Thierno DIALLO, Moussa SARRE, Binta DEME, Ibrahima DIOP et Baidy NIANG.

A mes collègues du MIE en particulier tous les étudiants de la promotion IV, Max Ovazza.

A tous les membres et sympathisants de NANGONDIRAL & FGW, de NGATAMARE, de l'AMEERGO et de la communauté sénégalaise à Bobo-Dioulasso avec à sa tête mon frère Hamady BA.

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS-DRO) / Centre Muraz à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, partenaire coopérant de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et, au « Centre for Applied Entomology and Parasitology » à Keele University, UK. Tous les frais de ce travail ont été entièrement pris en charge par un projet financé par le Medical Research Council (www.mrc.ac.uk) obtenu dans le cadre d'une collaboration de deux équipes de recherche en entomologie dirigées par d'éminents chercheurs, Docteur Abdoulaye DIABATE (Burkina Faso) et Professeur Frederic TRIPET (UK) pour une période de 5 ans (Juin 2011 - Mai 2016).

REMERCIEMENTS

Nous remercions très sincèrement le Professeur Roch K DABIRE, Professeur Titulaire, Directeur Régional de l'Ouest de l'IRSS. Par le canal de votre très bonne équipe de recherche en entomologie vous avez su mettre à notre disposition d'excellentes ressources humaines mais aussi des moyens financiers et logistiques nécessaires pour la réalisation de ce travail. Veuillez agréer ma profonde gratitude et transmettre mes sincères remerciements à tout le personnel de l'institut.

Nous remercions chaleureusement Docteur Abdoulaye DIABATE, Maître de Recherche à l'IRSS/Centre Muraz à Bobo-Dioulasso et Directeur de cette thèse pour avoir accepté de diriger ce travail. Vous avez su nous guider inlassablement, avec beaucoup d'enthousiasme et de patience, en nous faisant profiter de votre expérience dans tous les aspects de la recherche. Je suis très marqué par votre sens du travail méthodique, pratique, quantitatif et qualitatif. Vos conseils et vos suggestions ne nous ont pas fait défaut pour arriver à ces résultats qui sont les vôtres. Vos qualités humaines et intellectuelles, votre grandeur d'âme, votre générosité, ainsi que votre rigueur forcent naturellement notre admiration pour vous. Nous apprécions l'honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail. Nous ne saurons jamais vous remercier assez.

Nous remercions chaleureusement Professeur Frederic TRIPET, PhD, FHEA, FRSB, Professeur en Ecologie Moléculaire des Insectes Vecteurs de Maladies, pour avoir accepté de diriger une partie de ce travail réalisée dans son laboratoire. Vous avez consacré vos temps précieux pour ce travail. Tant de disponibilités, tant de dévouements ne peuvent me laisser indifférent. Pour tout l'appui technique et scientifique du début à la finalisation de ce travail, veuillez accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Nous adressons nos sincères remerciements au Professeur Ousmane FAYE, Professeur Titulaire, Responsable du Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire à la FST/UCAD. Vous nous avez suivis à distance, soutenus et facilité l'obtention des papiers administratifs à chaque fois. Vous êtes pour nous un modèle et un des meilleurs exemples à suivre. Nous apprécions profondément votre compréhension et votre attachement à la formation des jeunes chercheurs que nous sommes. Votre sagesse, votre humilité naturelle et vos immenses qualités intellectuelles nous ont toujours séduits. Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre profonde considération.

Nous remercions aussi très chaleureusement Docteur Lassana KONATE, pour avoir guidé nos premiers pas dans la recherche. Vous nous avez suivis à distance, avec intérêt, pour nous apporter réconfort et encouragement à chaque fois. Nous vous réitérons notre reconnaissance avec une profonde considération et une grande estime.

Nous adressons nos sincères remerciements au Professeur Oumar GAYE, Professeur Titulaire, Responsable du Laboratoire de Parasitologie à FMPOS/UCAD. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jugement de ce travail. Vos qualités humaines et scientifiques font de vous un modèle à suivre. Votre sagesse et votre humilité naturelle nous ont toujours séduits. Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre profonde considération.

Professeur Sékou F TRAORE, Professeur Titulaire, Directeur du Centre de Recherche et de Formation Sur le Paludisme Entomologie à FMPOS/USTTB (Mali) et rapporteur externe, malgré vos multiples occupations, vous nous faites un grand honneur d'avoir accepté de juger ce travail. Recevez ici toute notre reconnaissance et notre gratitude.

Docteur Ibrahima DIA, HDR, Responsable du pôle Paluvect de l'Unité d'Entomologie Médicale à l'Institut Pasteur de Dakar, vous avez accepté de juger ce travail en dépit de votre agenda très chargé, soyez en abondamment remercié. Vous avez guidé nos premiers pas dans la recherche. Vous nous avez toujours suivis à distance, avec intérêt, pour nous apporter réconfort et encouragement à chaque fois. Nous vous réitérons notre reconnaissance avec une profonde considération et une grande estime.

Docteur Cheikh SOKHNA, HDR, à l'Institut de Recherche pour le Développement à Dakar, pour l'honneur que vous nous faites, malgré vos multiples occupations, d'avoir accepté de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

Nous remercions nos collègues et amis de l'IRSS-DRO/Centre Muraz Simon, Ibrahim, Hyacynth, Mamaï, Maïga, Moussa, Aziz, Etienne, Robert, Nina, François, Soma, Charles, Poda, Arthur, Barry, Séverin, Epopa, Bailli, NDO, Fabrice, Da Frédéric, Cerile et Iboudo. Votre collaboration a été capitale pour la qualité de ce travail qui est également le vôtre. Nous remercions aussi nos collègues et amis de Keele University Doug, Nahla, Esther, Nana, Nancy, Kady, Imran et Jullien.

Nous remercions tous nos maîtres à l'IRSS-DRO/Centre Muraz particulièrement, Pr Robert T GUIGUEMDE, Pr Jean B OUEDRAOGO, Pr Zekiba TARNAGDA, Pr Nicolas MEDA, Dr Léa TOE, Dr Frédéric SIMARD, Dr Florence FOURNET, Dr Serge YERBANGA, Dr Thiéry LE FEVRE, Dr Olivier ROUX, Dr Karine MOULINE et Dr Hama DIALLO, Dr Seydou YARO et les autres.

Un très grand merci à tout le personnel de l'IRSS-DRO/Centre Muraz, particulièrement à Madame Yaméogo, Madame Traoré, Tanti, Touro, Kiendrébéogo, Clotide, Madame Ouedraogo, Guel, Seyni, Wari, Bacary, Millogo, Hervé, Ali, Issa, Niékéma, Bienvenue, Hamidou, Ibra, Kabré, Zougrana, Tamboula, Dabiré, Cheikh Oumar, Madame Kaboré.

Nous remercions tous nos instituteurs, professeurs du moyen et secondaire, particulièrement feu Ngor NDIAYE ancien directeur de l'école de Golléré, Mr Abdoul Karim DIOP et El Hadji Amadou FALL anciens professeurs d'Histoire et Géographie respectivement au Collège de Mboumba et du Lycée Seydina Limamou Laye de Pikine. Votre contribution à mon éducation et à ma formation son d'un grand apport sur mon chemin.

Un grand merci à tous les habitants des villages de la Vallée du Kou (Karim, Djiby, Dramane, David), Bana et Soumousso (Olivier, Armel, Baya, Moussa) pour avoir collaboré et aidé à mener, à bien ce travail. Merci à tous nos proches et amis de Bobo-Dioulasso pour le soutien et l'assistance que vous nous avez toujours accordés.

Un grand merci à Amadou NDIAYE le Saint Louisien, à l'Institut Pasteur de Dakar qui m'a fait l'honneur d'imprimer gratuitement tous les exemplaires de cette thèse.

SIGLES ET ABBREVIATIONS

ASB = Albumine de Sérum Bovin	m ³ = mètre cube
ADN = Acide Désoxyribonucléique	mA = milliampère
<i>Ae.</i> = <i>Aedes</i>	MalERA = Malaria Eradication Research Agenda
AG = Amorce <i>An. gambiae</i>	Mb = Méga-base
<i>An.</i> = <i>Anopheles</i>	mg/l = milligramme par litre
AR = Amorce <i>An. arabiensis</i>	MII = Moustiquaire Imprégnée d’Insecticide
Bti = <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	ml = millilitre
CTA= Combinaisons Thérapeutiques à base d’Artémisinine	mm = millimètre
<i>Cx.</i> = <i>Culex</i>	mM = millimole
df = Degree of freedom	mn = minute
ddl = Degrés de liberté	mV = millivolt
DDT = Dichloro-Diphényl-Trichloréthane	Nb= Nombre
dNTP = DésoxyribonucléotideTriPhosphate	nm = nanomètre
<i>D.</i> = <i>Drosophila</i>	OMD= Objectifs du Millénaire pour le Développement
DO = Densité Optique	OMS = Organisation Mondiale pour la Santé
<i>et al.</i> = et alii	OP = Organophosphorés
F ₁ = Hybride de première génération	p = p-value
F _{1+n} = Hybride de n ^{ième} génération	Pb = Paire de bases
F1 = Première fauchée	PCR = Polymerase Chain Reaction
F2 = Deuxième fauchée	PCR-RFLP = Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism
F3 = Troisième fauchée	s = Seconde
g/l = gramme par litre	SINE = Short INterspersed Elements
GPS = Global Positioning System	s.l. = sensu lato
ha = hectare	SNP = Single Nucleotide Polymorphisms
HEG = Homing Endonuclease Genes	s.s. = sensu stricto
H ₂ O = Eau	Taq = <i>Thermus aquaticus</i>
HR = Humidité Relative	TIS = Technique de l’Insecte Stérile
IGS = Inter-Genic Spacer	UCAD = Université Cheikh Anta Diop
IRSS = Institut de Recherche en Sciences de la Santé	U/μl = Unité par microlitre
J = Joule	VK= Vallée du Kou
Kdr = Knockdown resistance	WHO = World Health Organization
km = kilomètre	χ ² = Chi-deux
km ² = kilomètre carré	°C = Degré Celsius
LAV = Lutte Antivectorielle	μl = microlitre
L = Longueur	μM = micromole
m = mètre	95% CI = 95% Confidence Interval
m/s = mètre par seconde	

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Distribution géographique des espèces du complexe <i>An. gambiae</i> . A: <i>An. arabiensis</i> (rouge) ; B: <i>An. gambiae</i> et <i>An. coluzzii</i> (verte) ; C: <i>An. melas</i> (bleue) ; <i>An. merus</i> (orange) ; <i>An. bwambiae</i> (turquoise) ; D: <i>An. quadriannulatus</i> (jaune) ; <i>An. amharicus</i> (rose) et <i>An. comorensis</i> (cercle bleu clair) (Lanzaro <i>et al.</i> , 2013).....	19
Figure 2: Localisation géographique des sites d'étude de VK7, Soumousso et Bana dans la zone soudanienne du Burkina Faso	31
Figure 3: Répartition géographique des espèces du complexe <i>An. gambiae</i> s.l. au Burkina Faso (Costantini <i>et al.</i> , 2009)	31
Figure 4: Localisation géographique des sites d'étude de VK7, Soumousso et Bana dans la zone soudanienne du Burkina Faso	32
Figure 5: Localisation de la Vallée du Kou.....	34
Figure 6: Localisation de Soumousso	35
Figure 7: Localisation de Bana.....	36
Figure 8: Collecte des larves d'anophèles (photo : A. Niang).....	39
Figure 9: Echantillonnage des moustiques dans les essaims (photo : S. Sawadogo).....	41
Figure 10: Essaim d' <i>An. gambiae</i> s.l. observé au Burkina Faso (Diabaté & Tripet, 2015).....	41
Figure 11: Capture des moustiques dans les lieux de repos (photo : S. Sawadogo).....	42
Figure 12: Séance d'identification morphologique des moustiques (photo : A. Niang)	43
Figure 13: La carte génomique montrant des régions péricentromériques divergentes entre <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> : (A) Localisation des SNPs utilisés dans les « îles de spéciation » des chromosomiques X, 2L et 3L. (B) Grossissement des régions péricentromériques.....	45
Figure 14: Transplantation larvaire (A ; photo : A. Diabaté) et retrait des adultes émergents (B ; photo : A. Niang)	49
Figure 15: Résultats du génotypage des SNPs localisés dans les « îles de spéciation » des chromosomes X, 2L et 3L: chaque ligne représente le génotype individuel d'un moustique sur les 15 SNPs utilisés. Chaque colonne représente un locus avec deux allèles à l'exception du chromosome X qui comportent un allèle chez les mâles (hémizygotés). La couleur bleu clair représente les allèles homozygotes pour <i>An. coluzzii</i> , bleu foncé pour les allèles homozygotes <i>An. gambiae</i> et le jaune représente les allèles hétérozygotes.	57
Figure 16: Génotypage des SNPs dans les « îles de spéciation » chez les mâles et femelles <i>An. gambiae</i> et <i>An. coluzzii</i> collectés dans des essaims à VK7 (A) et à Soumousso (B) entre 2006 et 2011.....	61

Figure 17: Proportion d'association entre les essaims spécifiques et les îles de spéciation chez <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	63
Figure 18: Caractérisation spécifique de la boule de sperme extraite de la spermathèque des femelles inséminées d' <i>An. gambiae</i> s.s. Les bandes d'ADN sont représentées par deux marqueurs de taille de 100 pb (MT) ; contrôle négatif (C-, 4) ; boules de sperme récupérées des spermathèques de femelles capturées en couples interspécifiques d' <i>An. gambiae</i> (col, 5-8) et <i>An. coluzzii</i> (gam, 9). Les bandes attendues sont indiquées en (pb).....	70
Figure 19: PCR multiplexe pour le sexage et l'identification spécifique des larves d' <i>An. gambiae</i> s.l. Les bandes d'ADN sont représentées par deux marqueurs de taille de 100 pb (1, 21) ; contrôle négatif (C-, 2) ; mâles (3-5) et femelles (6-8) <i>An. coluzzii</i> , femelles hybrides (9-11), mâles (12-14) et femelles (15-17) <i>An. gambiae</i> s.s. et femelles <i>An. arabiensis</i> (18-20). Les bandes attendues sont indiquées en (pb).....	71
Figure 20: Comparaison des taux d'hybridation aux stades de reproduction (couples collectés dans les essaims), larvaire et adulte au repos.....	76
Figure 21: Nombre de moustiques émergents : (A) Comparaison des taux d'émergence des adultes dans les cages avec et sans prédateurs. (B) Comparaison des taux d'émergence des femelles des espèces parentales et leurs hybrides réciproques. Les rectangles rétrécis au milieu verts (21A) et blancs (21B) indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux intersectant les lignes verticales en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les traits (21A) et les points (21B) noir foncés correspondent à la médiane.	84
Figure 22: Comparaison du temps de développement larvaire des mâles et femelles dans les cages avec et sans prédateurs. Les rectangles retrassis indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les points verts correspondent à la médiane.	86
Figure 23: Temps de développement des espèces parentales et les hybrides réciproques.....	87
Figure 24: Taille des ailes des adultes émergents des cages avec et sans prédateurs. Les rectangles verts retrassis au milieu indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux intersectant les lignes verticales en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les traits noir foncé correspondent à la médiane.....	88
Figure 25: Taille des ailes des espèces parentales et leurs hybrides réciproques. Les rectangles verts retrassis au milieu indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux intersectant les lignes verticales en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les traits noir foncé correspondent à la médiane.....	89
Figure 26: Comparaison des réserves énergétiques des mâles nouvellement émergés (Emergent), des mâles au repos (matin + soir) et dans des essaims (pic)	96
Figure 27: Bilan énergétique (sucres totaux (A et B) et glycogène (C et D)) des mâles (collectés au début (F1), au pic (F2) et à la fin de l'essaimage (F3)) d' <i>An. coluzzii</i> (A et C) et <i>An. gambiae</i> (B et D). Les mâles <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> ont été collectés respectivement à VK7 et à Soumouso. Les graphes du même groupe ayant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents ($P>0.05$).....	99

Figure 28: Comparaison de la taille des mâles couplés et non-couplés ainsi que des mâles collectés à différents temps donnés au cours de l'essaimage d' <i>An. coluzzii</i> à VK7 (A) et <i>An. gambiae</i> à Soumouso (B).....	100
Figure 29: Comparaison de la taille des mâles et celle des femelles pris en couples et distribution des fréquences de la taille des mâles couplés (en rouge) et non-couplés (en bleu) chez <i>An. coluzzii</i> (VK7) (A, B) et <i>An. gambiae</i> (Soumouso) (C, D)	101
Figure 30: Corrélation entre la taille des ailes gauches et droites des mâles couplés et non-couplés capturés dans les essais	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Description allélique des SNPs utilisés pour la caractérisation des hybrides entre <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	46
Tableau 2: Accouplement positivement assorti incomplet entre <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> dans les essais collectés à VK7, Soumouso et Bana	73
Tableau 3: Fréquences des femelles <i>An. coluzzii</i> , <i>An. gambiae</i> et hybrides au stades larvaire et adulte au repos à VK7 et à Soumouso	75
Tableau 4: Régression Logistique des effets de la localité (VK7 et Soumouso), espèces jumelles et le stade de vie sur les taux d'hybridation entre <i>An. coluzzii</i> and <i>An. gambiae</i>	77
Tableau 5: Tableaux de contingence comparatifs du succès au développement d' <i>An. coluzzii</i> , <i>An. gambiae</i> et leurs hybrides réciproques en l'absence et en présence des prédateurs	85
Tableau 6: Valeurs moyennes des sucres totaux, du glycogène, des lipides et des protéines contenues dans différents groupes de moustiques collectés au repos (matin, soir) et en activité d'essaimage.....	97

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Introduction générale.....	2
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. Revue bibliographique	10
I.1. Les vecteurs du paludisme en Afrique	10
I.1.1. Le complexe <i>An. gambiae</i>	11
I.1.1.1. La cytogénétique et les formes chromosomiques d' <i>An. gambiae</i> s.s.....	11
I.1.1.2. Les formes moléculaires d' <i>An. gambiae</i> s.s.....	13
I.1.2. Isolement reproductif avec flux de gènes entre <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	15
I.1.2.1. Isolement reproductif précopulatoire	16
I.1.2.2. Isolement reproductif post-zygotique	16
I.1.3. Distribution géographique des espèces du complexe <i>An. gambiae</i>	17
I.2. Cycle de développement des anophèles	20
I.2.1. La phase aquatique.....	20
I.2.2. La phase aérienne.....	20
I.2.2.1. Le comportement trophique des anophèles.....	21
I.2.2.2. Le comportement reproductif des anophèles	21
I.3. La lutte antivectorielle	22
I.3.1. La lutte anti-larvaire.....	22
I.3.2. La lutte contre les stades adultes.....	23
I.3.2.1. Lutte génétique contre les vecteurs du paludisme.....	24
I.3.2.1.1. La stratégie de suppression par la Technique de l’Insecte Stérile (TIS).....	24
I.3.2.1.2. La stratégie de remplacement par diffusion et dissémination de gènes	25
I.3.2.1.3. Facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles	26
PRESENTATION DE L’ETUDE	27

II. Présentation de l'étude.....	28
II.2. Présentation des faciès éco-climatiques du Burkina Faso	29
II.2.1. La zone sahélienne.....	29
II.2.2. La zone soudano-sahélienne	30
II.2.3. La zone soudanienne.....	30
II.3. Présentation des sites d'étude	32
II.3.1. La Vallée du Kou (VK7)	33
II.3.2. Soumousso	34
II.3.3. Bana	36
MATERIELS ET METHODES	37
III. Matériels et méthodes.....	38
III.1. Echantillonnage et traitement des moustiques	38
III.1.1. Evaluation des mécanismes d'isolement reproductif précopulatoire	38
III.1.1.1. Prospection larvaire	38
III.1.1.2. Suivi et collecte de moustiques dans les essais	39
III.1.1.3. Collecte des moustiques dans les lieux de repos	42
III.1.1.4. Identification morphologique et moléculaire des moustiques collectés	42
III.1.1.5. Identification moléculaire et génotypage des SNPs	44
III.1.2. Evaluation des mécanismes d'isolement reproductif post-zygotique.....	47
III.1.2.1. Collecte et mise en ponte individuelle des femelles sauvages	47
III.1.2.2. Elevage des larves et croisement des adultes de la F ₀	47
III.1.2.3. Transplantation des larves de la F ₁	48
III.2. Etude des facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles.....	50
III.2.1. Collecte et traitement des moustiques	50
III.2.2. Techniques d'extraction et dosage des métabolites.....	50
III.2.2.1.Extraction	51
III.2.2.2. Dosage des métabolites	51
III.2.2.2.1. Dosage des protéines (Bradford, 1976).....	51
III.2.2.2.2. Dosage des sucres.....	51
III.2.2.2.3. Dosage du glycogène.....	52
III.2.2.2.4. Dosage des lipides	52
III.2.2.2.5. Calcul de la concentration des différents métabolites	53
III.2.3. Mesure de la taille des ailes et estimation de la symétrie des mâles	53
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	54

Chapitre 1 : Rôle des « îles de spéciation » dans la ségrégation spatiale des essaims d' <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	55
1.1. Problématique.....	55
1.2. Méthodologie.....	56
1.3. Résultats	58
1.3.1. Identification moléculaire des mâles et femelles capturés	58
1.3.2. Génotypage des SNPs chez les mâles et femelles capturés	59
1.4. Discussion	64
Chapitre 2 : Extrême dominance asymétrique et hybridation saisonnière des populations d' <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> à l'Ouest du Burkina Faso.....	68
2.1. Problématique.....	68
2.2. Méthodologie.....	69
2.2.1. Echantillonnage des moustiques.....	69
2.2.2. Identification des moustiques par PCR	70
2.2.3. Analyse des données.....	71
2.3. Résultats	72
2.3.1. Suivi des essaims.....	72
2.3.2. Femelles sauvages collectées au stade larvaire	74
2.3.3. Femelles au stade adulte collectées au repos	74
2.3.3. Taux d'hybridation et la sélection contre les hybrides	76
2.4. Discussion	77
Chapitre 3 : Estimation de l'isolement reproductif post-zygotique entre <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	81
3.1. Problématique.....	81
3.2. Méthodologie.....	82
3.3. Résultats	83
3.3.1. Le taux d'émergence globale.....	83
3.3.2. Comparaison du succès à l'émergence des adultes	83
3.3.3. Le temps de développement larvaire	86
3.3.4. La mesure de la taille des ailes	88
3.4. Discussion	89
Chapitre 4 : Rôle des réserves nutritionnelles et la taille sur le succès reproducteur des mâles <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> s.s.....	94
4.1. Problématique.....	94
4.2. Méthodologie.....	95
4.3. Résultats	95

4.3.1. Variations des réserves énergétiques en fonction de l'activité des mâles	95
4.3.2. Bilan énergétique des mâles des essaims d' <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	98
4.3.3. Réserves énergétiques des mâles couplés et non-couplés dans les essaims	100
4.3.4. Mesure de la taille des ailes.....	100
4.3.4.1. Implication de la taille des ailes dans le succès reproducteur	100
4.3.4.2. Estimation de la symétrie	102
4.4. Discussion	103
4.4.1. Variations des réserves énergétiques en fonction de l'activité des mâles	103
4.4.2. Bilan énergétique des mâles des essaims d' <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	104
4.4.3. Réserves énergétiques des mâles couplés et non-couplés dans les essaims	105
4.4.4. Taille des ailes et symétrie du mâle.....	106
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	108
Conclusion générale	109
Perspectives.....	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112
ANNEXES	129
Annexe 1 : Le Principe de la PCR et procédure d'extraction d'ADN.....	130
Annexe 2 :Protocole de dosage des métabolites d' <i>An. gambiae</i> s.l. par spectrophotométrie, gamme des standards et Préparations des réactifs et solutions	133
Annexe 2 :Protocole de dosage des métabolites d' <i>An. gambiae</i> s.l. par spectrophotométrie, gamme des standards et Préparations des réactifs et solutions	136
Annexe 3 : Communications orales et affichées	139
Annexe 4 : Articles publiés ou soumis	140
Article 1 :.....	140
Article 2 :.....	150
Article 3 :.....	168

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Le paludisme est l'une des maladies parasitaires les plus répandues dans le monde (Greenwood & Mutabingwa, 2002). Il est causé par un protozoaire appartenant à l'une des cinq espèces du genre *Plasmodium* (Figtree *et al.*, 2010). Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre d'une femelle de moustique du genre *Anopheles*. Selon les estimations de l'OMS en 2000, 300 à 500 millions de cas de paludisme dont 2,7 millions de décès ont été enregistrés dans le monde (WHO, 2005). Cette affection parasitaire a été identifiée comme l'un des plus grands obstacles au développement mondial. Ainsi, l'un des huit Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD) visait à réduire l'incidence du paludisme et commencer à inverser la tendance à l'horizon 2015 (WHO, 2014). A la date d'aujourd'hui, selon le rapport de l'OMS de 2015 intitulé « *Achieving the Malaria Millennium Development Goal Target* » cet objectif spécifique a été atteint, car une baisse de 37% du nombre de nouveaux cas a été observée en 15 ans (WHO, 2015). Le taux de mortalité des enfants de moins de 5 ans dû au paludisme a baissé de 65%, bien que cela représente encore plus de deux tiers des cas de décès chez les enfants, toutes causes confondues (WHO, 2015). Il est fort heureux de constater aujourd'hui que le paludisme a régressé dans toutes les régions du monde (Haque *et al.*, 2014 ; WHO, 2015). Les diminutions les plus rapides ont été observées en Asie centrale et orientale. Cependant, malgré ces progrès considérables, le paludisme demeure un problème majeur de santé publique dans de nombreuses régions, en particulier en Afrique subsaharienne. Selon le même rapport, presque la moitié de la population mondiale, soit 3,2 milliards de personnes, est exposée au paludisme et on estime à 214 millions le nombre de cas avec environ 438 000 décès par an (WHO, 2015). La lutte contre le paludisme repose essentiellement sur la prévention à travers une vaste campagne de lutte antivectorielle et la détection précoce des cas et de leur traitement :

- Le traitement repose sur un diagnostic précoce et l'administration des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) aux patients. Des études ont montré aussi que le Traitement Préventif Intermittent (TPI) administré aux enfants de moins de cinq ans pendant la période de transmission du paludisme est une méthode préventive efficace pour la réduction de l'incidence du paludisme infantile (Cissé *et al.*, 2006 ; Dicko *et al.*, 2008 ; Sokhna *et al.*, 2008). Toutefois la résistance aux CTA est déjà connue dans le bassin du Mékong en Asie du Sud-Est depuis 2008 (Noedl *et al.*, 2008 ; Dondorp *et al.*, 2009 ; Phyo *et al.*, 2012). Sa progression vers l'Afrique pourrait avoir des conséquences dramatiques en terme de santé

publique puisqu'aucun médicament antipaludique efficace et aussi bien toléré que les CTA n'est actuellement disponible (Taylor *et al.*, 2015).

- La prévention repose essentiellement sur la lutte antivectorielle et utilise certaines mesures d'hygiène environnementale, des produits anti-moustiques (diffuseurs électriques, tortillons et aérosols), des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide (MII) et la Pulvérisation Intra-Domiciliaire d'insecticides (PID). Toutefois on assiste là également à une résistance généralisée des vecteurs du paludisme à la plupart des molécules d'insecticide, ce qui constitue une menace sérieuse à la lutte antivectorielle (Ranson *et al.*, 2011 ; Mitchell *et al.*, 2012 ; Mulamba *et al.*, 2014 ; Toé *et al.*, 2015 ; Dabiré *et al.*, 2015). Des outils et/ou stratégies alternatifs de lutte antivectorielle incluant l'approche des moustiques transgéniques sont en plein essor. Les essais vaccinaux aussi comme mesures préventives sont en cours et les résultats définitifs de l'essai le plus avancé en phase III, sont en deçà des attentes mais suggèrent que le vaccin candidat RTS,S/AS01 a le potentiel d'apporter une contribution substantielle à la lutte contre le paludisme lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres mesures de contrôle efficaces, en particulier dans les zones de forte transmission (Greenwood & Doumbo, 2015).

Face au problème récurrent de la résistance aux insecticides et aux antipaludiques, il devient aujourd'hui impératif d'explorer de nouvelles pistes de recherche pour trouver des solutions alternatives et cela ne pourra se faire que lorsque nous avons une très bonne compréhension de la biologie et de l'écologie des vecteurs impliqués. Le groupe consultatif de MalERA (*Malaria Eradication Research Agenda*) sur le contrôle des vecteurs dans son dernier rapport a mis l'accent sur des pistes de recherche qui pourraient aider au développement d'outils ou stratégies non conventionnels de lutte antivectorielle, et cela inclut entre autres, l'étude du comportement de reproduction des moustiques (MalERA, 2011). Les approches transgéniques ou des lâchers de mâles stériles par des techniques conventionnelles sont en plein essor et pourraient être appliquées dans un avenir proche en Afrique pour combattre le paludisme. Toutefois il faut noter que le succès de ces approches repose essentiellement sur la capacité des mâles lâchés à s'accoupler de façon compétitive avec les femelles sauvages. Une bonne compréhension de la biologie de reproduction des moustiques est donc primordiale au succès de ces approches.

Au sein du complexe *An. gambiae*, deux espèces jumelles *An. coluzzii* et *An. gambiae*, vecteurs majeurs du paludisme en Afrique sub-saharienne, sont en cours de spéciation avec flux de gènes. Une des conséquences dramatiques de ce flux de gènes pour le contrôle des vecteurs est le fait que les gènes de résistance aux insecticides peuvent introgresser entre les deux espèces, comme il a été rapporté dans des études réalisées au Burkina Faso et au Mali (Diabaté *et al.*, 2004 ; Dabiré *et al.*, 2009 ; Norris *et al.*, 2015). Une autre conséquence, moins dramatique, est liée aux futurs programmes de contrôle génétique qui consistera entre autres à diffuser et disséminer au sein des populations naturelles de moustiques des gènes réfractaires à l'infection du moustique par des *Plasmodium*. En effet, le flux de gènes entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* pourrait être particulièrement avantageux pour la diffusion des gènes réfractaires dans différentes populations cibles d'une façon simultanée (Diabaté & Tripet, 2015) à l'exception des zones où l'hybridation est totalement inexistante. Ainsi, comprendre les mécanismes d'isolement reproductif pré- et post-copulatoires entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* aurait des implications importantes pour le contrôle des vecteurs du paludisme.

An. coluzzii et *An. gambiae* sont caractérisées par une extrême rareté de leurs hybrides dans la majeure partie de leur aire de distribution géographique (Tripet *et al.*, 2001 ; della Torre *et al.*, 2005). La ségrégation spatiale des essaims doublée des accouplements positivement assortis entre les deux espèces constitue à ce jour, le seul mécanisme d'isolement reproductif précopulatoire formellement prouvé (Diabaté *et al.*, 2009 ; 2011 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Diabaté & Tripet, 2015). Toutefois, cette ségrégation spatiale des essaims n'est pas parfaite car des essaims mixtes, quoique à faible fréquence, ont été signalés (Diabaté *et al.*, 2006). Des inséminations croisées entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont été aussi mises en évidence occasionnellement et cela semble suffisant pour maintenir un flux de gènes entre les deux espèces (Tripet *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2013a). *An. coluzzii* et *An. gambiae* s'hybrident librement en laboratoire et leur descendance est viable et fertile (Tripet *et al.*, 2005 ; Diabaté *et al.*, 2007). A l'absence des barrières d'isolement reproductif post-zygotique intrinsèque, leurs traits génétiques spécifiques sont supposés se maintenir par des effets combinés d'accouplements positivement assortis (Tripet *et al.*, 2001 ; Dabiré *et al.*, 2013) et d'une baisse discrète de la fitness des hybrides (White *et al.*, 2010). Des études de génomique des populations (Lanzaro *et al.*, 1998 ; Lehmann *et al.*, 2003 ; Turner *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010) ont montré que la divergence entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* concerne environ 1% du génome. Des études plus poussées ont révélé (Turner *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010),

l'existence de trois régions génétiquement différenciées localisées près des centromères des chromosomes X, 2L et 3L. D'autres études suggèrent que la spéciation sympatrique des deux espèces impliquerait la divergence de ces régions (Caputo *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2008 ; Marsden *et al.*, 2011) appelées « îles de spéciation ». Ainsi, des études basées sur les SNPs divergents localisés dans ces trois îles de spéciations ont montré des niveaux variés d'hybridation et d'introgessions génétiques au sein des populations sympatriques des deux espèces (Lee *et al.*, 2013a ; Norris *et al.*, 2015). Dans ces études les auteurs ont rapporté aussi que le cas d'introgession le plus extrême s'est réalisé très récemment au Mali et au Burkina Faso avec une introgession adaptative de l'île de spéciation du chromosome 2L contenant les loci de la résistance aux pesticides du génome d'*An. gambiae* vers le génome d'*An. coluzzii* (Weetman *et al.*, 2012 ; Clarkson *et al.*, 2014 ; Norris *et al.*, 2015). Vue l'importance de la ségrégation spatiale des essaims dans l'accouplement positivement assortis observé chez les populations naturelles et sympatriques d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*, on peut s'attendre à ce que les gènes associés au comportement d'essaimage soient localisés au moins au sein d'une des îles de spéciation des chromosomes X, 2L et 3L. A l'exception d'une étude réalisée sur des souches de laboratoire (Aboagye-Antwi *et al.*, 2015), aucune investigation génomique basée sur le génotypage des SNPs n'a été réalisée pour déterminer l'association entre la ségrégation spatiale des essaims d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* et les îles de spéciation au sein des populations naturelles.

Plusieurs zones d'hybridation où le flux de gènes entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* est supposé être très élevé ont été découvertes le long de la côte ouest africaine (Caputo *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2008), suggérant soit un comportement sexuel différent ou une perte de la pression de sélection contre les hybrides (Caputo *et al.*, 2011 ; Marsden *et al.*, 2011 ; Weetman *et al.*, 2012). Ces zones d'hybridation pourraient également être dues à un phénomène récent lié aux changements de l'environnement comme le suggèrent certains auteurs (Coetzee *et al.*, 2013) ou alors qu'elles existaient depuis longtemps à des endroits complètement ignorés. Des études de génomique des populations ont posé l'hypothèse que les femelles *An. gambiae* pourraient plus opter à s'accoupler avec des mâles hétérospécifiques que les femelles *An. coluzzii* (Lee *et al.*, 2013a). Ceci pourrait être le résultat d'une très forte sélection spécifiquement plus importante contre les mâles hybrides issus de femelles *An. coluzzii* ; suggérant que les femelles *An. gambiae* seraient plus permissibles à des accouplements croisés (Lee *et al.*, 2013a). Une explication plausible pourrait ressortir du fait

que l'extrême variation saisonnière de l'abondance des deux espèces jumelles observée dans plusieurs sites des régions sahélienne et soudanienne pourrait interférer avec les processus clé de l'homogamie. Alors que les populations d'*An. coluzzii* réduisent leur reproduction pendant la saison sèche et estivent localement à une très faible densité, les populations d'*An. gambiae* diminuent en densité vers la fin de la saison des pluies et disparaissent complètement pendant le saison sèche (Yaro *et al.*, 2012 ; Lehmann *et al.*, 2014). Même si l'estivation d'*An. gambiae* dans les régions avoisinantes plus clémentes où la reproduction pourrait être continue reste encore ignorée, des études ont montré qu'*An. gambiae* réapparaît dans les populations en sympatrie longtemps après la résurgence d'*An. coluzzii* en début de la saison des pluies (Adamou *et al.*, 2011 ; Yaro *et al.*, 2012). Dépendant des conditions de l'environnement local telles que l'humidité relative de l'air ambiant et la pluviométrie, *An. gambiae* entre en compétition avec *An. coluzzii* et devient l'espèce dominante ou il reste minoritaire. Des études récentes réalisées sur la ségrégation spatiale des essaims entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* à l'Ouest du Burkina Faso ont permis de comprendre comment ceci pourrait affecter la dynamique des essaims elle-même. L'analyse d'un grand nombre d'essaims a révélé une forte corrélation entre le nombre de mâles et celui des couples et des femelles non couplées collectés dans les essaims (Diabaté *et al.*, 2009 ; Sawadogo *et al.*, 2014). Lorsqu'une espèce est sur-dominante, ses mâles occupent le plus grand nombre d'essaims à des densités plus fortes ; les mâles de l'espèce minoritaire peinent à trouver des mâles conspécifiques pour former et maintenir des essaims monospécifiques (Diabaté *et al.*, 2009 ; Sawadogo *et al.*, 2014). Ceci pourrait être à l'origine de la formation des essaims mixtes reportés dans un tel environnement (Diabaté *et al.*, 2006 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2014). Les deux études de terrain qui ont mis en évidence les accouplements interspécifiques entre les deux espèces jumelles par la détection des couples mixtes dans les essaims et/ou la détection du sperme hétérospécifique des mâles dans les spermathèques des femelles tendent aussi à supporter l'idée que les femelles *An. gambiae* seraient plus permissibles aux accouplements croisés que celles d'*An. coluzzii* (Tripet *et al.*, 2001 ; Dabiré *et al.*, 2013). Les résultats de terrain supportent ainsi l'idée que la sur-dominance des espèces pourrait créer des opportunités de formation des couples interspécifiques, soulevant des questions relatives au transfert effectif du sperme et à l'hybridation suivant ces événements des accouplements croisés. Jusqu'à nos jours, les conditions écologiques qui favorisent le modèle du flux de gènes décrit en Afrique de l'Ouest entre les populations d'*An. gambiae* et *An. coluzzii* restent encore peu connues.

Alors qu'aucune barrière post-zygotique intrinsèque n'a été trouvée dans les conditions de laboratoire (Diabaté *et al.*, 2007), des études précédentes ont montré que les larves d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* diffèrent dans leur capacité d'exploiter différents habitats larvaires (Diabaté *et al.*, 2005 ; 2008). *An. coluzzii* est plus adapté à des habitats larvaires permanents résultant principalement des activités humaines alors que les larves d'*An. gambiae* se développent mieux dans des habitats temporaires généralement dépendant des eaux de pluies (Lehmann & Diabaté, 2008 ; Diabaté *et al.*, 2008 ; Simard *et al.*, 2009 ; Gimonneau *et al.*, 2012a). Une différence fondamentale entre ces deux types d'habitat tient de la composition et de l'abondance des prédateurs de moustiques. Les gîtes larvaires à caractère permanent sont plus riches en prédateurs que les gîtes à caractère temporaire et, plusieurs études ont montré que *An. coluzzii* était mieux adapté à la prédation que *An. gambiae* (Diabaté *et al.*, 2008 ; Gimonneau *et al.*, 2010 ; 2012b ; Roux *et al.*, 2013). Malheureusement, jusqu'ici il manque des informations concernant l'impact direct de l'environnement parental des deux espèces sur la survie et la fitness des hybrides en milieu naturel.

Après échec de certaines campagnes de lâchers de mâles stériles plusieurs auteurs (Benedict & Robinson, 2003) ont suggéré des investigations poussées sur le comportement de reproduction des mâles de vecteurs (Ferguson *et al.*, 2005 ; Takken, 2005) afin d'optimiser leur élevage en masse au laboratoire pour obtenir des mâles de compétitivité sexuelle supérieure (Howell & Knols, 2009). Plusieurs études de terrain et de laboratoire ont été réalisées pour comprendre le comportement de reproduction des populations du complexe *An. gambiae* (Diabaté *et al.*, 2007 ; 2009 ; 2011 ; Assogba *et al.*, 2010 ; Sawadogo *et al.*, 2013a ; 2013b ; Diabaté & Tripet, 2015). Il en ressort que l'essentiel des activités de reproduction s'effectue dans les essaims où une forte compétition entre mâles pour des femelles est plus favorable aux mâles ayant certains critères sélectifs intrinsèques. Parmi ces critères, figurent la taille (Huho *et al.*, 2007), l'âge (Huho *et al.*, 2006 ; 2007 ; Sawadogo *et al.*, 2013b) et les réserves énergétiques (Huho *et al.*, 2007 ; Gilles *et al.*, 2011 ; Damiens *et al.*, 2012 ; Maïga *et al.*, 2012 ; 2014) des mâles. Les réserves nutritionnelles accumulées au cours du développement larvaire et à chaque repas sucré pendant la vie adulte sont des facteurs déterminants pour la survie et le succès reproducteur (Foster, 1995). Pour s'accoupler le mâle a besoin de voler. La dépense énergétique nécessaire pour ce vol provient des sucres et du glycogène issus des repas sucrés (Yuval *et al.*, 1994 ; Bargielowski *et al.*, 2012). Au regard de l'importance de ces sucres et de la taille dans la biologie de reproduction du moustique, il est

très surprenant que les questions relatives aux déterminants du succès reproducteurs des mâles restent largement inexplorés.

La présente thèse couvre les aspects fondamentaux des questions de spéciation au sein du complexe *An. gambiae* de même que la biologie et l'écologie de sa reproduction. Elle est subdivisée en 3 grandes parties :

- identification des facteurs génétiques et écologiques de l'isolement reproductif précopulatoire entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*,
- évaluation des mécanismes d'isolement reproductif post-zygotique extrinsèque,
- étude des paramètres fondamentaux qui modulent la performance sexuelle des mâles sur le terrain.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Revue bibliographique

I.1. Les vecteurs du paludisme en Afrique

Les vecteurs du paludisme sont des moustiques appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous famille des *Anophelinae*. Il existe environ 500 espèces d'anophèle décrites, mais seulement une soixantaine est impliquée dans la transmission du *Plasmodium* humain dans le monde (Harbach, 2004) dont une vingtaine en Afrique sub-saharienne (Fontenille *et al.*, 2005). Trois espèces du complexe *An. gambiae* en l'occurrence *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* et une espèce du groupe *funestus*, en l'occurrence *An. funestus* s.s. constituent les vecteurs majeurs du paludisme en Afrique (Mouchet *et al.*, 1993 ; Fontenille & Simard, 2004 ; Coetzee *et al.*, 2013). *An. funestus* s.s. a une très large diffusion en Afrique, allant du Nord du Soudan au Transvaal et des côtes atlantique et indienne d'Ouest en Est. *An. funestus* colonise des gîtes permanents ou semi-permanents avec une végétation émergente dressée ou flottante. Ceci offre à ses populations une dynamique particulière surtout dans les régions où les gîtes dépendent des eaux de pluies. En effet, en zone de savane, sa densité commence à s'accroître en milieu de saison des pluies et atteint un pic vers la fin de la saison des pluies et en début de la saison sèche (Gillies & De Meillon, 1968 ; Dabiré *et al.*, 2007). Il prolonge ainsi l'action des espèces du complexe *An. gambiae* dans la transmission du paludisme après la saison des pluies (Cavalié & Mouchet, 1961). Trois autres vecteurs assurent souvent, dans une moindre mesure, la transmission du paludisme ; il s'agit d'*An. nili* en Afrique de l'Ouest et du centre, *An. moucheti* dans les zones de forêt d'Afrique Centrale et *An. pharoensis* dans les zones sèches d'Afrique orientale et d'Afrique de l'Ouest (Fontenille *et al.*, 2005). *An. nili* est une espèce d'eau courante bien oxygénée liée aux cours d'eau permanents ou sub-permanents. Ses larves se tiennent à l'ombre, dans la végétation aquatique et les débris flottants. Cette espèce est rencontrée aussi bien en zone de forêt qu'en zone de savane (Hamon & Mouchet, 1961). Elle peut être localement un vecteur dominant (Carnevale *et al.*, 1992). Les adultes piquent préférentiellement l'homme et leur endophilie très variable semble être réduite dans les savanes soudaniennes (Hamon & Mouchet, 1961). *An. pharoensis* dont les gîtes larvaires préférentiels sont des vastes marais à végétation dense et des rizières est localement abondant dans de nombreuses régions d'Afrique. Les larves supportent une légère salinité (Hamon *et al.*, 1956 ; Hamon & Coz, 1966). Les adultes piquent l'homme à l'intérieur et à l'extérieur des habitations humaines. Le maximum d'activité intervient dès le crépuscule et se prolonge pendant la première moitié de la nuit. *An. moucheti* est vecteur du paludisme

dans le bloc forestier centrafricain. Ce dernier a tendance à se réduire en superficie mais *An. moucheti* persiste dans les galeries forestières quelquefois assez éloignées de la forêt. Ses gîtes larvaires se situent dans les rivières de toutes tailles à cours lent et encombrées par la végétation flottante. Les femelles adultes de cette espèce sont très anthropophiles et très endophiles (Mouchet & Gariou, 1957). L'importance d'*An. pharoensis* comme vecteur du paludisme reste toujours négligeable en Afrique tropicale par rapport à *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* (Hamon & Mouchet, 1961 ; Gillies & De Meillon, 1968).

I.1.1. Le complexe *An. gambiae*

I.1.1.1. La cytogénétique et les formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s.

Le génome d'*An. gambiae* s.l. est organisé en trois chromosomes : deux autosomes sub-métacentriques et un chromosome sexuel X/Y, avec des mâles hétérogames. Les autosomes sont divisés en deux bras par le centromère. Le plus long bras est défini par convention comme le bras droit et le plus court est dit gauche. Examinés au microscope à contraste de phase, les chromosomes polythènes montrent une succession de bandes claires et sombres qui servent de marques pour la détermination des caryotypes (Coluzzi, 1966 ; Coluzzi & Sabatini, 1967 ; 1968 ; 1969). Une série d'études sur le polymorphisme chromosomique au sein du complexe *An. gambiae* a montré une distribution non aléatoire des inversions chromosomiques paracentriques plus fréquentes sur le chromosome 2R chez les populations d'*An. gambiae* s.l. (Coluzzi *et al.*, 1979 ; 2002). Il est connu que les inversions chromosomiques représentent des complexes de gènes coadaptés qui pourraient permettre aux individus qui les portent d'occuper différentes niches écologiques. La distribution non aléatoire de ces inversions le long des chromosomes (Pombi *et al.*, 2008) et la distribution géographique de la fréquence des inversions suggèrent que certaines inversions sont maintenues par la sélection et permettent aux différentes populations du complexe *An. gambiae* de survivre et d'exploiter une très grande variété d'habitats (Touré *et al.*, 1998 ; Coluzzi *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2013b). Un des exemples les plus illustres est la forte association des inversions chromosomiques 2La et 2Rb à l'aridité dont les fréquences sont plus élevées en zones arides comparées aux zones humides. Ces fréquences restent également plus élevées pendant la saison sèche dans des sites caractérisés par un contraste de saisons sèche et pluvieuse distinctes (Touré *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2013b ; Cheng *et al.*, 2012). Ces études chromosomiques ont permis de définir, sur la base de compatibilité reproductrice entre

populations avec des inversions fixes et distinctes, les différentes espèces du complexe *An. gambiae* (Coluzzi, 1966 ; Coluzzi & Sabatini, 1967 ; 1968 ; 1969 ; Davidson & Hunt, 1973). Par exemple, l'inversion chromosomique Xag a été utilisée comme un marqueur diagnostic pour distinguer *An. gambiae* s.s. des autres espèces jumelles du complexe.

Au sein d'*An. gambiae* s.s. cinq formes chromosomiques ont été définies sur la base de la configuration de cinq inversions chromosomiques paracentriques observées sur le chromosome 2R et une inversion sur le chromosome 2L. Ces formes chromosomiques ont été décrites et nomées avec une nomenclature non linnéenne : « Mopti », « Savanna », « Bamako », « Bissau » et « Forêt » en fonction des régions géographiques où elles ont été collectées la première fois et selon qu'elles soient associées à un type d'habitat particulier (Coluzzi *et al.*, 1979 ; 1985 ; Bryan *et al.*, 1982 ; Coluzzi, 1984). La forme « Savanna » a la plus vaste aire de distribution en Afrique sub-saharienne. La forme « Mopti » prédomine dans les habitats des zones arides de l'Afrique de l'Ouest. Elle est présente au Mali, en Guinée, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso. Du fait qu'elle est associée à des plaines humides et des zones irriguées, la forme « Mopti » se reproduit d'une façon continue même pendant la saison sèche. La forme « Forêt » est présente dans les habitats en zones humides d'Afrique. La forme « Bamako » est rencontrée au Mali et dans la partie Nord de la Guinée dans les habitats de la haute vallée du fleuve Niger. La forme « Bissau » est restreinte en Afrique de l'Ouest et elle est endémique en Gambie (Black & Lanzaro, 2001 ; della Torre *et al.*, 2002). Trois de ces formes chromosomiques en l'occurrence « Bamako », « Savanna » et « Mopti » coexistent dans le temps et dans l'espace au sein des populations d'*An. gambiae* s.s. du Mali (Coluzzi *et al.*, 1985 ; Touré *et al.*, 1998). Bien que des croisements expérimentaux aient révélé une compatibilité génétique entre ces trois formes cytogénétiques, les données chromosomiques sur des populations naturelles supportent une différenciation génétique entre elles, suggérant l'existence des mécanismes d'isolement reproductif précopulatoires intrinsèques (Touré *et al.*, 1994 ; 1998). Des études de terrain ont montré une faible fréquence des hybrides Mopti/Savanna ou Bamako/Savanna et un isolement reproductif complet entre les formes « Bamako » et « Mopti » (Touré *et al.*, 1983). Cependant, aucun isolement reproductif post-zygotique n'a été trouvé entre « Bamako » et « Savanna » dans les conditions de laboratoire (Di Deco *et al.*, 1980). Lanzaro *et al.* (1998) ont conduit une étude basée sur la distribution de 21 loci microsatellites sur le génome, examinant ainsi la différenciation génétique entre les formes chromosomiques « Bamako » et « Mopti » au Mali. Cette étude a, a priori révélé une

forte différenciation génétique entre *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* utilisés comme des témoins positifs. Au sein d'*An. gambiae* s.s., différentes structures génétiques dépendant de la position génomique des microsatellites ont été observées. Le flux de gènes était élevé pour quelques régions du génome tout en restant à des niveaux relativement faibles pour d'autres. Ce modèle de divergence, avec une distribution non aléatoire des gènes sur le génome a été décrit plus tard comme une « architecture en mosaïque du génome » dans l'étude réalisée par Wang-Sattler *et al.* (2007). Ce concept a été validé plus tard par des analyses basées sur une forte résolution du génome entier conduisant à la reconnaissance des « îles de spéciation » sur le génome d'*An. gambiae* s.s. (Turner *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010).

Globalement, l'utilisation du concept des formes chromosomiques pour définir des populations génétiquement discrètes pose un problème, car les inversions qui les définissent sont chevauchantes par endroit. Ce qui a créé une certaine ambiguïté dans l'assignation des individus à des formes, réduisant ainsi l'utilité du concept de forme chromosomique à définir des limites entre populations. Il a été démontré par la suite que l'isolement reproductif entre certaines formes était indépendant des inversions chromosomiques (Touré *et al.*, 1998 ; della Torre *et al.*, 2002 ; Lehmann *et al.*, 2003) ; d'où l'intérêt de rechercher d'autres marqueurs de différenciation avec des analyses moléculaires (Favia *et al.*, 1997).

1.1.1.2. Les formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s.

La disponibilité des outils moléculaires au cours des 15 dernières années a permis de réaliser des avancées notables sur la problématique de la différenciation génétique au sein d'*An. gambiae* s.l. Les différences génétiques à l'extérieur des réarrangements du chromosome 2 ont été trouvées dans des séquences non codantes de l'ADN ribosomal (ADNr). Une PCR diagnostic a été mise au point pour différencier la forme chromosomique « Mopti » des formes chromosomiques « Savanna » et « Bamako » basée sur une substitution d'une paire de bases à la 540^{ème} position nucléotidique sur la région 28S de l'ADNr. Les individus de la forme « Mopti » sont caractérisés par un génotype C/C et ceux des formes « Bamako » et « Savanna » par un génotype T/T (Genebank, numéro d'accès AF470112-6) (Favia *et al.*, 1997). Provisoirement les individus porteurs du génotype C/C ont été regroupés sous l'appellation « forme moléculaire M » et ceux qui portent le génotype T/T « forme moléculaire S ». La forme moléculaire M et la forme chromosomique « Mopti » correspondent parfaitement au Mali et au Burkina Faso. Les formes chromosomiques

« Bamako » et « Savanna » ne pouvant pas être distinguées l'une de l'autre appartiennent à la forme moléculaire S. Cependant, la correspondance entre les formes moléculaires et les formes chromosomiques est quasiment inexistante dans d'autres localités en Afrique. Par exemple dans la partie Ouest du Sénégal et de la Gambie, l'association entre la forme chromosomique « Savanna » et la forme moléculaire S n'est pas maintenue (della Torre *et al.*, 2005). La forme « Forêt » regroupe des individus des deux formes moléculaires M et S. Les marqueurs moléculaires permettant de mieux expliquer les entités reproductives distinctes au sein d'*An. gambiae* s.s., le concept des formes chromosomiques est aujourd'hui de moins en moins utilisé que celui des formes moléculaires pour l'identification des sous-populations discrètes d'*An. gambiae* s.s.

Les formes moléculaires M et S vivent en sympatrie dans de nombreux sites en Afrique de l'Ouest et du Centre où des niveaux très élevés d'isolement reproductif ont été typiquement observés entre les deux formes (della Torre *et al.*, 2005). Des barrières reproductives précopulatoires existent entre M et S (Diabaté *et al.*, 2009 ; Pennetier *et al.*, 2010 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2013a ; 2014). Tout récemment, Reidenbach *et al.* (2012) analysant près de 400000 SNPs à travers les génomes des paires d'échantillons de populations de formes M et S du Mali, du Burkina Faso et du Cameroun, ont démontré que les deux taxa ont co-évolué d'une façon indépendante. Cette évidence qui relève de la génomique des populations montre que M et S sont des groupes taxonomiques exclusifs (De Queiroz, 2007) dans leur aire de distribution géographique. Ce qui justifie en partie le choix de Coetzee *et al.*, (2013) d'élever les formes moléculaires M et S au rang d'espèces. En accord avec le code de la nomenclature zoologique, la forme moléculaire M est nommée *An. coluzzii* en l'honneur du Professeur Mario COLUZZI qui a consacré une majeure partie de sa vie à l'étude de ce complexe en Afrique de l'Ouest. La forme moléculaire S retient le nom typique d'*An. gambiae*. Une autre division d'*An. coluzzii* est possible tel qu'il a été souligné au Cameroun et au Mali où des différences de la structuration génétique des populations de la forme moléculaire M ont été rapportées (Wondji *et al.*, 2002 ; Simard *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2009 ; Costantini *et al.*, 2009 ; Slotman *et al.*, 2007). En outre, une sous-population cryptique d'*An. gambiae* s.s. dont les individus ne correspondent ni à la forme moléculaire M ni à la forme S a été décrite dans une étude réalisée au Burkina Faso et requiert aussi d'autres investigations taxonomiques (Riehle *et al.*, 2011).

I.1.2. Isolement reproductif avec flux de gènes entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*

An. coluzzii et *An. gambiae*, deux espèces du complexe *An. gambiae* sont en cours de spéciation et peuvent être un modèle idéal pour étudier l'architecture génomique de l'isolement reproductif précopulatoire indépendant des processus de spéciation post-copulatoires (Aboagye-Antwi *et al.*, 2015). Les deux espèces jumelles s'hybrident librement en laboratoire et leur descendance est viable et fertile (Tripet *et al.*, 2005 ; Diabaté *et al.*, 2007). En l'absence de barrières d'isolement reproductif post-zygotique intrinsèque, leurs traits génétiques spécifiques sont supposés se maintenir du fait des effets combinés d'un accouplement positivement assorti (Tripet *et al.*, 2001 ; Dabiré *et al.*, 2013) et d'une baisse discrète de la fitness des hybrides (White *et al.*, 2010). Ces résultats sont supportés par des études de génomique des populations basées d'abord, sur des marqueurs microsatellites (Lanzaro *et al.*, 1998 ; Lehmann *et al.*, 2003) et ensuite sur des SNPs (Turner *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010). Ainsi est décrit un modèle de différenciation génétique selon lequel la divergence entre les génomes d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* est restreinte à trois régions discrètes des chromosomes X, 2L, 3L et à une autre région plus petite du chromosome 2R. Au total les régions divergentes couvrent moins de 2,8Mb correspondant environ à 1% du génome dont la plus grande partie est homogène du fait d'un flux de gènes qui n'affecte pas ces régions protégées de la recombinaison (Turner *et al.*, 2005). Des études plus poussées ont révélé (Turner *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010), l'existence de trois régions génétiquement différenciées localisées près des centromères des chromosomes X, 2L et 3L appelées « îles de spéciation » (Turner *et al.*, 2010). Aujourd'hui ces trois régions sont les seules détectées (Marsden *et al.*, 2011 ; Weetman *et al.*, 2012 ; Reidenbach *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2013a ; Norris *et al.*, 2015) et supposées contenir des gènes ou des complexes de gènes de spéciation protégés du flux de gènes par une suppression de la recombinaison (Turner *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010). D'autres études suggèrent que la spéciation sympatrique des deux espèces impliquerait la divergence de ces régions même dans les zones d'hybridation de la côte ouest africaine (Caputo *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2008 ; Marsden *et al.*, 2011). Le développement des tests de divergence par le biais des SNPs localisés dans les trois « îles de spéciation » (Lee *et al.*, 2014) a suscité de nouvelles études très récemment. Ainsi, des études basées sur les SNPs divergents des « îles de spéciation » ont montré des niveaux variés d'hybridation et d'introgessions génétiques au sein des populations sympatriques des deux espèces (Lee *et al.*, 2013a ; Norris *et al.*, 2015). Ces études ont rapporté aussi que le cas d'introgession le plus

extrême s'est effectué très récemment au Mali et au Burkina Faso avec une introgression adaptative de l'île de spéciation du chromosome 2L contenant les loci de la résistance aux pesticides du génome d'*An. gambiae* vers le génome d'*An. coluzzii* (Weetman *et al.*, 2012 ; Clarkson *et al.*, 2014 ; Norris *et al.*, 2015).

I.1.2.1. Isolement reproductif précopulatoire

Plusieurs mécanismes d'isolement reproductif précopulatoire entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont été investigués ces dernières années. Bien que la fréquence de battement des ailes et l'émission de phéromones à distance ou de contact aient été identifiées comme des mécanismes plausibles de reconnaissance sexuelle intraspécifique (Pennetier *et al.*, 2010), la ségrégation spatiale entre les essaims des deux espèces reste le mécanisme le plus documenté en milieu naturel à ce jour (Diabaté *et al.*, 2009 ; 2011 ; Diabaté & Tripet, 2015). Malgré l'existence de ces barrières précopulatoires, il faut noter que cette ségrégation spatiale des essaims n'est pas parfaite car des essaims mixtes ont été rencontrés (Diabaté *et al.*, 2006 ; Sawadogo *et al.*, 2014 ; Dabiré *et al.*, 2013). L'accouplement positivement assorti a été mis en évidence récemment entre mâles et femelles des deux espèces capturées *in copula* dans des essaims mixtes (Dabiré *et al.*, 2013). A ce niveau aussi des inséminations croisées (Tripet *et al.*, 2001) entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont été mis en évidence occasionnellement et cela semble suffisant pour maintenir un flux de gènes entre les deux espèces (Tripet *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2013a). En somme la ségrégation spatiale des essaims d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* doublée de l'accouplement positivement assorti ont été bien établis comme barrières d'isolement reproductives précopulatoires (Tripet *et al.*, 2001 ; Diabaté *et al.*, 2009 ; 2011 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Diabaté & Tripet, 2015).

I.1.2.2. Isolement reproductif post-zygotique

Des études précédentes sur la spéciation écologique ont montré que les larves d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* diffèrent dans leur faculté d'exploiter différents habitats larvaires dans la nature (Diabaté *et al.*, 2005 ; 2008) alors qu'aucune barrière post-zygotique intrinsèque n'a été trouvée dans les conditions de laboratoire (Diabaté *et al.*, 2007). *An. coluzzii* est plus adapté à des habitats larvaires permanents résultant principalement des activités humaines alors que les larves d'*An. gambiae* se développent mieux dans des habitats temporaires généralement dépendant des eaux de pluies (Lehmann & Diabaté, 2008 ; Diabaté *et al.*, 2008 ;

Simard *et al.*, 2009 ; Gimonneau *et al.*, 2010 ; 2012a). Une différence fondamentale entre ces deux types d'habitat tient de la composition et de l'abondance des prédateurs de moustiques. Les gîtes larvaires à caractère permanent sont plus riches en prédateurs que les gîtes à caractère temporaire. Plusieurs études ont montré qu'*An. coluzzii* était mieux adapté à la prédation que *An. gambiae* (Diabaté *et al.*, 2008 ; Gimonneau *et al.*, 2012b ; Roux *et al.*, 2013). En outre, des taux d'hybridation inattendus et relativement élevés ont été rapportés par endroit le long de la côte ouest africaine (Caputo *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2008 ; Nwakanma *et al.*, 2013), suggérant soit une différence de comportement de reproduction ou une perte de la pression de sélection exercée sur les hybrides dans cette partie de l'Afrique. Malheureusement, jusqu'à nos jours il manque des informations concernant l'impact direct de l'environnement parental des deux espèces sur la survie et la fitness des hybrides en milieu naturel.

I.1.3. Distribution géographique des espèces du complexe *An. gambiae*

La taxonomie divise présentement le complexe *An. gambiae* en neuf espèces morphologiquement identiques (Coetzee *et al.*, 2013). Il s'agit d'*An. gambiae* (Giles, 1902), *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson sp. n., *An. arabiensis* (Patton, 1904), *An. quadriannulatus* (Theobald, 1911), *An. amharicus* (Hunt, 1998), *An. bwambae* (White, 1985), *An. melas* (Theobald, 1903), *An. merus* (Doenitz, 1902) et *An. comorensis* (Brunhes, 1997). En effet, des évidences concluantes ont été établies par Hunt *et al.* (1998) pour la distinction spécifique entre *An. quadriannulatus* A et *An. quadriannulatus* B rencontrés respectivement en Afrique du Sud et en Ethiopie. Des études de croisement entre ces deux entités ont montré une stérilité des mâles hybrides. Ainsi *An. quadriannulatus* B est désormais nommé *An. amharicus* (Coetzee *et al.*, 2013).

An. gambiae, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* sont les espèces du complexe les plus importantes en Afrique tropicale tant par leur abondance que par leur rôle dans la transmission du paludisme. Elles ont une grande capacité d'adaptation et elles présentent les plus vastes aires de répartition, de la limite nord des savanes boisées à la forêt équatoriale et d'Est en Ouest du continent (Coetzee *et al.*, 2000). D'une manière générale, *An. gambiae* et *An. coluzzii* dominent en zone de forêt et de savane humide tandis qu'*An. arabiensis* est avantagé dans les savanes sèches et les steppes (Lemasson *et al.*, 1997 ; Coetzee *et al.*, 2000 ; Dia *et al.*, 2003). Comparé à *An. coluzzii*, *An. gambiae* a une plus large distribution. Elle est

présente dans toute la région d'Afrique sub-saharienne alors qu'*An. coluzzii* est plus ou moins restreinte en Afrique de l'Ouest et une partie de l'Afrique Centrale. A l'exception d'un site localisé dans le nord du Zimbabwe (Masendu *et al.*, 2004), *An. coluzzii* est pratiquement absent en Afrique de l'Est (della Torre *et al.*, 2005). *Anopheles bwambae* joue un rôle mineur dans la transmission du paludisme. Il n'est connu uniquement que dans la vallée de Semliki au Sud du lac Albert situé à l'Ouest de l'Ouganda où il a été découvert pour la première fois par Hadow (1945). *An. quadriannulatus* et *An. amharicus* sont principalement zoophiles et ne jouent aucun rôle dans la transmission du paludisme. *An. melas* n'est connu que de la côte occidentale, depuis le Sénégal jusqu'en Angola (Coetzee *et al.*, 2000). *An. merus* longe les rives de l'Océan Indien, de la Somalie jusqu'au Natal et se retrouve à Madagascar et dans les îles avoisinantes (Chauvet *et al.*, 1968). Enfin, *An. comorensis* est présent dans l'île du Grand Comores dans l'Océan indien (Figure 1).

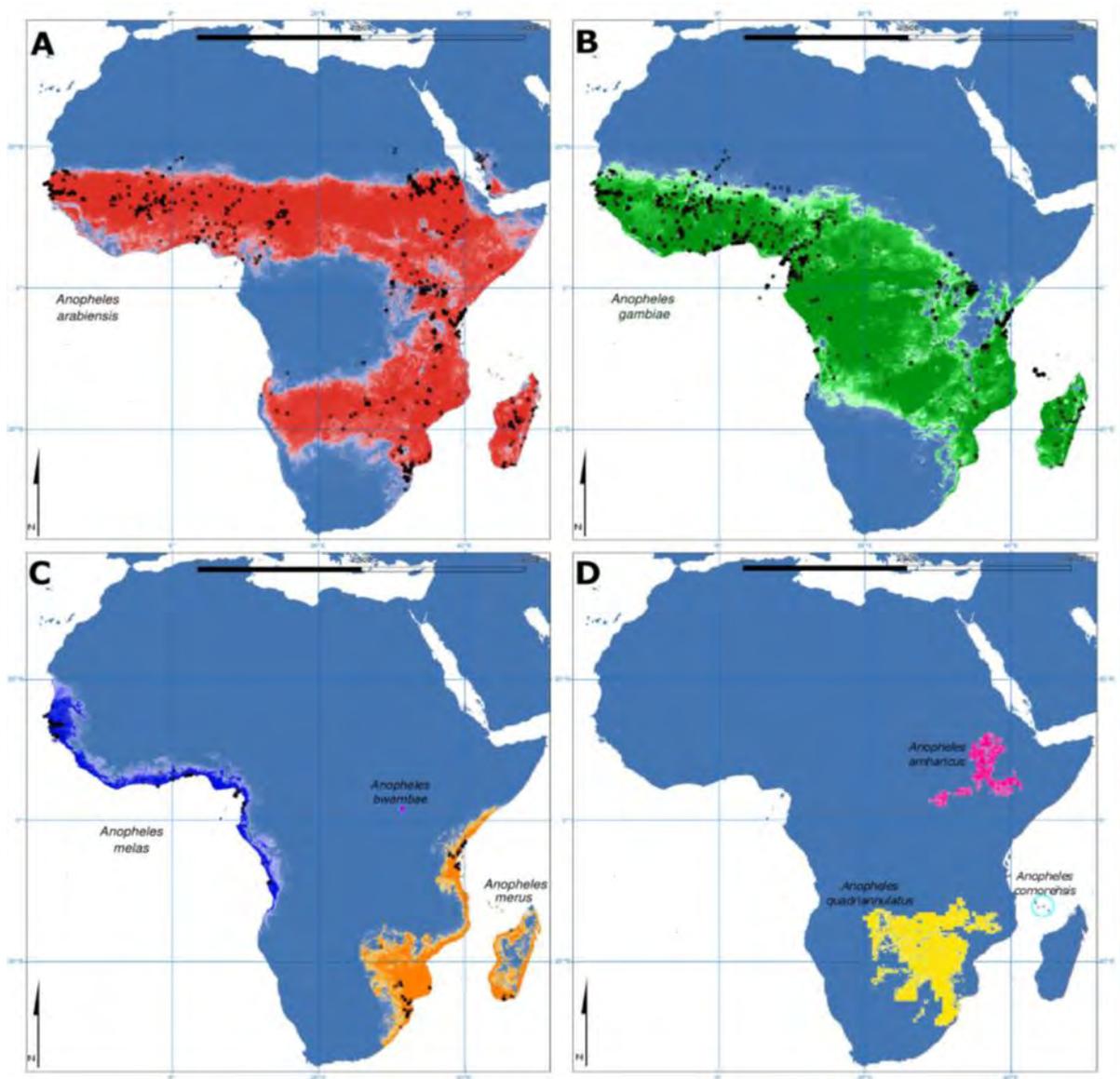


Figure 1: Distribution géographique des espèces du complexe *An. gambiae*. A: *An. arabiensis* (rouge) ; B: *An. gambiae* et *An. coluzzii* (verte) ; C: *An. melas* (bleue) ; *An. bwambae* (turquoise) ; *An. merus* (orange) ; D: *An. quadriannulatus* (jaune) ; *An. amharicus* (rose) et *An. comorensis* (cercle bleu clair) (Lanzaro *et al.*, 2013)

I.2. Cycle de développement des anophèles

Les anophèles sont des insectes holométaboles dont le développement se déroule en deux phases : une phase aquatique ou pré-imaginale avec les stades œuf, larve et nymphe et une phase aérienne ou imaginale avec le stade adulte.

I.2.1. La phase aquatique

Une femelle d'anophèle pond entre 40 et 100 œufs fécondés à la surface de l'eau. Ces œufs mesurent moins d'1 mm de long et sont munis chacun de deux flotteurs latéraux remplis d'air, leur permettant de rester en surface durant l'embryogénèse. L'œuf éclot au bout de 24 à 48h en fonction notamment de la température (Holstein, 1953) et donne naissance à une larve qui se maintient en position horizontale juste en dessous de la surface de l'eau. Le développement larvaire s'effectue en quatre stades entrecoupés de trois mues successives. La larve d'*An. gambiae* s.l. mesure environ 1 mm de long au premier stade appelé L1 et 5 mm au quatrième appelé L4 et comprend trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen.

A la fin du quatrième stade (L4) la larve mue pour une dernière fois et donne une nymphe. Le stade nymphal dure moins de 48 heures et correspond à la métamorphose qui est une transformation profonde de l'organisme permettant la mise en place des organes nécessaires à la vie aérienne de l'adulte. La phase aquatique des anophèles peut durer d'une à trois semaines en zone tropicale en fonction de l'espèce, de la température de l'eau, de la densité larvaire et de la quantité de nourriture disponible.

I.2.2. La phase aérienne

A terme, la nymphe s'immobilise à la surface de l'eau, une fente dorsale du tégument de la nymphe suivant une ligne longitudinale donne une ouverture par laquelle le moustique adulte se dégage. L'anophèle adulte mâle ou femelle qui vient d'émerger reste immobile pendant 24h au moins le temps que sa cuticule sèche et que ses ailes se déploient avant de s'envoler pour la première fois. L'émergence représente une phase délicate dans la vie de l'insecte en raison d'une forte mortalité par noyade. Le corps de l'adulte comprend trois parties: la tête, le thorax et l'abdomen. Une observation morphologique des adultes permet de différencier les mâles aux antennes plumeuses des femelles aux antennes glabres qui adoptent différents comportements trophiques. L'adulte *An. gambiae* s.l. vit en moyenne 3 à 4

semaines mais des études portant sur les questions d'estivation des moustiques ont permis la recapture d'une femelle 7 mois après qu'elle a été marquée et lâchée dans la nature (Lehmann *et al.*, 2010).

I.2.2.1. Le comportement trophique des anophèles

De nombreuses études portant sur le comportement trophique chez les anophèles renvoient au caractère hématophage des femelles contrairement aux mâles qui ont fait l'objet de peu d'études. Les réserves nutritives accumulées pendant la phase aquatique sont très faibles chez l'anophèle adulte (Fernandes & Briegel, 2005). Le jus sucré recherché dès l'émergence (Foster & Takken, 2004) apporte les ressources énergétiques indispensables aux premiers vols et à l'accouplement supposé survenir chez la femelle avant la recherche de l'hôte (Foster, 1995 ; Gary & Foster, 2006). Après accouplement, la femelle en général va à la recherche d'un repas sanguin dont elle a besoin pour la maturation de ses œufs. Le cycle gonotrophique dure en moyenne 3 jours et la femelle cherche un plan d'eau pour y pondre ses œufs et repart de nouveau à la recherche d'un repas sanguin. La survie des mâles dépend du sucre végétal qui constitue leur unique source de nourriture (Foster, 1995). Ils peuvent l'obtenir à partir de différentes sources naturelles (Yuval, 1992). Les substrats les plus généralement utilisés sont les nectars floraux, la sève, le miellat des pucerons, les fruits et feuilles endommagés ou en décomposition et les exsudats et détritiques (Foster, 1995). Quelques études ont mis en évidence l'existence de préférences trophiques chez certaines espèces de moustiques pour certaines plantes (Manda *et al.*, 2007 ; Gouagna *et al.*, 2010). C'est probablement la disponibilité dans l'environnement mais aussi et surtout la qualité du substrat prélevé par le moustique qui va orienter le choix vers la source de sucre préférée. Le vol est une activité importante nécessaire à l'essaimage et à l'accouplement et cette activité est assurée grâce aux sucres ou glycogène dérivé du sucrose ou de ses composés fructose et glucose (Foster, 1995).

I.2.2.2. Le comportement reproductif des anophèles

La recherche du partenaire sexuel chez *An. gambiae* s.l. se fait au sein des essaims. Les mâles essaiment au crépuscule dans des endroits bien spécifiques. Les femelles joignent à compte-gouttes ces essaims à la recherche des partenaires sexuels avec qui elles s'accouplent. L'heure, la hauteur des essaims et le marqueur d'essaimage au sol peuvent varier d'une

espèce à une autre. Dans le cas spécifique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*, il a été montré que la ségrégation spatiale lors de l'essaimage est un des facteurs majeurs de l'isolement reproductif précopulatoire entre les deux espèces (Diabaté *et al.*, 2009 ; 2011). Les femelles d'anophèles ne s'accouplent qu'une seule fois dans la vie en général, alors que les mâles le font régulièrement tout au long de leur vie. Les femelles possèdent un organe de stockage du sperme, la spermathèque, où les spermatozoïdes restent viables et conservent leur pouvoir fécondant durant toute la vie du moustique (Bruce-Chwatt *et al.*, 1985). Chez de nombreuses familles d'insecte, les protéines produites par les glandes accessoires des mâles et le sperme stimulent l'ovulation et la ponte (Leahy & Craig 1965 ; Yeh & Klowden, 1990 ; Klowden & Chambers, 1991). Chez les anophèles, comme de nombreuses espèces de moustiques, le mâle reproducteur transfère, via son liquide séminal, des substances produites par ses glandes sexuelles annexes qui inhibent la réceptivité sexuelle des femelles. Ainsi, quelques heures après l'accouplement, la femelle devient non-réceptive pour un autre mâle (Craig, 1967 ; Klowden, 1999 ; Bryan, 1968).

I.3. La lutte antivectorielle

La lutte contre les vecteurs de maladies fait appel à des stratégies très diverses en raison de la multiplicité des espèces qui affichent des comportements variables. De nombreuses méthodes sont utilisées pour lutter contre les moustiques, mais toutes n'ont pas le même impact. L'efficacité et la spécificité d'une stratégie tiennent compte à la fois de la bio-écologie, du comportement des espèces cibles et du contexte épidémiologique de la transmission. En fonction de la méthode et la stratégie adoptées, cette lutte peut s'appliquer à différents niveaux.

I.3.1. La lutte anti-larvaire

Cette méthode est difficile à mettre en pratique pour le cas du paludisme. Elle n'est envisageable que lorsque les principaux gîtes larvaires sont en nombre limités, repérables et facilement accessibles. Toutefois ces dernières années, on assiste à un regain d'intérêt pour cette approche. Elle est essentiellement appliquée présentement en Afrique de l'Est et les insecticides d'origine biologique tels que les toxines des bactéries (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti)) et les hormones juvéniles (pyriproxyfen) sont en cours de tests (Lee *et al.*, 2005 ; Darriet *et al.*, 2010). À cela s'ajoutent des méthodes alternatives qui ont une efficacité

circonscrite et nécessitent une bonne connaissance de la biologie et du comportement de l'insecte dans son milieu (poissons larvivores, champignons) (Sinègre *et al.*, 1993 ; Baldet, 1995). Les mesures d'assainissement avec élimination des gîtes larvaires s'appliquent surtout aux genres *Culex* et *Aedes* en milieu urbain, mais les municipalités manquent assez souvent de moyens et on note le plus souvent une faible participation des communautés.

I.3.2. La lutte contre les stades adultes

Cette méthode s'applique principalement à trois niveaux : la pulvérisation intradomiciliaire (PID), la protection individuelle ou collective et la lutte génétique. La PID avec un insecticide rémanent a été longtemps la principale méthode de lutte antivectorielle en matière de paludisme, car bien adaptée aux vecteurs qui ont, pour la plupart, un comportement endophile. Sous l'impulsion des bailleurs de fonds internationaux, la PID s'est intensifiée ces dernières années essentiellement en Afrique de l'Est, du Sud et dans une moindre mesure en Afrique de l'Ouest (Mabaso *et al.*, 2004). A cela s'ajoute depuis plus d'une décennie maintenant, l'utilisation intensive des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII). Plusieurs programmes de distribution massive des moustiquaires à travers l'Afrique et l'Asie sont en cours ; l'objectif global étant d'assurer une couverture universelle à commencer par les couches les plus vulnérables de nos sociétés (Eisele *et al.*, 2009 ; Noor *et al.*, 2009 ; Smith *et al.*, 2009). Ces moustiquaires autrefois imprégnées à la main, le sont maintenant depuis l'usine et conservent ainsi suffisamment de matière active pendant toute la durée de vie de la moustiquaire (~5 ans). Hélas des problèmes de résistance aux molécules insecticides utilisées pour l'imprégnation, les pyréthriinoïdes, sont constatés à travers l'Afrique chez la plupart des espèces vectrices du paludisme (Ranson *et al.*, 2011 ; Cissé *et al.*, 2015). Les mécanismes de résistance développés aussi sont multiples et incluent la modification de la cible de l'insecticide, en l'occurrence ici la mutation *kdr*, de même que de multiples mécanismes de détoxification dont essentiellement les cytochromes P450 (Wondji *et al.*, 2009). La résistance aux autres classes d'insecticides utilisées en pulvérisation intradomiciliaire est aussi observée (Ranson *et al.*, 2009 ; Mutunga *et al.*, 2015 ; Cissé *et al.*, 2015). Outre le problème de résistance aux pyréthriinoïdes, le taux d'utilisation des moustiquaires pour de multiples raisons, reste assez souvent faible (Doudou *et al.*, 2006 ; Toé *et al.*, 2009) et on assiste aussi à une résistance comportementale dont les moustiques usent pour éviter le contact avec la moustiquaire imprégnée. Ils piquent à l'intérieur des maisons et sortent se reposer à l'extérieur avant d'avoir absorbé une dose létale de l'insecticide, ou ils piquent simplement à

l'extérieur des maisons et évitent ainsi tout contact avec les moustiquaires (Asidi *et al.*, 2005 ; Gatton *et al.*, 2013). Tous ces problèmes constituent de sérieuses menaces au devenir de la lutte antivectorielle. Par conséquent l'idée de développer des approches additionnelles et innovantes s'impose pour l'élimination ou l'éradication du paludisme. Cela explique l'intérêt renouvelé de l'utilisation de lâchers de mâles stériles (Benedict & Robinson, 2003) et l'expansion rapide des recherches focalisées sur les approches génétiques de la lutte antivectorielle (Alphey *et al.*, 2002).

I.3.2.1. Lutte génétique contre les vecteurs du paludisme

La lutte génétique constitue une alternative innovante dans le contrôle des vecteurs mais son succès reste encore très limité du fait de la faible compétitivité sexuelle des mâles de moustiques génétiquement modifiés ou stériles. Pour l'instant, cette méthode est encore balbutiante même si de nombreux programmes sont en cours d'expérimentation (Oliva *et al.*, 2011 ; 2013 ; Maïga *et al.*, 2014 ; Gilles *et al.*, 2014). D'une façon générale, deux approches de contrôle génétique ont été proposées. Il s'agit de la stratégie de suppression et de la stratégie de remplacement des populations de moustiques.

I.3.2.1.1. La stratégie de suppression par la Technique de l'Insecte Stérile (TIS)

Cette méthode repose sur la stérilisation et le lâcher des mâles de moustiques sur le terrain. Ces mâles en s'accouplant avec des femelles sauvages, les rendent infertiles et de ce fait, réduisent progressivement la population de moustiques jusqu'à une extinction éventuelle. La stérilité des mâles peut être induite par radiations ionisantes, chimiostérilisation, hybridation ou par réarrangement chromosomique (Knippling *et al.*, 1968). Les dernières avancées biotechnologiques permettent aujourd'hui de rendre stériles les mâles par génie génétique (Harris *et al.*, 2011 ; 2012 ; Lacroix *et al.*, 2012 ; Gentile *et al.*, 2015). Ainsi l'utilisation des « *Homing Endonuclease Genes* » (HEG) permettent aujourd'hui de rendre stériles les mâles d'*An. gambiae* s.l. et par conséquent de rendre infertiles les femelles avec lesquelles ils s'accouplent (Windbichler *et al.*, 2008 ; Nolan *et al.*, 2011 ; Chan *et al.*, 2011). Cette approche est en pleine expansion et un vaste projet de recherche regroupant plusieurs instituts du Nord et des instituts africains dont l'IRSS au Burkina Faso est en cours. La TIS dans son concept n'est pas une approche nouvelle car de nombreux programmes basés sur la TIS ont eu un succès dans le passé y compris l'élimination de la mouche tsé-tsé, *Glossina*

austensi à Zanzibar (Vreysen *et al.*, 2000) et la lucilie bouchère du bétail, *Cochliomyia hominivorax* en Amérique Centrale et du Nord (Snow, 1988) comme en Liby (Lindquist *et al.*, 1992). Chez les moustiques, un programme utilisant la TIS contre les anophèles a été entrepris au Salvador au début des années 1970 avec un certain succès. Dans ce programme contre *An. albimanus* l'objectif de suppression de la population a été atteint principalement parce que l'aire de lâcher des mâles était limitée (Benedict & Robinson, 2003). D'autres essais à travers le monde n'ont pas eu les succès espérés. Par exemple le lâcher des moustiques stériles au Burkina Faso pour réduire la densité de la population d'*An. gambiae* s.l. en 1968-1969 n'a pas réussi du fait d'une faible compétitivité sexuelle des mâles lâchés (Davidson *et al.*, 1970). Le résultat négatif du contrôle par la TIS de *Culex tarsalis* en Californie était associé à des accouplements positivement assortis entre les souches lâchée et sauvage (Reisen, 1982). L'échec de la plupart des essais de contrôle génétique était attribué à une connaissance imparfaite de la biologie de reproduction des espèces de moustiques cibles (Benedict & Robinson, 2003 ; Ferguson *et al.*, 2005). Une bonne connaissance du système de reproduction des espèces cibles est nécessaire pour le succès de tout programme de lutte antivectorielle basé sur le lâcher des mâles stériles (Ferguson *et al.*, 2005 ; Benedict *et al.*, 2009).

I.3.2.1.2. La stratégie de remplacement par diffusion et dissémination de gènes

La stratégie de remplacement consiste à faire diffuser et disséminer au sein d'une population de moustiques un gène d'intérêt jusqu'à fixation. Ainsi la population de type sauvage est renouvelée et se retrouve entièrement remplacée par une population arborant le nouveau gène d'intérêt. L'exemple typique en cours est la mise au point du programme de moustiques réfractaires au développement du *Plasmodium*. La possibilité de manipuler génétiquement des moustiques pour les rendre réfractaires à l'infection au *Plasmodium* (Ito *et al.*, 2002 ; Abraham *et al.*, 2005 ; Catteruccia, 2007) nourrit l'espoir que le paludisme pourrait être contrôlé. Ici, l'idée consiste à lâcher un nombre suffisant de mâles transgéniques dans la nature pour disséminer des gènes réfractaires au développement du *Plasmodium* dans les populations sauvages de vecteurs. D'énormes progrès ont été réalisés ces dernières années sur cette question spécifique. Toutefois nous sommes encore très loin de l'application concrète de cette technologie sur le terrain pour de multiples raisons. Des questions de compétitivité sexuelle des mâles lâchés par rapport aux mâles sauvages, mais aussi des questions de barrières reproductives entre espèces et populations de vecteurs du paludisme sont encore mal

élucidées (Diabaté & Tripet, 2015). Ainsi, des études préalables de la biologie des vecteurs sont nécessaires pour une meilleure compréhension de la structure génétique, l'adaptation écologique et le fonctionnement du système de reproduction des populations sauvages de moustiques. D'autres approches génétiques comme la para-transgénése sont également en plein essor (Kokoza *et al.*, 2011 ; Lynd *et al.*, 2012 ; Caljon *et al.*, 2013).

I.3.2.1.3. Facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles

- L'élevage en masse des mâles peut affecter plusieurs composantes de l'histoire de vie des moustiques (Howell & Knols, 2009). Les facteurs tels que la taille, l'âge et le statut physiologique en rapport avec les réserves énergétiques influencent la compétitivité sexuelle des mâles mais aussi la fécondité des femelles (Okanda *et al.*, 2002 ; N'ghabi *et al.*, 2008 ; Maïga *et al.*, 2012). Les insectes sont généralement réceptifs à des signaux qui gouvernent leurs comportements de reproduction conduisant à l'accouplement. Ces signaux peuvent aussi servir de barrières d'isolement reproductif précopulatoires empêchant ainsi le transfert, la diffusion et la dissémination des gènes d'intérêt dans une population sauvage de vecteurs (Catteruccia, 2007). A priori, la faisabilité de lâcher des mâles stériles ou transgéniques dans un programme de contrôle génétique demande une bonne évaluation de l'ensemble de ces facteurs dans un environnement sémi-naturel, puis naturel afin d'établir des bases solides indispensables au succès d'une telle approche.

PRESENTATION DE L'ETUDE

II. Présentation de l'étude

II.1. Présentation de la thèse

La spéciation est un processus biologique fondamental à la base de l'évolution des espèces. Dans un monde en constante évolution ou l'émergence de nouvelles espèces peut conduire à l'apparition de nouvelles maladies ou à l'aggravation de celles déjà existantes, il devient impératif de comprendre les facteurs écologiques et génétiques qui précèdent la formation de nouvelles espèces et donc contribuent à la diversité biologique. Étudier la spéciation consiste donc à identifier l'ensemble des facteurs qui aboutissent à la mise en place d'un isolement reproductif, qu'il soit pré-et/ou post-copulatoire au sein de différentes populations d'une même espèce. Cette thèse se focalise sur des études du comportement de reproduction, des facteurs génétiques et écologiques qui gouvernent la survie des espèces d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* ainsi que le succès reproducteur des mâles en particulier dans les conditions naturelles et sémi-naturelles. Le but étant d'améliorer notre connaissance du système de reproduction des espèces du complexe *An. gambiae* avant de passer à des applications pratiques dans l'exécution des futurs programmes de contrôle génétique.

L'étude a été menée à l'ouest du Burkina Faso et la présentation du travail proprement parlé se fera selon un format classique avec cinq sections. Une première section est consacrée à une **Introduction générale** qui présente le contexte et les objectifs de l'étude. Une deuxième section présente une **Revue bibliographique** sur les vecteurs du paludisme en Afrique, l'évolution de la systématique des espèces du complexe *An. gambiae*, l'isolement reproductifs entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* et la lutte antivectorielle. Une troisième section résume les **Matériels et méthodes** utilisés. Une quatrième section consacrée aux **Résultats et Discussions** est présentée en 4 chapitres brièvement décrits ci-après. Chaque chapitre représente un article publié, soumis ou en cours de préparation. Les chapitres sont structurés en une partie introductive, la méthodologie utilisée, les résultats et une discussion. Le chapitre 1 présente les résultats de l'analyse des SNPs démontrant le rôle des « îles de spéciation » dans l'isolement reproductif précopulatoire entre les populations sympatriques d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*. Le chapitre 2 se focalise sur l'hybridation et la sélection contre les hybrides dans les conditions écologiques favorables à l'extrême dominance asymétrique d'une des deux espèces jumelles. Le chapitre 3 porte sur une évaluation expérimentale de l'isolement post-zygotique entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Le chapitre 4 décrit le rôle des réserves

énergétiques et la taille sur le succès reproducteur des mâles des deux espèces. Enfin **une Conclusion générale et des perspectives** constituent la dernière section.

II.2. Présentation des faciès éco-climatiques du Burkina Faso

Pays enclavé au cœur de l'Afrique de l'Ouest (Figure 2), le Burkina Faso couvre une superficie de 274 000 km² avec une population estimée à 14 017 262 habitants. Il est limité au Nord et à l'Ouest par le Mali, au Nord-Est par le Niger, au Sud-Est par le Bénin et au Sud par le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire. L'économie du Burkina Faso repose essentiellement sur l'agriculture et l'élevage, deux secteurs qui occupent plus de la moitié de la population active. Le climat est de type tropical soudanien, avec deux saisons globalement caractérisées par une longue période sèche allant de novembre à avril, voire mai, et une courte période pluvieuse allant de juin à octobre. Il peut être divisé du Nord au Sud, en 3 principales zones éco-climatiques (zones sahélienne, soudano-sahélienne et soudanienne) qui gardent entre elles des domaines de transition délimités par des isohyètes définies au cours de ces dernières années (Figure 2). Son réseau hydrographique est composé de cours d'eau permanents tels que le Mouhoun, la Comoé et la Léraba, situés au Sud-Ouest du pays et de cours d'eau temporaires qui restent secs sur une grande période de l'année. Ces derniers sont le Nakambé, le Nazinon, le Beli, le Sirba et la Tapoa. Tous les vecteurs majeurs du paludisme en l'occurrence, *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. funestus* sont rencontrés au Burkina Faso. A ces espèces, s'y ajoute *An. nili* considéré comme un vecteur secondaire. La répartition géographique de ces vecteurs est principalement associée à des faciès éco-climatiques avec des variations liées généralement à des facteurs anthropiques tels que les aménagements hydro-agricoles. Ainsi, l'incidence et la transmission du paludisme varient suivant un gradient Nord-Sud donnant ainsi lieu à trois zones épidémiologiques du paludisme.

II.2.1. La zone sahélienne

Avec une pluviométrie annuelle moyenne inférieure à 650 mm et des températures extrêmes pouvant atteindre un minimum de 10°C et un maximum de 42°C, la zone sahélienne est caractérisée par la présence de 3 espèces du complexe *An. gambiae* s.l. (*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*) avec une prédominance d'*An. coluzzii* (Figure 3) dont les proportions peuvent atteindre 95% dans certaines localités. La transmission du paludisme est de courte durée dans la pointe sahélienne avec 95% des accès palustres enregistrés entre

juillet et novembre. Dans cette zone où les pluies sont très rares, les eaux pluviales disparaissent rapidement ; seules les grandes mares et certaines rivières permettent une production régulière des gîtes larvaires de moustique pendant une courte saison pluvieuse. Les populations sédentaires autour des collections d'eau sont exposées à une transmission intense du paludisme pendant l'hivernage. Cependant, les populations nomades, mobiles et dispersées ne sont soumises qu'à une transmission occasionnelle.

II.2.2. La zone soudano-sahélienne

Avec une pluviométrie annuelle moyenne de 650 mm à 1 000 mm et des températures extrêmes minimale de 13°C et maximale de 40°C, la zone soudano-sahélienne est caractérisée par la présence de 3 espèces du complexe *An. gambiae* à savoir *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* (Figure 3) suivis par *An. funestus*. *An. arabiensis* prédomine dans la région Centre-Est de la zone. Localement la ville de Ouagadougou jadis dominée par *An. gambiae* avec des proportions avoisinant les 50%, est maintenant dominée par *An. arabiensis* avec près de 60% des espèces du complexe (Dabiré *et al.*, 2009). *An. funestus* a été rencontré aux abords des petits cours d'eau et mares permanentes du plateau central mossi. La présence d'*An. nili* a été aussi signalée le long de quelques cours d'eau et ruisseaux à une fréquence de moins de 5% du total des femelles de vecteurs collectés. La transmission dans cette zone est longue de juin à mars, dans la bande centrale nord-soudanienne avec 80 % des accès palustres enregistrés entre juillet et octobre à Ouagadougou.

II.2.3. La zone soudanienne

Avec une pluviométrie annuelle moyenne de 1 000 mm à 1 300 mm et des températures extrêmes minimale et maximale respectives de 12°C et 38°C, la zone soudanienne est marquée par la rareté d'*An. arabiensis* dont la présence est signalée à des faibles fréquences (Figure 3) souvent moins de 10%. Cette partie du pays est caractérisée essentiellement par un groupe de vecteurs incluant les espèces du complexe *An. gambiae* (60%), *An. funestus* (37%) et *An. nili* (<5%) (Dabiré *et al.*, 2008). Cette zone est caractérisée par une transmission permanente du paludisme, avec un renforcement en saison des pluies et en début de saison sèche. La période de transmission associée à l'hivernage est intense, continue et homogène dans l'espace.

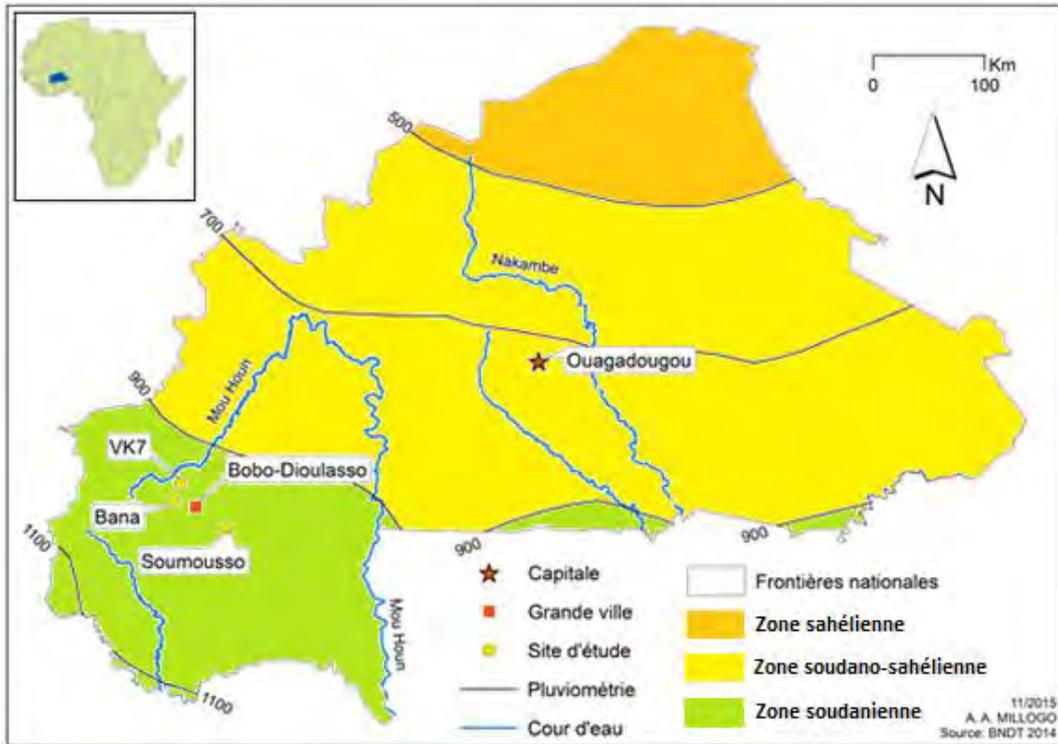


Figure 2: Localisation géographique des sites d'étude de VK7, Soumoussou et Bana dans la zone soudanienne du Burkina Faso

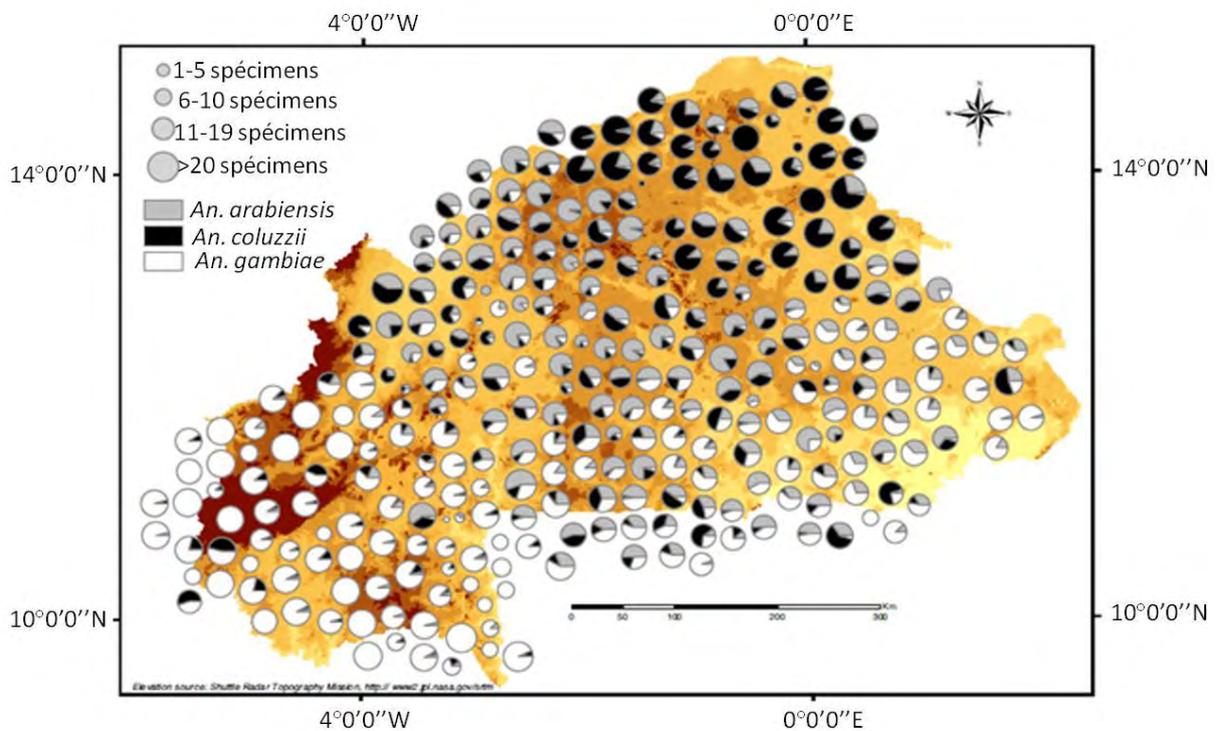


Figure 3: Répartition géographique des espèces du complexe *An. gambiae* s.l. au Burkina Faso (Costantini *et al.*, 2009)

II.3. Présentation des sites d'étude

Nous avons étudié les facteurs génétiques et écologiques des moustiques liés à l'activité d'essaimage et aux phénomènes d'hybridation ainsi que la sélection contre les hybrides au sein des populations sympatriques et naturelles d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*. L'étude a été réalisée dans 3 villages avec des écosystèmes différents dans la zone soudanienne à l'Ouest du Burkina Faso. Il s'agit du village VK7 de la zone rizicole de la Vallée du Kou, de Soumoussou et de Bana, deux villages classiques de savane boisée (Figure 4). Le choix de ces sites est motivé par le fait que les deux espèces jumelles *An. coluzzii* et *An. gambiae* y vivent en sympatrie, offrant ainsi l'opportunité d'étudier leurs mécanismes d'isolement reproductif et le rôle des réserves nutritionnelles et la taille sur le succès reproducteurs des mâles.

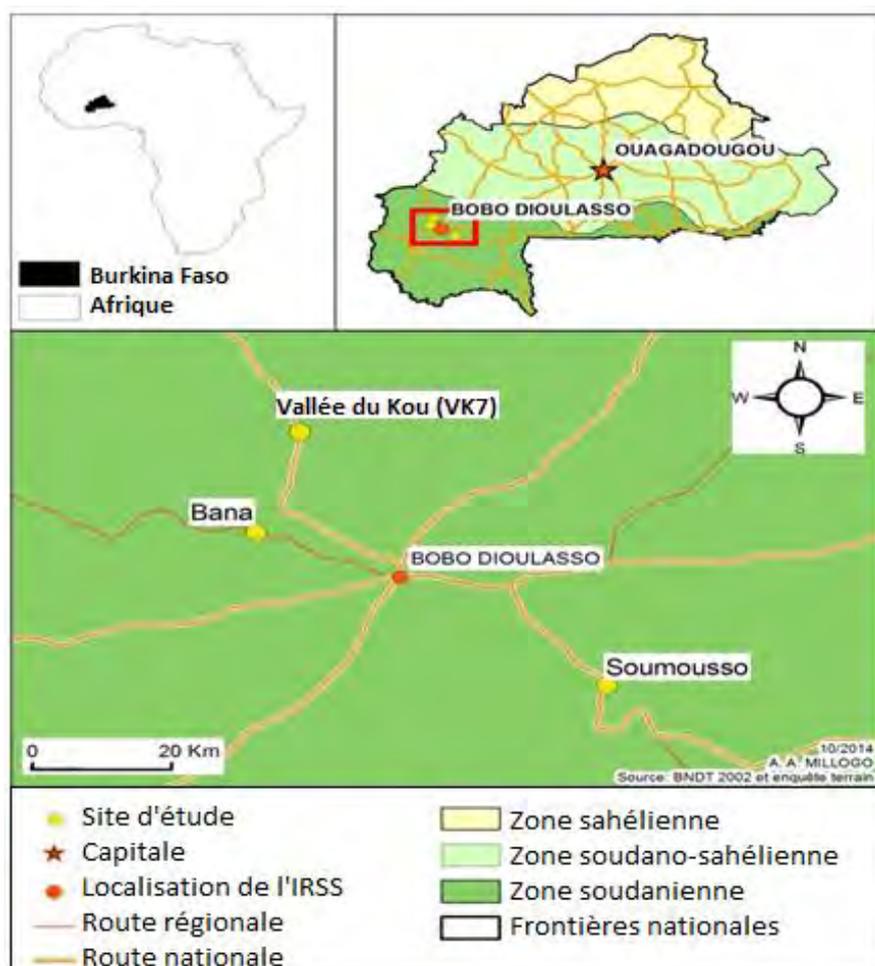


Figure 4: Localisation géographique des sites d'étude de VK7, Soumoussou et Bana dans la zone soudanienne du Burkina Faso

II.3.1. La Vallée du Kou (VK7)

La Vallée du Kou (Figure 5) est une zone rizicole développée dans les années 1970 à l'Ouest du Burkina Faso à environ 30 km au Nord de Bobo-Dioulasso entre 4° 24' 42" de longitude Ouest et 11° 23' 14" de latitude Nord. Elle couvre une superficie de 1 200 ha avec environ 12 000 habitants qui vivent dans 7 villages situés au milieu ou en périphérie du périmètre irrigué entouré d'une savane boisée. L'étude a été réalisée dans le village VK7, localisé le long de la bordure du périmètre rizicole et une zone de culture cotonnière caractérisée par une savane boisée. La zone est caractérisée par une saison des pluies de 5 à 6 mois allant de mai à octobre et une saison sèche allant de novembre à avril. La pluviométrie annuelle est enregistrée à 1 200 mm environ, avec des valeurs qui atteignent leur pic en juillet et août. Le fleuve Kou est une source permanente de l'irrigation des surfaces cultivées avec deux campagnes par année (de janvier à mai et de juillet à novembre). Du fait du système d'irrigation, les eaux des rizières forment des gîtes permanents de production larvaire qui sont préférentiellement colonisés par *An. coluzzii*. Pendant la saison des pluies, des gîtes larvaires additionnels dépendant des eaux de pluies permettent le développement des larves d'*An. gambiae*. Les deux espèces, *An. coluzzii* et *An. gambiae* sont enregistrées à des densités très élevées pendant la saison des pluies. Des études d'identification moléculaire conduites dans ce village ont confirmé que les densités d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* subissent des fluctuations saisonnières avec une prédominance relative d'*An. coluzzii* toute l'année (Baldet *et al.*, 2003 ; Diabaté *et al.*, 2003 ; 2006 ; Dabiré *et al.*, 2008).

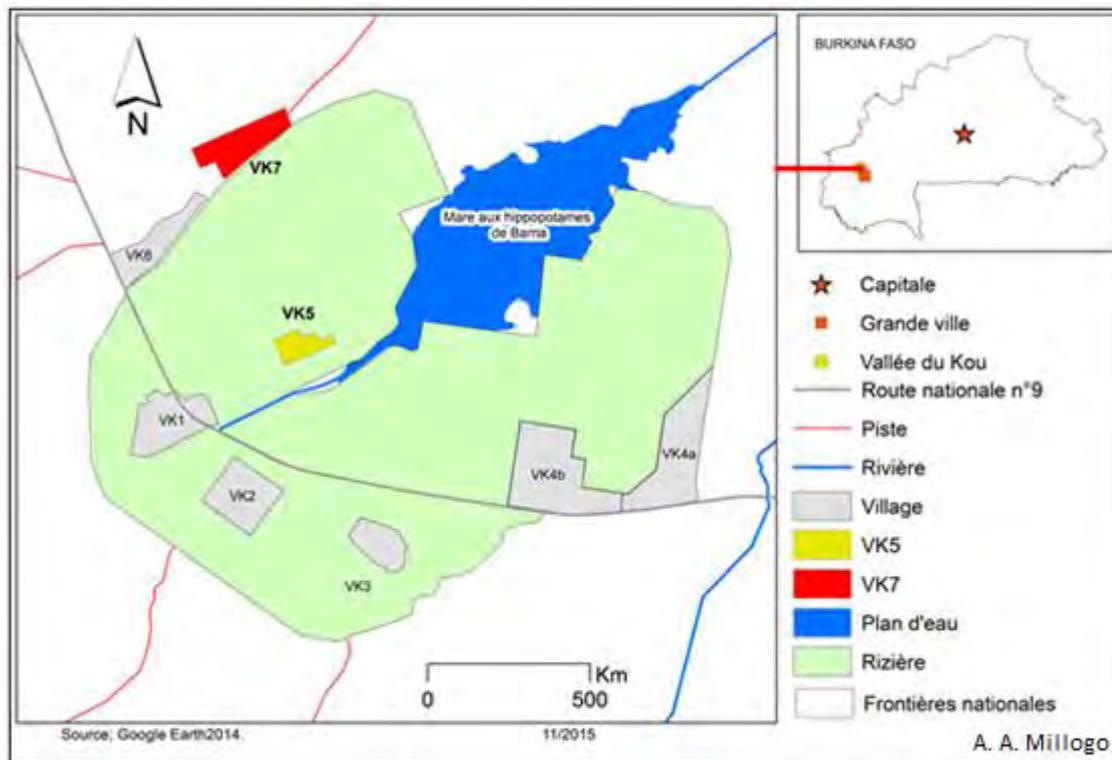


Figure 5: Localisation de la Vallée du Kou

II.3.2. Soumousso

Soumousso (4°02'45'' de longitude Ouest et 11°00'46'' de latitude Nord) est un village de type savane soudanienne, situé sur l'axe Bobo-Dioulasso-Diébouyou, à environ 55 km au Sud-Est de Bobo-Dioulasso (Figure 6). Il est bordé par un ruisseau semi-permanent créant par endroit un marécage temporaire lors des décrues. Le climat est de type soudanien avec une saison des pluies relativement longue de 5 à 6 mois (mai à octobre) avec une moyenne annuelle comprise entre 1 000 mm et 1 200 mm. Les gîtes de reproduction des moustiques sont constitués par des flaques d'eau de pluies et un marécage semi-permanent favorables au développement des larves d'anophèle. Les deux espèces jumelles du complexe, *An. coluzzii* et *An. gambiae* y coexistent d'une façon sympatrique et synchrone et atteignent leurs plus fortes densités en septembre. Cependant, la fréquence relative des deux espèces change en fonction du temps avec une prédominance d'*An. gambiae* de juillet à novembre et celle d'*An. coluzzii* de décembre à juin. Depuis 2003 des études intenses sur le comportement de reproduction des espèces du complexe *An. gambiae* sont réalisées dans ce village où des essais mixtes composés d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* ont été rapportés pour la première fois (Diabaté *et*

al.,2006 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2013a ; 2014). *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. rufipes* y sont également rencontrés mais à des densités relativement très faibles.

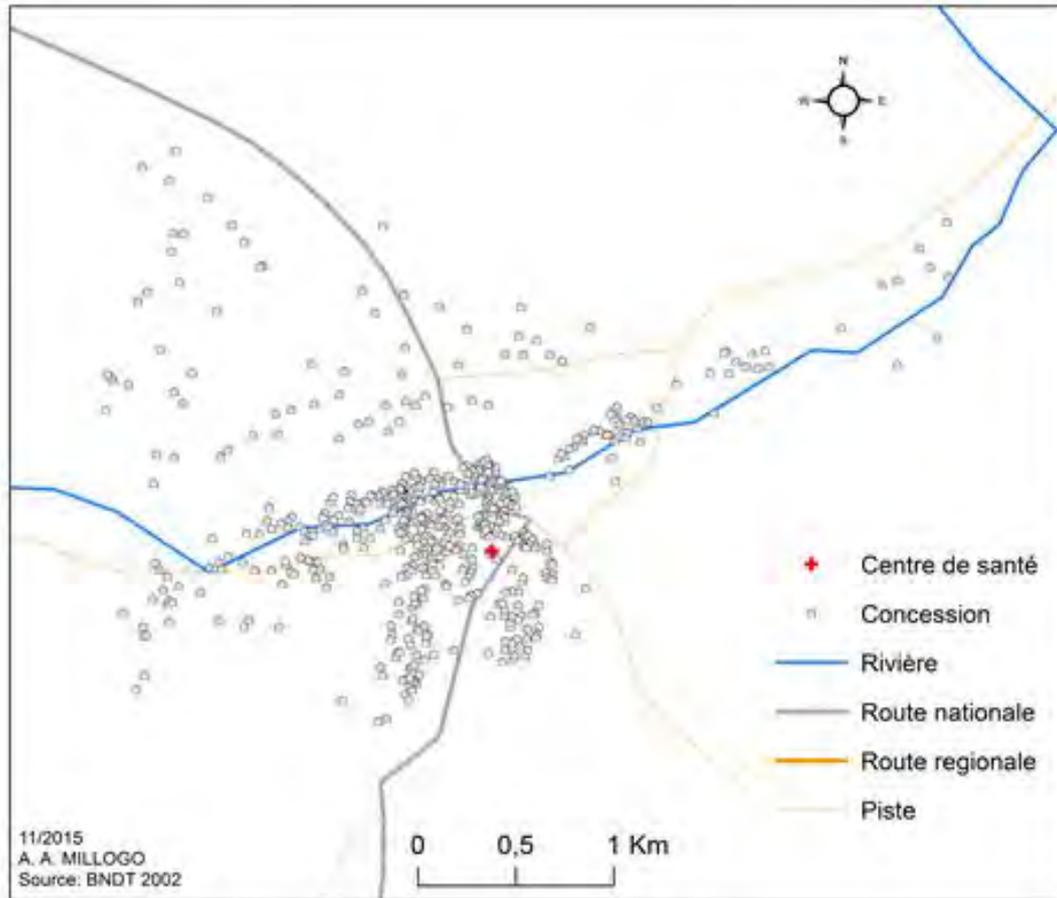


Figure 6: Localisation de Soumouso

II.3.3. Bana

Bana ($12^{\circ}36'00''\text{N}$, $3^{\circ}28'59''\text{W}$) est un village également localisé en zone de savane humide situé à l'Ouest du Burkina Faso (Figure 7). A l'instar de VK7 et Soumousso, la saison des pluies y est longue de 6 mois allant de mai à octobre, suivie par une saison sèche généralement de même durée allant de novembre à avril. La pluviométrie annuelle varie de 1 000 à 1 200 mm en moyenne. Les populations anophéliennes de Bana sont caractérisées par une variation saisonnière comparable à celle notée à Soumousso avec des densités plus ou moins similaires des deux espèces jumelles, *An. coluzzii* et *An. gambiae* (Niang *et al.*, 2015).

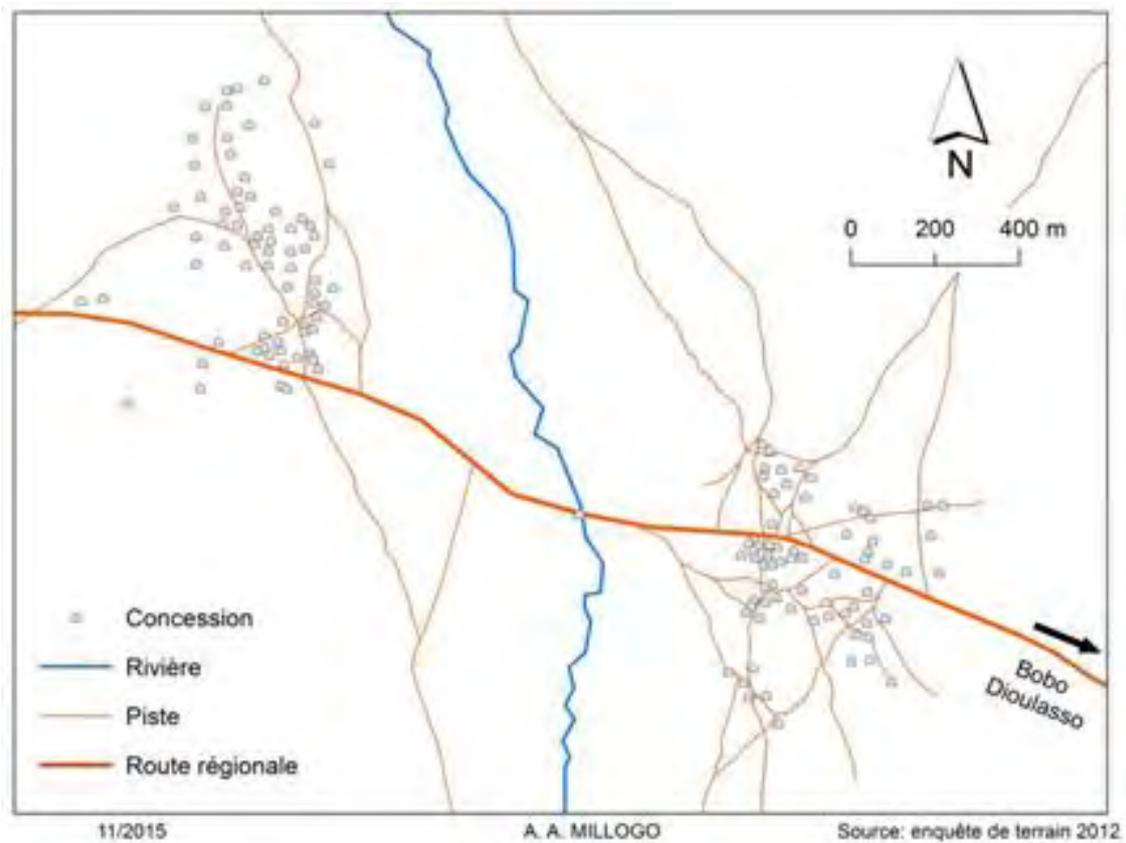


Figure 7: Localisation de Bana

MATERIELS ET METHODES

III. Matériels et méthodes

La méthodologie de collecte et d'analyse des données étant transversale aux différentes études, nous en donnons une description générique dans cette partie et faisons un rappel rapide dans les sections suivantes. Toutefois une description plus fine sera éventuellement donnée dans les chapitres correspondants, si la méthodologie utilisée s'avère très spécifique.

III.1. Echantillonnage et traitement des moustiques

III.1.1. Evaluation des mécanismes d'isolement reproductif précopulatoire

III.1.1.1. Prospection larvaire

Les larves d'*An. gambiae* s.l. ont été collectées dans différents types de gîtes larvaires incluant les étangs, rizières, fosses de briques à travers les villages de VK7 et de Soumousso. Les collectes ont été faites par la méthode de « *dipping* » à l'aide de louches (Figure 8). Les gîtes larvaires positifs identifiés ont été soigneusement prospectés et les larves ont été ramassées à l'aide de louches et transférées dans des récipients. L'eau a ensuite été tamisée pour y retirer les gros débris de même que les prédateurs de moustiques. Les collectes étaient mensuelles de juillet à novembre. Toutes les larves de moustique collectées ont été soigneusement examinées afin de séparer les *Culicinae* des *Anophelinae*. Les *Anophelinae* ont été classés du premier au quatrième stade larvaire et préservés immédiatement dans l'alcool 70% pour l'extraction d'ADN et des analyses de biologie moléculaire. Les collectes des adultes, que ce soit dans les essaims ou dans les sites de repos décrits ci-dessous (Figures 9 et 11), ont été faites de façon synchrone avec les collectes des larves.



Figure 8: Collecte des larves d’anophèles (photo : A. Niang)

III.1.1.2. Suivi et collecte de moustiques dans les essaims

Un suivi des essaims a été réalisé par des observateurs expérimentés dans les sites d’étude de VK7, Soumousso et Bana. La position des essaims a été géolocalisée en utilisant un GPS (Global Positioning System) GARMIN, série GPSMAP®62.2.3 qui permet de calculer la latitude et la longitude avec une précision de 3m. Dans chaque site d’étude, des observations suivies de collecte des moustiques ont été réalisées chaque soir au crépuscule pour repérer les sites d’essaimage dispersés dans les villages. Tous les essaims ont été ainsi visités six fois chaque mois de juillet à novembre en utilisant des filets à papillons tel qu’il a été décrit dans des études précédentes (Marchand *et al.*, 1984 ; Diabaté *et al.*, 2006 ; 2009 ; Sawadogo *et al.*, 2013a) (Figure 9). Pour nous assurer que les essaims sont échantillonnés de la même façon, deux collecteurs ont été positionnés par site d’essaimage. Les études précédentes ont montré que la plupart des essaims atteignent leurs pics 15 minutes après l’apparition du premier mâlesur le site d’essaimage (Diabaté *et al.*, 2011) (Figure 10). De ce fait, les collecteurs

déclenchaient leur chronomètre dès l'apparition du premier mâle. Il s'en suivait la collecte des mâles dans l'essaim 15 à 20 minutes après que le premier mâle a été vu. Les pairs *in copula*, ou couples, ont été également collectés lors de l'observation et suivi de ces essaims à l'aide du même type de filets mais en plus petit format. Les couples, une fois formés en général, ont tendance à tomber ou s'envoler hors des essaims et de ce fait sont facilement repérables et peuvent être collectés. Après chaque séance de capture, les couples, les mâles et femelles dans chaque filet donc issus de chaque essaim ont été transférés dans des gobelets bien étiquetés, portant la date de capture, le numéro de l'essaim et le numéro de couple avant d'être endormis au chloroforme (Sawadogo *et al.*, 2013a) et identifiés morphologiquement. Les moustiques appartenant au complexe *An. gambiae* s.l. ont été immédiatement conservés dans des tubes 1,5 ml contenant de l'éthanol 70%. Les mâles échantillonnés, les femelles issues des couples et les femelles non accouplées ont été aussi examinés morphologiquement avant être génotypés au niveau espèces (Fanello *et al.*, 2002 ; Santolamazza *et al.*, 2008).



Figure 9: Echantillonnage des moustiques dans les essaims (photo : S. Sawadogo)



Figure 10: Essaim d'*An. gambiae* s.l. observé au Burkina Faso (Diabaté & Tripet, 2015)

III.1.1.3. Collecte des moustiques dans les lieux de repos

Les adultes femelles et mâles se reposant à l'intérieur des maisons ont été collectés à l'aide d'aspirateurs à bouche (Figure 11) à Soumousso et VK7. Six collecteurs en raison de 2 personnes par pièce ont été choisis pour la collecte des moustiques pendant 6 jours dans toutes les maisons de toutes les concessions où des essaims ont été trouvés.



Figure 11: Capture des moustiques dans les lieux de repos (photo : S. Sawadogo)

III.1.1.4. Identification morphologique et moléculaire des moustiques collectés

Après les sessions de collecte de moustiques adultes par les différentes méthodes de capture ci-dessus, les spécimens ont été ensuite identifiés sous une loupe binoculaire (Figure 12) à l'aide des clés de détermination taxonomique basée sur les critères morphologiques (Gillies & De Meillon, 1968). Ceci permet de distinguer les espèces d'anophèles vecteurs et de les séparer des autres anophèles et autres culicidés.

Après l'identification morphologique, les spécimens appartenant au complexe *An. gambiae* ont été analysés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pour une identification précise de l'espèce (Santolamazza *et al.*, 2008). Décrite en 2008, cette technique met à profit le polymorphisme des sites d'insertion pour un groupe de retro transposons connu sous le nom de « *Short INterspersed Elements* » (SINE). Un des sites d'insertion des SINEs localisé sur le chromosome X et appelé SINE X6.1 est fixé chez *An. coluzzii* et est absent chez *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Une délétion de 26 pb chez *An. arabiensis* permet de distinguer ces deux dernières espèces. Des études utilisant des méthodes de diagnostic multiples ont donné quelques résultats discordants dans l'identification des hybrides particulièrement dans les zones où l'hybridation d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* est très courante telle qu'en Guinée Bisau (Oliveira *et al.*, 2008). Ce qui fait que tous les hybrides rencontrés ont été par la suite confirmés par la technique décrite par Fanello *et al.* (2002). Ces deux techniques d'identification moléculaire nécessitent une première étape d'extraction d'ADN suivie d'une étape d'amplification (Santolamazza *et al.*, 2008) à laquelle s'ajoute l'étape de digestion enzymatique (Fanello *et al.*, 2002) avant de passer à la migration par électrophorèse et à la révélation.



Figure 12: Séance d'identification morphologique des moustiques (photo : A. Niang)

III.1.1.5. Identification moléculaire et génotypage des SNPs

L'ADN extrait au DNazol (cf Annexe 1) des moustiques identifiés par PCR (Fanello *et al.*, 2002 ; Santolamazza *et al.*, 2008) comme *An. coluzzii* ou *An. gambiae* a été échantillonné. Seuls les spécimens pour lesquels la concentration est supérieure ou égale à 5 ng/μl ont été choisis pour le génotypage des SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Ainsi, les échantillons d'ADN ont été placés dans des plaques stériles en raison de 50μl par puits. Les plaques composées chacune de 94 puits contenant de l'ADN à tester et 2 puits témoins ont été soigneusement conditionnées et conservées à -20°C avant d'être envoyées au laboratoire de génomique du « *Wellcome Trust Institut* », UK. Des SNPs trouvés fixés entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* par des études précédentes ont été sélectionnés pour le génotypage des échantillons (Turner *et al.*, 2005 ; Stump *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010). Le test de génotypage multiplexe des SNPs décrit par Lee *et al.* (2014) a été utilisé pour l'identification de 15 SNPs localisés au sein des « îles de spéciation » des chromosomes (Turner *et al.*, 2005 ; Stump *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2010), en raison de 7 SNPs sur l'île du chromosome X, 5 sur 2L et 3 sur 3L (Figure 13). Le détail des SNPs génotypés est donné dans le tableau 1. Les allèles des SNPs permettent de distinguer les deux espèces parentales, les hybrides mâles de la première génération (F₁) et tous les types de recombinants issus des croisements en retour (F_{1+n}). Le génotype des SNPs sur les trois îles de spéciation a été assigné soit à *An. coluzzii* ou à *An. gambiae* en se basant sur la règle de la majorité décrite dans les études précédentes (Lee *et al.*, 2013a ; 2014 ; Norris *et al.*, 2015 ; Aboagye-Antwi *et al.*, 2015). Les hybrides mâles F₁ ont été déterminés par des SNPs hétérozygotes sur les deux autosomes (2L et 3L) (Figure 15). Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le programme software JMP 10 (SAS Institute, Inc).

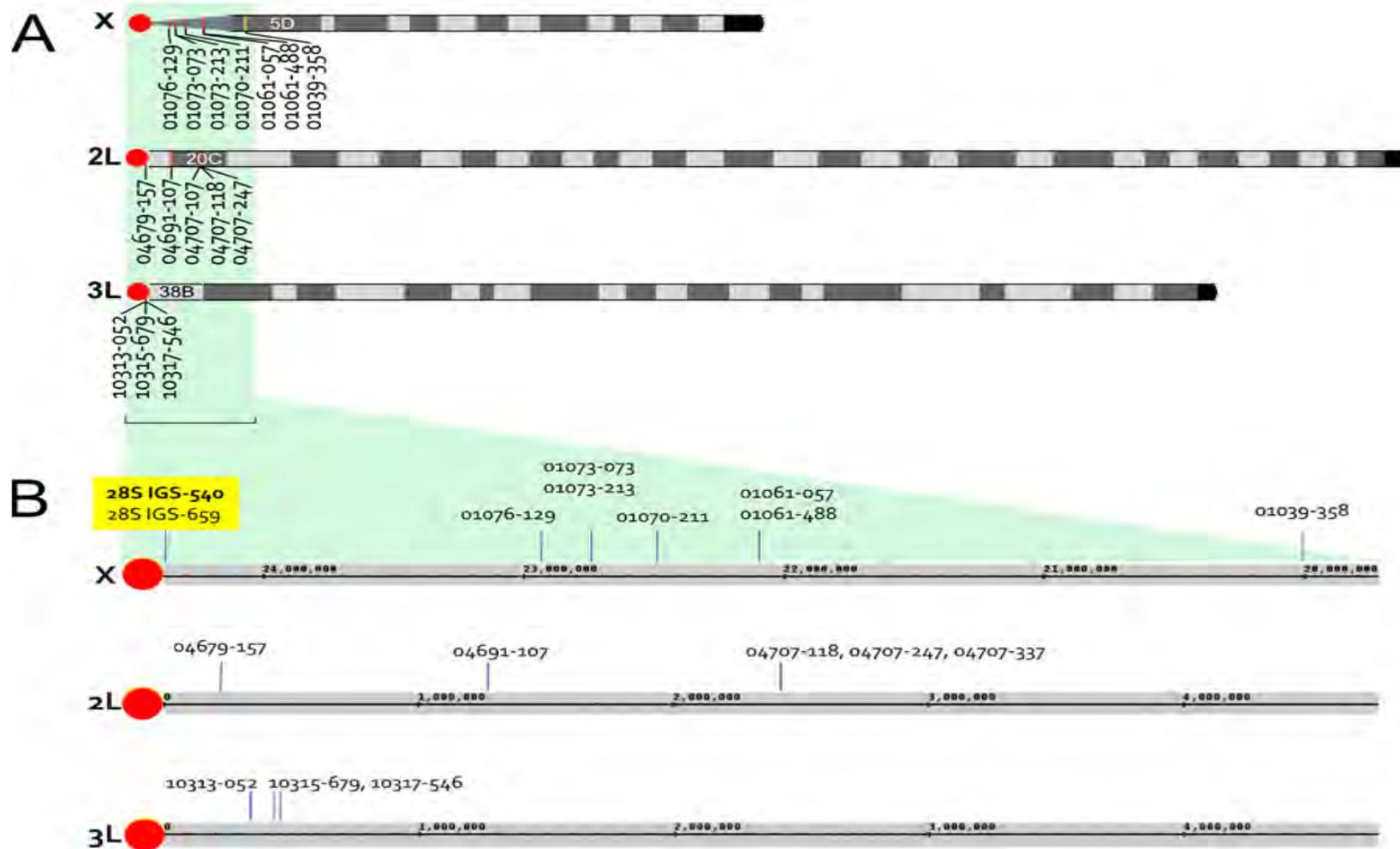


Figure 13: La carte génomique montrant des régions péri-centromériques divergentes entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* : (A) Localisation des SNPs utilisés dans les « îles de spéciation » des chromosomiques X, 2L et 3L. (B) Grossissement des régions péri-centromériques

Tableau 1: Description allélique des SNPs utilisés pour la caractérisation des hybrides entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*

Identifiant des SNPs	Chromosome	Coordonnée génomique	Allèle <i>An. coluzzii</i>	Allèle <i>An. gambiae</i>	Référence
01076-129	X	22 944 682	T	G	Stump <i>et al.</i> , 2005
01073-073	X	22 750 572	G	T	Stump <i>et al.</i> , 2005
01073-213	X	22 750 432	G	A	Stump <i>et al.</i> , 2005
01070-211	X	22 497 157	A	G	Stump <i>et al.</i> , 2005
01061-057	X	22 105 860	T	C	Stump <i>et al.</i> , 2005
01061-488	X	22 105429	A	T	Stump <i>et al.</i> , 2005
01039-358	X	20 015 634	C	A	Stump <i>et al.</i> , 2005
04679-157	2L	209 536	C	T	White <i>et al.</i> , 2010
04691-107	2L	1 274 353	A	G	Turner& Hahn, 2007
04707-118	2L	2 430 786	C	T	Turner <i>et al.</i> , 2005
04707-247	2L	2 430 915	A	G	Turner <i>et al.</i> , 2005
04707-337	2L	2 431 005	C	T	Turner <i>et al.</i> , 2005
10313-052	3L	296 897	G	A	White <i>et al.</i> , 2010
10315-679	3L	387 877	G	A	White <i>et al.</i> , 2010
10317-546	3L	413 944	T	C	White <i>et al.</i> , 2010

III.1.2. Evaluation des mécanismes d'isolement reproductif post-zygotique

III.1.2.1. Collecte et mise en ponte individuelle des femelles sauvages

Des femelles du genre *Anopheles* au repos ont été collectées d'une façon synchrone à VK7 et à Soumouso, à l'aide d'aspirateurs à bouche. Après chaque séance de capture les femelles *An.gambiae* s.l. sont identifiées et leur état de réplétion est déterminé avant de les transporter à l'insectarium. Les femelles ainsi collectées en faune résiduelle sur le terrain ont été ramenées à l'insectarium de l'IRSS/Centre Muraz où elles ont été transférées dans des cages et gardées pendant deux jours jusqu'à ce qu'elles soient gravides. Toutes les femelles gravides ont été récupérées des cages et mises en ponte. Pour cela, elles ont été placées dans des gobelets individuels contenant de l'eau de source à la base et recouverts d'un tissu-moustiquaire y attaché par un bracelet.

III.1.2.2. Elevage des larves et croisement des adultes de la F₀

Les larves issues des femelles identifiées par PCR (cf Matériels et méthodes II.4.1.4) ont été regroupées par espèce dans des bacs identiques et élevées à l'insectarium de l'IRSS/Centre Muraz dans les conditions de Température = $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, d'Humidité Relative maintenue (HR) à 75 % en moyenne et d'alternance jour/nuit de 12h. Elles ont été nourries à la TetraMin Baby[®] et maintenues à une densité moyenne de 100 larves par bac, permettant un développement optimal jusqu'à la nymphose. Les nymphes ont été triées par pipettage et séparées par sexe sous une loupe binoculaire avant d'être transvasées dans deux gobelets contenant de l'eau de source et placées dans des cages où a lieu l'émergence.

Des femelles de 4 à 5 jours ont été gorgées sur un lapin et accouplées de force à des mâles du même âge. En effet, chaque femelle a été brièvement anesthésiée avec de l'éther et disposée sur papier filtre sur le dos. Des mâles ont été fixés sur une aiguille par le thorax. Les pattes et la tête du mâle ont été détachées avant d'être présenté individuellement à la femelle anesthésiée. Le mâle a été stimulé par le chatouillement de son organe génital avec celui de la femelle pour induire la réaction de copulation. Les femelles accouplées ont été ainsi nourries sur une solution de glucose 5% et gorgées une deuxième fois sur un lapin avant d'être placées par la suite dans des gobelets individuels pour la ponte. Pour générer les spécimens des espèces parentales et leurs hybrides réciproques les croisements ont été réalisés de la façon

suivante : Femelle *An. coluzzii* X Mâle *An. coluzzii* ; Femelle *An. coluzzii* X Mâle *An. gambiae* ; Femelle *An. gambiae* X Mâle *An. coluzzii* et Femelle *An. gambiae* X Mâle *An. gambiae*. La progéniture issue de ces croisements a été nommée ici *An. coluzzii*, hybride col/gam, hybride gam/col et *An. gambiae*, respectivement.

III.1.2.3. Transplantation des larves de la F₁

Les espèces parentales *An. coluzzii* et *An. gambiae* et leurs hybrides réciproques col/gam et gam/col ont été transplantés dans des habitats larvaires permanents des rizières (Figure 14A) avec ou sans prédateurs des larves de moustiques. Des larves de premier stade choisies d'une façon aléatoire le jour de leur éclosion ont été utilisées pour établir des cohortes expérimentales de 150 larves chacune. D'une part 50 larves de chacun des trois groupes *An. coluzzii*, hybride col/gam et *An. gambiae* ont été regroupées et d'autre part le même nombre de chacun des trois groupes suivants *An. coluzzii*, hybride gam/col et *An. gambiae* a été également regroupé. Du fait que la variation de l'effet de la prédation peut maintenir la différenciation des populations pour des traits qui confèrent un avantage dans la survie, les deux cohortes de larves ont été élevées aussi bien en l'absence et en présence de prédateurs. Il existe plusieurs types de prédateurs de moustiques, mais le plus courant et vorace en milieu rizicole est du genre *Notonecta sp* (Diabaté *et al.*, 2008). Ainsi 2 spécimens de ce prédateur ont été introduits dans la moitié des cages de transplantation pour mesurer l'effet de la prédation sur les paramètres de développement des différentes espèces et leurs hybrides réciproques. L'expérience a été répétée neuf fois pour un total de 600 larves transplantées dans quatre cages disposées les unes à côté des autres par réplique. Des collectes journalières des adultes émergents de chaque cage ont été réalisées (Figure 14B). Les moustiques ont été comptés et placés dans des tubes contenant de l'éthanol 70% avant leur identification par PCR et la mesure de la taille de leurs ailes. La mesure des ailes comme index de la taille des moustiques a été réalisée sur la longueur et la largeur des 2 ailes selon le protocole décrit par Sandford *et al.* (2011). L'ADN extrait à partir d'une patte a été utilisé pour l'identification des femelles au niveau espèce par PCR (Santolamazza *et al.*, 2008) (cf Matériels et méthodes II.4.1.4). Du fait que les hybrides mâles n'ont qu'une seule copie du chromosome hémizygote X, ils ne peuvent pas être identifiés en utilisant les méthodes classiques moléculaires de diagnostic basées sur le polymorphisme de la région de l'espace intergénique de l'ADNr sur ce chromosome. Par conséquent, seules les femelles ont été utilisées dans l'analyse des données. Des études précédentes ont montré que la taille des anophèles est fortement sensible

aux conditions de l'environnement pendant le développement larvaire (Lyimo *et al.*, 1992 ; Aboagye-Antwi & Tripet, 2010 ; Manoukis *et al.*, 2006). Une relation directe entre la taille du corps et la taille des ailes est également connue chez les moustiques (Briegel, 1990). C'est pourquoi la taille de l'aile a été mesurée et comparée entre les espèces parentales et les hybrides comme index de la taille corporelle.



Figure 14: Transplantation larvaire (A ; photo : A. Diabaté) et retrait des adultes émergents (B ; photo : A. Niang)

III.2. Etude des facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles

III.2.1. Collecte et traitement des moustiques

La collecte des moustiques a été réalisée en juillet et août 2010 à VK7, puis en juillet, août, septembre et novembre 2011 à VK7 et à Soumousso.

Dans chaque village, des mâles ont été collectés dans leurs lieux de repos dans des maisons habitées ou abandonnées et dans des abris extérieurs à l'aide d'aspirateurs à bouche très tôt le matin entre 06:00 et 07:00. La collecte a été répétée le soir dans les mêmes lieux une heure avant la formation des essaims. Des moustiques, en majorité des mâles ont été aussi fauchés dans les essaims en trois temps distincts : la première fauchée (F1) à 5 mn après l'apparition du premier mâle (début d'essaim) ; puis la seconde (F2) lorsque le pic de l'essaim est atteint, soit 10 mn après F1 et la dernière (F3) lorsqu'il n'y a plus que les derniers mâles, soit après 25 mn d'essaimage. Les couples formés au cours de l'essaimage ont aussi été collectés et numérotés suivant leur ordre d'apparition. Des mâles nouvellement émergés des gîtes larvaires recouverts d'une cage à moustiquaire ont été capturés à l'aide d'aspirateurs à bouche tôt le matin entre 06:00 et 07:00, dans l'après-midi entre 17:00 et 18:00 et après le coucher du soleil autour de 18:30.

Les spécimens ainsi collectés ont été identifiés morphologiquement (Gillies & De Meillon, 1968) et seuls les moustiques mâles d'*An. gambiae* s.l. ont été conservés pour les analyses biochimiques. Pour cela, ils ont été d'abord anesthésiés à la vapeur de chloroforme afin d'arrêter tout processus métabolique puis transportés en bouteille d'azote liquide au laboratoire. Ils ont été conservés à -80°C en attendant le dosage des principaux métabolites (sucres totaux, glycogène, protéines et lipides) par spectrophotométrie.

III.2.2. Techniques d'extraction et dosage des métabolites

Le contenu des sucres totaux, du glycogène ainsi que celui des lipides et des protéines à été dosé chez chaque individu en utilisant le protocole de Rivero *et al.* (2007) qui requiert au préalable une étape d'extraction.

III.2.2.1.Extraction

Chaque moustique a été placé individuellement dans 200 µl de méthanol 80% puis broyé à l'aide d'un broyeur électrique. Le broyat a été bien mélangé à l'aide d'un vortex puis séparé en deux aliquotes de 70 µl, l'un pour l'analyse des protéines et l'autre pour l'analyse des sucres, du glycogène et des lipides (cf Annexe 2).

L'aliquote réservé à l'analyse des lipides, sucres et glycogène a été ajouté dans 680 µl d'un mélange de chloroforme/méthanol (1:2) et 100 µl de sulfate de sodium. Après centrifugation à 13 000 trs/mn pendant 15 minutes, le surnageant obtenu a été utilisé pour le dosage séparé des sucres et des lipides à raison de 350 µl pour chaque métabolite. Le culot a été préservé pour la quantification du glycogène.

III.2.2.2. Dosage des métabolites

III.2.2.2.1. Dosage des protéines (Bradford, 1976)

Le dosage des protéines selon la méthode de Bradford est basé sur la formation d'un complexe de coloration bleue en milieu acide entre les protéines et le Bleu Brillant de Coomassie G-250. Le Coomassie se lie à la protéine par des interactions non-covalentes et sa longueur d'absorption maximale passe de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu) proportionnellement à la concentration de protéines contenues dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage à partir d'une gamme de standards de l'albumine de sérum bovin (ASB) a permis de calculer la quantité de protéine contenue dans chaque échantillon.

Un volume de 70 µl du surnageant initial a été ajouté dans 730 µl de liquide physiologique puis 200 µl du réactif de Bradford (Sigma-Aldrich, USA) ; attendre 15 minutes pour permettre le développement de la coloration puis lire l'absorbance à 595 nm.

III.2.2.2.2. Dosage des sucres

En milieu acide et à chaud, les liaisons glycosidiques des hydrates de carbone sont hydrolysées. Les oses ainsi libérés subissent une déshydratation intramoléculaire pour donner des dérivés. La fonction aldéhyde de ces dérivés se condense en milieu acide avec l'hydroxyle d'un composé alcoolique pour donner des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent entre 610 et 700 nm. Une courbe d'étalonnage à partir d'une gamme de standards

de glucose a permis de calculer les quantités de sucre contenues dans chaque échantillon. Le volume prélevé est ensuite évaporé. On évite la dessiccation en laissant une petite goutte au fond du tube. On ajoute 1000 µl de réactif d'Anthrone (Sigma-Aldrich, USA) puis on chauffe pendant 15 minutes. Après refroidissement l'absorbance est lue à 625 nm.

III.2.2.2.3. Dosage du glycogène

Le glycogène précipite dans une solution de sulfate de sodium. L'ajout du méthanol permet la dissolution des sucres qui restent dans le surnageant. Le précipité réagit à chaud avec le réactif d'Anthrone pour donner une coloration bleu-vert qui absorbe à 625 nm au spectrophotomètre (Van Handel, 1985a). Une courbe d'étalonnage (identique à celle des sucres) à partir d'une gamme de standards de glucose a permis de calculer les quantités de glycogène contenues dans chaque échantillon.

Le tube contenant le culot est renversé sur du papier absorbant pour éliminer le reste du solvant. On ajoute 1000 µl de réactif d'Anthrone puis on chauffe pendant 15 minutes. Après refroidissement l'absorbance est lue à 625 nm.

III.2.2.2.4. Dosage des lipides

Les lipides sont solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, l'hexane, l'acétone, l'éthanol, le chloroforme ou le méthanol. Les lipides sont extraits dans un mélange de chloroforme-méthanol. Le traitement à l'acide sulfurique à chaud convertit les lipides insaturés en dérivés d'acides sulfoniques. Ces derniers développent une coloration rouge avec le réactif de Vanilline (Van Handel, 1985b) qui absorbe à 525 nm. Une courbe d'étalonnage à partir d'une gamme de standards d'huile végétale (cf. Annexe 2) a permis de calculer les quantités de lipides contenus dans chaque échantillon.

Le volume prélevé (350 µl) est chauffé jusqu'à évaporation totale à 95°C dans des blocs chauffants. Un volume de 37,5 µl d'acide sulfurique 96% a été ensuite ajouté puis chauffé pendant 5 minutes. Après refroidissement, on ajoute 1000 µl du réactif de Vanilline (Sigma-Aldrich, USA) puis on attend 10 à 15 minutes pour lire l'absorbance à 525 nm.

III.2.2.2.5. Calcul de la concentration des différents métabolites

De la densité optique (DO) de chaque gamme de standards (cf. Annexe 2), on retranche la DO du contrôle (1er puits de la gamme de standards) pour obtenir la DO réelle de la gamme. A chaque type de métabolite à doser correspond une gamme de standards : l'albumine du sérum de bovin (ASB) pour les protéines, le glucose pour les sucres et le glycogène et l'huile végétale pour les lipides. Une droite de régression des DO est tracée en fonction des différentes concentrations propres à chaque gamme de standards à l'aide du logiciel EXCEL. La droite obtenue est une fonction affine d'équation $y=ax+b$, où y est la DO, a la pente, x la concentration de standards (ou d'un échantillon) et b l'ordonnée à l'origine. La régression obtenue est bonne pour un coefficient de corrélation R^2 compris entre 0,9 et 1 ($0,9 < R^2 < 1$). Toutes les concentrations des métabolites sont déduites par calcul de ces courbes. Par identification, on peut tirer la formule suivante pour estimer la quantité de métabolite [C]:

$$[C] = (DO_{ECH} - b) / a$$

III.2.3. Mesure de la taille des ailes et estimation de la symétrie des mâles

Les ailes ont été disséquées à l'aide de pinces et d'aiguilles sous une loupe binoculaire et placées entre lames et lamelles. Elles sont ensuite photographiées et leur taille mesurée de l'allula à l'extrémité distale en excluant les franges grâce au logiciel Image J1.41.0. Cette longueur élevée au cube (L^3) est considérée comme un indice de la taille du moustique (Briegel *et al.* 1990). Pour évaluer la symétrie, la longueur des ailes (gauche et droite) de chaque moustique a été mesurée 3 fois puis comparée entre les mâles couplés et les mâles non-couplés.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1 : Rôle des « îles de spéciation » dans la ségrégation spatiale des essaims d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une communication orale :

Abdoulaye Niang, Simon P. Sawadogo, Patric Stéphane Epopa, Hamidou Maiga, Lassana Konaté, Roch K. Dabiré, Abdoulaye Diabaté, Frederic Tripet. Genomic islands, reproductive isolation and asymmetric introgression between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*. 64th annual meeting, *American Society of Tropical Medicine & Hygiene (ASTMH)*, 25-29 October 2015, Philadelphia, USA.

1.1. Problématique

Les chromosomes sexuels sont supposés promouvoir une accumulation rapide des gènes de l'isolement reproductif précopulatoire et/ou post-zygotique dû, d'une part à leur nature hémizygote chez un des sexes et d'autre part à leur faible taux de recombinaison (Qvarnström *et al.*, 2009). Vu l'importance de la ségrégation spatiale des essaims dans l'accouplement positivement assorti observé chez les populations naturelles et sympatriques d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*, on peut s'attendre à ce que les gènes associés au comportement d'essaimage soient localisés au moins, au sein d'une des « îles de spéciation » des chromosomes X, 2L et 3L. Une étude récente portant sur une introgression sélective multigénérationnelle entre des souches de laboratoire a montré qu'il existait des accouplements positivement assortis entre partenaires sexuels arborant la même configuration génomique au niveau du chromosome X (Aboagye-Antwi *et al.*, 2015). En effet, des femelles issues des souches recombinantes, différentes seulement de par leur « île de spéciation » sur le chromosome X se reproduisaient strictement avec des mâles ayant l'île correspondante. Dans ce cas, l'étude réalisée dans de petites cages confirme un accouplement positivement assorti entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Cependant, l'espace confiné des cages de laboratoire n'offre pas à ces moustiques un choix libre et indépendant comme celui des grands espaces des essaims en milieu naturel. Ce chapitre traite des données génomiques basées sur le génotypage des SNPs pour déterminer l'association entre la ségrégation spatiale des essaims et les « îles de spéciation » des chromosomes X, 2L et 3L en utilisant des mâles et femelles *An. coluzzii* et *An. gambiae* directement collectés dans les essaims naturels au sein des populations sympatriques à l'Ouest du Burkina Faso.

1.2. Méthodologie

Un suivi des essaims a été réalisé dans les trois sites d'étude : VK7, Soumoussou et Bana où des essaims ont été échantillonnés (cf Matériels et méthodes III.1.1.2). Les échantillons de mâles et femelles ont été collectés des essaims qui se formaient sur des sites géolocalisés pendant six soirées de chaque mois de juillet à novembre en 2011 à VK7 et Soumoussou et en 2012 à Bana. Spécifiquement dans cette étude, des échantillons collectés pendant la même période quelques années auparavant c'est-à-dire en 2006 et 2008 à VK7 et en 2006, 2007 et 2008 à Soumoussou ont été ajoutés. Les moustiques collectés, y compris des mâles et des femelles libres en vol dans les essaims mais aussi des mâles et femelles formant des couples, ont été identifiés morphologiquement (cf Matériels et méthodes III.1.1.4). Les spécimens *An. gambiae* s.l. préalablement conservés dans des tubes 1,5 ml contenant de l'éthanol 70% ont été identifiés par PCR (Fanello *et al.*, 2002 ; Santolamazza *et al.*, 2008) (cf Matériels et méthodes III.1.1.4). Des SNPs divergents localisés dans les îles de spéciation des chromosomes X, 2L et 3L (Figure 13 ; Figure 15) ont été génotypés (cf Matériels et méthodes III.1.1.5).

Sexe	Espèce	Chromosome X							Chromosome 2L					Chromosome 3L		
		5D	6						20A	20B				38A		
		20 015634	22105429	22105860	22497157	22750432	22750572	22944682*	209536*	1274353	2430786	2430915	2431005	296897*	387877	413944
Mâle	<i>An. coluzzii</i>	C	A	T	A	G	G	T	C:C	A:A	C:C	A:A	C:C	G:G	G:G	T:T
Mâle	F _{1+n}	C	A	T	A	G	G	T	C:C	A:A	T:C	G:A	T:C	G:G	G:G	T:T
Mâle	F _{1+n}	C	A	T	A	G	G	T	T:C	G:A	T:C	G:A	T:C	G:G	G:G	T:T
Mâle	F _{1+n}	A	T	C	G	A	T	G	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:A	G:A	T:C
Mâle	<i>An. gambiae</i>	A	T	C	G	A	T	G	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	A:A	A:A	C:C
Mâle	F _{1+n}	C	A	T	A	G	G	T	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	A:A	A:A	C:C
Mâle	F _{1+n}	C	A	T	A	G	G	T	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:G	G:G	T:T
Mâle	F _{1+n}	A	T	C	G	A	T	G	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:A	A:A	C:C
Mâle	F _{1+n}	C	A	T	A	G	G	T	T:C	G:A	T:T	G:G	T:T	G:G	G:G	T:T
Mâle	F ₁	A	T	C	G	A	T	G	T:C	G:A	T:C	G:A	T:C	G:A	G:A	T:C
Mâle	F ₁	C	A	T	A	G	G	T	T:C	G:A	T:C	G:A	T:C	G:A	G:A	T:C
Femelle	<i>An. coluzzii</i>	C:C	A:A	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	C:C	A:A	C:C	A:A	C:C	G:G	G:G	T:T
Femelle	F _{1+n}	C:C	A:A	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	C:C	A:A	T:C	G:A	T:C	G:G	G:G	T:T
Femelle	F _{1+n}	A:A	T:T	C:C	G:G	A:A	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:A	G:A	T:C
Femelle	<i>An. gambiae</i>	A:A	T:T	C:C	G:G	A:A	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	A:A	A:A	C:C
Femelle	F _{1+n}	C:C	A:A	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	A:A	A:A	C:C
Femelle	F _{1+n}	C:C	A:A	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:G	G:G	T:T
Femelle	F _{1+n}	A:A	T:T	C:C	G:G	A:A	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:G	T:T	G:A	A:A	C:C
Femelle	F _{1+n}	C:C	A:A	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	T:C	G:G	T:T	G:G	T:T	G:G	G:G	T:T

Figure 15: Résultats du génotypage des SNPs localisés dans les « îles de spéciation » des chromosomes X, 2L et 3L: chaque ligne représente le génotype individuel d'un moustique sur les 15 SNPs utilisés. Chaque colonne représente un locus avec deux allèles à l'exception du chromosome X qui comportent un allèle chez les mâles (hémizygotes). La couleur bleu clair représente les allèles homozygotes pour *An. coluzzii*, bleu foncé pour les allèles homozygotes *An. gambiae* et le jaune représente les allèles hétérozygotes.

1.3. Résultats

Au total, 2329 spécimens dont 2063 mâles et 266 femelles échantillonnés dans 97 essais d'*An. gambiae* s.l. à VK7, Soumouso et Bana, ont été spécifiquement identifiés par PCR et génotypés au niveau des 15 SNPs localisés dans les îles de spéciation des chromosomes X, 2L et 3L.

1.3.1. Identification moléculaire des mâles et femelles capturés

A VK7, 1222 moustiques mâles et 194 femelles ont été spécifiquement identifiés dans 41 essais entre 2006 et 2011. La totalité des mâles était capturée dans 40 essais mono-spécifiques dont 39 étaient composés exclusivement d'*An. coluzzii* avec 1182 (96,73%) individus et un essai d'*An. gambiae* avec 16 (1,31%) individus. L'essai restant avec un total de 24 (1,96%) spécimens collectés en 2006 était un mélange de mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Une large majorité (95,83%, soit 23/24) des mâles capturés dans cet essai mixte était de l'espèce *An. coluzzii*. Au total 193 femelles ont été collectées dans les essais de mâles *An. coluzzii* et ont été toutes identifiées comme étant de l'espèce *An. coluzzii*. Une seule femelle *An. gambiae* a été capturée dans l'essai mixte. Aucune femelle n'a été trouvée dans les essais d'*An. gambiae* dans ce site.

A Soumouso, 719 mâles et 72 femelles de moustique ont été échantillonnés dans 31 essais entre 2006 et 2011. Au total, 652 (90,68%) mâles *An. gambiae* étaient capturés dans 26 essais mono-spécifiques, 51 (7,09%) mâles *An. coluzzii* dans 3 essais mono-spécifiques et 16 (2,23%) mâles dans 2 essais mixtes. Ces derniers étaient composés de 12 (75%) spécimens *An. coluzzii* et 4 (25%) *An. gambiae*. Spécifiquement l'un des essais mixtes était représenté par 7 (87,5%) mâles *An. coluzzii* et 1 (12,5%) mâle *An. gambiae* alors que l'autre était composé de 5 (62,5%) mâles *An. coluzzii* et 3 (37,5%) mâles *An. gambiae*. Parmi les 72 femelles 68 (94,44%) ont été capturées dans des essais de mâles *An. gambiae* et 4 (5,56%) dans des essais mixtes mais toutes ont été identifiées comme étant de l'espèce *An. gambiae*.

A Bana un total de 122 mâles a été collecté dans 25 essais mono-spécifiques, avec 65 (53,28%) mâles *An. coluzzii* issus de 16 essais et 57 (46,72%) mâles *An. gambiae* issus de 9 essais. Aucun essaim mixte n'a été détecté à Bana.

1.3.2. Génotypage des SNPs chez les mâles et femelles capturés

Globalement, les résultats de génotypage des SNPs montrent une persistance des introgressions entières ou partielles des « îles de spéciation » 2L et 3L aussi bien chez les mâles que chez les femelles *An. coluzzii* et *An. gambiae* capturés entre 2006 et 2011 dans les essais à VK7 et à Soumouso. Toutefois seuls les individus capturés dans les essais mono-spécifiques ont été pris en compte dans les analyses suivantes (Figure 16 ; Figure 17).

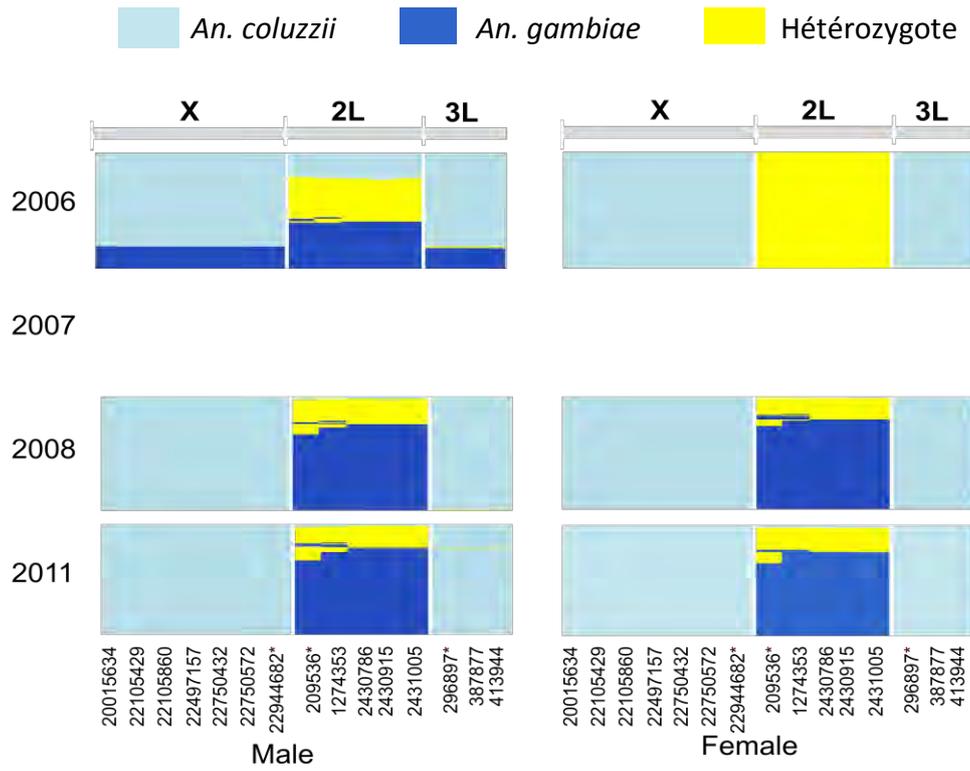
A VK7, le génotypage des SNPs chez un total de 1198 mâles des essais mono-spécifiques a permis d'obtenir spécifiquement 35 (2,92%) individus de l'espèce *An. coluzzii*, 15 (1,26%) *An. gambiae*, 1 (0,08%) hybride F₁ et 1147 (95,74%) hybrides F_{1+n}. Chez les deux types d'hybrides, les génotypes des SNPs de l'île de spéciation du chromosome X ont montré soit un profil *An. coluzzii* ou *An. gambiae* contrairement à ceux des chromosomes 2L et 3L où des introgressions entières ou partielles des « îles de spéciation » ont été observées à des proportions variables selon l'année d'étude (Figure 16). Au total 1145 mâles, soit 99,82% des hybrides F_{1+n} portaient une introgression de l'île de spéciation 2L. La proportion annuelle des individus porteurs d'une introgression de cette île sur le total des mâles capturés dans des essais mono-spécifiques était de 60,24% (50/83) en 2006, 98,17% (484/493) en 2008 et 98,55% (613/622) en 2011. Deux individus présentaient une introgression entière de l'île de spéciation 3L dont un capturé en 2006 et l'autre en 2008 soit 1,20% (1/83) et 0,20% (1/493) des mâles capturés respectivement en 2006 et 2008. Les femelles étaient composées de 2 (1,04%) *An. coluzzii* et 191 (98,96%) hybrides F_{1+n}. Toutes les femelles hybrides F_{1+n} portaient une introgression entière ou partielle de l'île 2L. Les proportions d'introgression dans cette île étaient très élevées, atteignant 100% (1/1) en 2006, 99,29% (141/142) en 2008 et 98% (49/50) en 2011. Aucune femelle hybride F₁ n'a été trouvée à VK7. De plus aucun des échantillons collectés dans ce village en 2007 n'a pu être identifié du fait probablement d'une mauvaise conservation.

A Soumouso, le génotypage des SNPs chez les mâles des essais mono-spécifiques a permis d'obtenir au total, 31 (4,41%) individus *An. coluzzii*, 619 (88,05%) *An. gambiae*, 1 (0,14%) hybride F_1 et 52 (7,40%) hybrides F_{1+n} (Figure 16). Parmi les hybrides F_{1+n} , 2 (3,85%) individus portaient une introgression entière de l'île de spéciation du chromosome X ; les individus porteurs d'introgressions dans les îles 2L et 3L représentaient 40,38% (21/52) et 55,77% (29/52), respectivement. Aucun mâle porteur d'une introgression 2L n'a été capturé dans les essais en 2006 et en 2008. Par contre, les proportions des individus qui portaient l'introgression 2L représentaient 1,71% (7/410) en 2007 et 15,73% (14/89) en 2011 des mâles capturés dans les essais mono-spécifiques. L'introgression 3L était présente chez 7,14% (2/28) des individus capturés en 2006, 3,66% (15/410) en 2007, 6,25% (11/175) en 2008 et 1,12% (1/89) en 2011. Chez les femelles des essais mono-spécifiques 3 (4,41%) hybrides F_{1+n} et 65 (95,59%) *An. gambiae* ont été identifiés par génotypage des SNPs. Toutes les 3 femelles hybrides F_{1+n} dont deux capturées en 2008 et une en 2011 portaient une introgression sur l'île 3L. Aucune femelle *An. coluzzii* et hybride F_1 n'a été capturée dans les essais mono-spécifiques à Soumouso.

A Bana les mâles capturés dans les essais étaient composés de 0,82% (1/122) *An. coluzzii* ; 46,72% (57/122) *An. gambiae* et 52,46% (64/122) hybrides F_{1+n} . Ces derniers portaient tous, une introgression dans l'île de spéciation du chromosome 2L alors qu'aucune introgression n'a été observée dans les « îles de spéciation » X et 3L.

La répartition des hybrides mâles et femelles de première génération (F_1) et des générations successives (F_{1+n}) dans les essais d'*An. coluzzii* ou *An. gambiae* était strictement déterminée par les génotypes de l'île de spéciation dans le chromosome X à VK7, à Soumouso (exceptés 2/53 mâles) entre 2006 et 2011 (Figure 16) et à Bana en 2012.

A) VK7



B) Soumouso

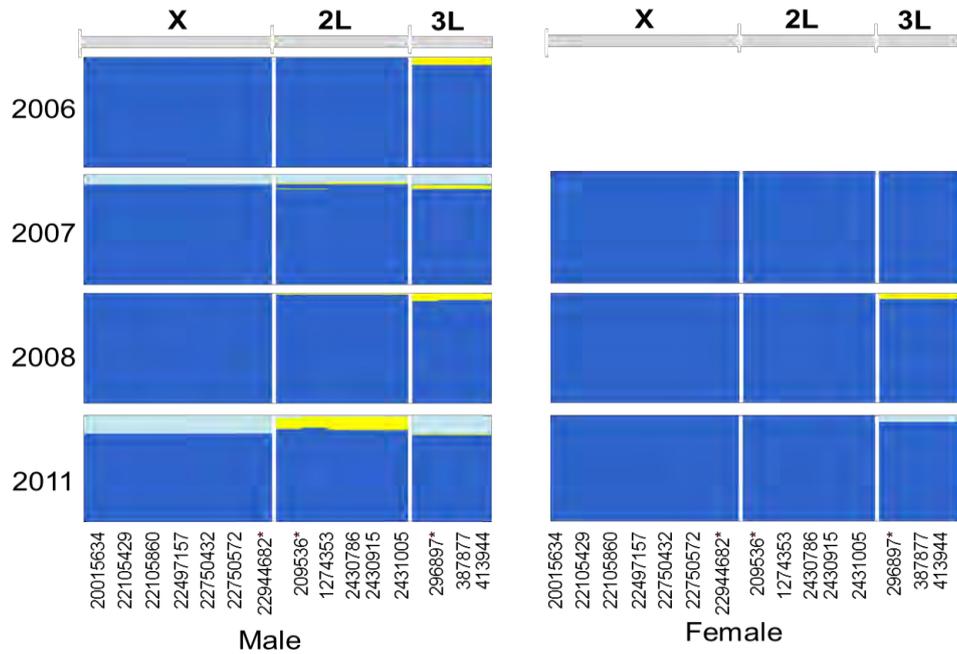
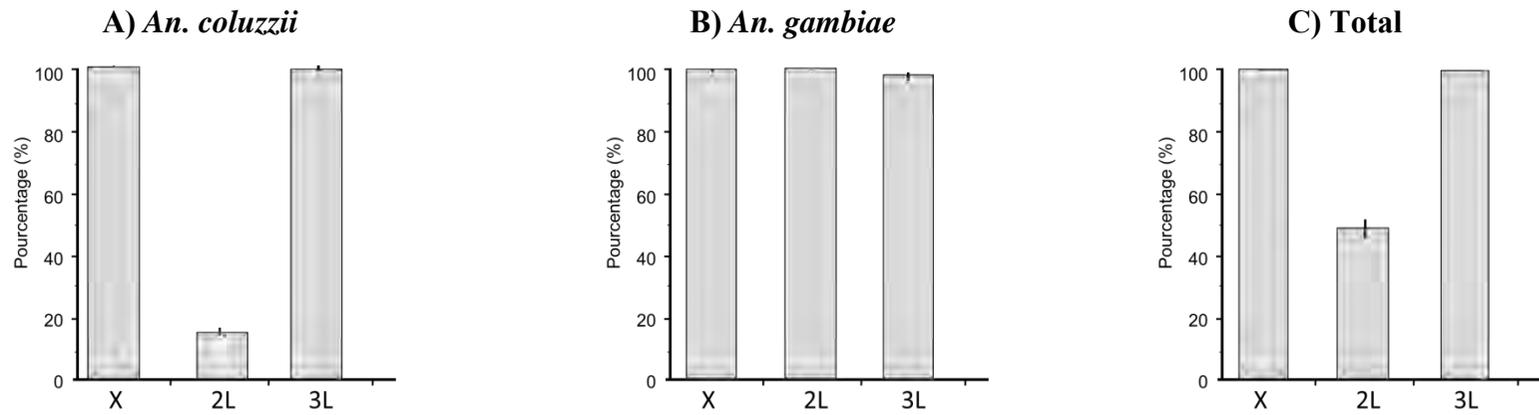


Figure 16: Génomage des SNPs dans les « îles de spéciation » chez les mâles et femelles *An. gambiae* et *An. coluzzii* collectés dans des essais à VK7 (A) et à Soumouso (B) entre 2006 et 2011

Les proportions d'association des « îles de spéciation » X, 2L et 3L aux types d'essaims (*An. gambiae* et *An. coluzzii*) ont été comparées chez les mâles comme chez les femelles de chaque espèce (Figure 17 A, B, D et E). Cette comparaison a été effectuée de nouveau pour le total des individus des deux espèces (Figure 17 C et F).

Comparées deux à deux chez les mâles, les proportions d'association du type d'essaim à chacune des trois « îles de spéciation » étaient significativement différentes (chromosomes : X vs 2L ($P=0,0001$; $df=1$; $\chi^2=1386,9$) ; X vs 3L ($P=0,0003$; $df=1$; $\chi^2=12,09$) et 2L vs 3L ($P=0,0001$; $df=1$; $\chi^2=2357,9$). Des tendances similaires d'association ont été retrouvées chez les femelles (chromosome X vs 2L ($P=0,0001$; $df=1$; $\chi^2=450,95$) ; X vs 3L ($P=0,04$; $df=1$; $\chi^2=4,02$) et 2L vs 3L ($P=0,0001$; $df=1$; $\chi^2=436,27$). Spécifiquement aucune différence significative n'a été trouvée entre les « îles de spéciation » des chromosomes X et 2L chez les mâles *An. gambiae* ($P=0,26$; $df=1$; $\chi^2=1,5$). De même chez les mâles *An. coluzzii*, aucune différence significative n'a été observée entre les chromosomes X et 3L ($P=0,55$; $df=1$; $\chi^2=1,01$). En somme l'association du chromosome 3L était significativement moins forte que celle entre le type d'essaim et l'île de spéciation du chromosome X chez les mâles comme chez les femelles. L'association du type d'essaim avec l'île de spéciation du chromosome 2L était complètement interrompue chez les deux sexes.

Mâle



Femelle

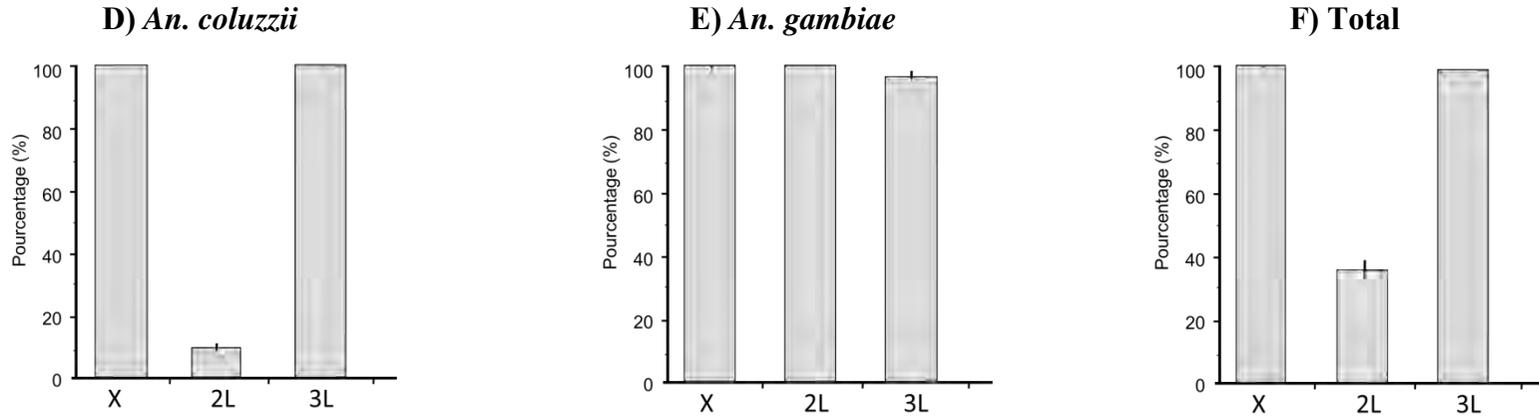


Figure 17: Proportion d'association entre les essais spécifiques et les îles de spéciation chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*

1.4. Discussion

L'isolement reproductif entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* basé sur le comportement d'essaimage a fait l'objet de plusieurs investigations notamment au Burkina Faso et au Mali depuis un peu plus d'une décennie. Les résultats de ces études ont indiqué l'existence d'une forte barrière reproductrice précopulatoire attribuée à la ségrégation spatiale des essaims entre les deux espèces (Tripet *et al.*, 2001 ; Diabaté *et al.*, 2009 ; 2011 ; Sawadogo *et al.*, 2013a ; 2014). Globalement ces études suggèrent que les principales barrières précopulatoires basées sur la ségrégation spatiale des essaims et sur l'accouplement positivement assorti entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* pourraient être reliées à des phénomènes physiologiques ou génétiques encore non élucidés. Aboagye-Antwi *et al.* (2015) ont initié une des rares études génomiques focalisée sur le rôle des « îles de spéciation » dans l'accouplement positivement assorti de ces espèces chez lesquelles des barrières post-zygotiques à la reproduction n'ont pas encore été établies (Diabaté *et al.*, 2007). Investigant l'architecture génomique de l'isolement précopulatoire indépendamment des processus d'isolement post-zygotique intrinsèques, cette étude a démontré une association entre l'île de spéciation du chromosome X et les gènes impliqués dans l'isolement reproductif précopulatoire entre des souches de laboratoire d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* (Aboagye-Antwi *et al.*, 2015).

Notre étude portait sur le rôle que pourraient jouer les îles de spéciation dans la ségrégation spatiale des essaims d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* dans la nature. Nos résultats ont montré que la répartition des hybrides mâles et femelles de générations F_{1+n} dans les essaims d'*An. coluzzii* ou *An. gambiae* était strictement déterminée par les génotypes de l'île de spéciation sur le chromosome X. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Aboagye-Antwi *et al.* (2015) car l'accouplement positivement assorti est suggéré comme une alternative à la ségrégation spatiale dans les essaims mixtes (Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2013a ; 2014) et les deux jouent des rôles synergiques importants dans l'isolement reproductif précopulatoire entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* (Diabaté *et al.*, 2006 ; 2009 ; 2011 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2013a ; 2014 ; Diabaté & Tripet, 2015).

Il a été rapporté que le faible taux de recombinaison des chromosomes sexuels les prédispose à l'accumulation des gènes de l'isolement reproductif précopulatoire et post-zygotique. Des études précédentes ont associé des loci responsables de l'isolement reproductif à des inversions chromosomiques (Corbett-Detig *et al.*, 2012 ; McGaugh *et al.*, 2012), des régions péricentromériques (Carneiro *et al.*, 2010 ; Gimenez *et al.*, 2013) et aux chromosomes sexuels (Saether *et al.*, 2007 ; Bailey *et al.*, 2011 ; Carneiro *et al.*, 2010). Néanmoins, cette étude se focalise sur des espèces cryptiques en sympatrie chez lesquelles les barrières d'isolement post-zygotiques à la reproduction ne sont pas encore établies. L'isolement reproductif précopulatoire entre deux espèces de papillon, *Colias eurytheme* et *C. philodice* était associé à une inversion localisée sur le chromosome X (Grula *et al.*, 1980), alors que ces espèces coexistent dans une zone d'hybridation très limitée. La divergence génomique accentuée par des différenciations contenues dans des inversions sur les autosomes a été rapportée chez une mouche, *Rhagoletis pomonella*, inféodée à différentes plantes (Michel *et al.*, 2010). Cependant, l'isolement précopulatoire impliqué dans ce système est totalement écologie-dépendant et se produit par spécialisation des espèces à différentes plantes hôtes. Il a été largement expliqué par des modèles de divergence génétique, de la migration et du flux de gènes qui relèvent plus de la spéciation micro-allopatric. Paradoxalement, élucider les processus à la base de la structure génomique de la spéciation entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* dont la répartition sympatrique couvre de larges zones de l'Afrique de l'ouest est un défi majeur du fait des modèles contrastés de l'introgession et de la sélection observés dans cette région (Weetman *et al.*, 2012 ; Coetzee *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2013a).

Cette étude a contribué à clarifier le rôle des îles de spéciation dans le processus de divergence d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* et les résultats suggèrent un mécanisme purement génétique. Ainsi, l'île de spéciation de la région péricentromérique du chromosome X faiblement recombiné permet à ces espèces jumelles de maintenir leur intégrité génétique dans les régions d'Afrique Centrale et de l'Est où l'introgession est inhabituelle (Tripet *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2013a) et dans la zone d'hybridation de la côte ouest africaine où le flux de gènes est considérable (Caputo *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2013a). Ces résultats sont compatibles avec le modèle de la spéciation sympatrique dans lequel seule l'île du chromosome X joue un rôle crucial dans la

spéciation en arborant des loci clé de l'isolement reproductif précopulatoire (Seehausen *et al.*, 2008 ; Feder *et al.*, 2012 ; Via, 2012).

Même si les îles de spéciation sur les chromosomes 2L et 3L jouent un rôle similaire que l'île de spéciation du chromosome X cela reste à démontrer car dans cette étude nous n'avons pas trouvé une évidence d'association directe de ces îles avec la ségrégation spatiale des essaims. Toutefois, l'île de spéciation du chromosome 2L pourrait jouer un rôle dans l'isolement reproductif post-zygotique avec probablement une sélection contre les hybrides du fait de l'introgession adaptative du gène Kdr dans cette île. Une étude longitudinale réalisée au Mali a montré une sélection contre les hybrides consécutive à de courts épisodes d'hybridation survenus en 2002 et en 2006 (Lee *et al.*, 2013a). Pour avoir une idée du rôle de l'introgession adaptative de l'île de spéciation 2L dans l'isolement reproductif, Norris *et al.*, (2015) ont suivi son évolution avant, pendant et après le transfert des gènes adaptatives du génome d'*An. gambiae* vers le génome d'*An. coluzzii* dans le même pays. Les génotypes susceptibles trouvés chez les hybrides F₁ suggèrent que le SNP de la résistance Kdr n'affectait pas directement l'accouplement positivement assorti entre les deux espèces. En d'autres termes l'hybridation entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* ne s'effectue pas préférentiellement sur la base des individus porteurs du SNP de la résistance Kdr. Selon les mêmes auteurs, l'introgession adaptative de l'île de spéciation 2L doit être une conséquence de l'hybridation entre les deux espèces et non sa cause.

L'épisode d'une hybridation intense en 2006 avec 14,5% d'hybrides F₁ (Norris *et al.*, 2015) pourrait s'expliquer par une perturbation de la dynamique des populations due à la distribution en masse des moustiquaires imprégnées d'insecticide au Mali en 2005-2006. L'utilisation en masse des MII aurait beaucoup plus affecté les populations d'*An. coluzzii* supposées plus susceptibles que celles d'*An. gambiae*. Le gène kdr responsable de la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires a été trouvé chez certaines populations d'*An. gambiae* une vingtaine d'années (Tripet *et al.*, 2007) avant d'être signalé pour la première fois en 2000 chez *An. coluzzii* (Weill *et al.*, 2000). L'impact de cette intervention devrait être plus important chez les femelles que chez les mâles de cette espèce du fait que la survie des femelles dépend plus de l'environnement anthropique.

De par leur exophilie les mâles *An. coluzzii* n'auraient pas été en contact avec l'insecticide et pourraient survivre, avec une très faible probabilité de rencontrer des femelles conspécifiques dans leur recherche de partenaires sexuelles. Ainsi pour se reproduire ils peuvent opter pour des accouplements interspécifiques avec des femelles *An. gambiae*. Cette explication reste plausible dans ces conditions écologiques. Cependant elle pose une question fondamentale relative aux phénomènes d'hybridation et d'introgession vis-à-vis des conditions écologiques caractérisées par une extrême rareté d'une des deux espèces jumelles.

Chapitre 2 : Extrême dominance asymétrique et hybridation saisonnière des populations d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* à l'Ouest du Burkina Faso

Les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article suivant:

Abdoulaye Niang, Patric S. Epopa, Simon P. Sawadogo, Hamidou Maïga, Lassana Konaté, Ousmane Faye, Roch K. Dabiré, Frédéric Tripet and Abdoulaye Diabaté. Does extreme asymmetric dominance promote hybridization between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* in seasonal malaria mosquito communities of West Africa? *Parasites & Vectors* (2015) 8:586 DOI 10.1186/s13071-015-1190-x

2.1. Problématique

Plusieurs zones d'hybridation où le flux de gènes entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* est supposé être très élevé ont été découvertes le long de la côte ouest africaine (Caputo *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2008), suggérant soit un comportement sexuel différent ou une perte de la pression de sélection contre les hybrides (Caputo *et al.*, 2011 ; Marsden *et al.*, 2011 ; Weetman *et al.*, 2012). Des études de génomique des populations ont posé l'hypothèse que les femelles *An. gambiae* pourraient plus opter à s'accoupler avec des mâles hétérospécifiques que les femelles *An. coluzzii* (Lee *et al.*, 2013a). Les résultats de terrain supportent l'idée que l'extrême dominance de l'une des espèces pourrait créer des opportunités de formation de couples interspécifiques, soulevant des questions relatives au transfert effectif du sperme et à l'hybridation suivant ces événements d'accouplements croisés. Une étude récente des essaims réalisée dans deux villages du Burkina Faso où les populations de moustiques étaient dominées soit par *An. coluzzii* ou par *An. gambiae* a permis d'identifier des couples interspécifiques dont la plupart ont impliqué des femelles d'*An. gambiae* (Dabiré *et al.*, 2013). Malheureusement, aucun sperme hétérospécifique transféré n'a été détecté dans cette étude. A la date d'aujourd'hui, les conditions écologiques qui favorisent le modèle du flux de gènes entre les populations d'*An. gambiae* et *An. coluzzii* décrit en Afrique de l'Ouest restent encore peu connues.

2.2. Méthodologie

2.2.1. Echantillonnage des moustiques

Dans la présente étude, l'échantillonnage des essaims a été conduit dans les trois sites d'étude comme décrit au chapitre III.1.1.2 des Matériels et méthodes: à VK7, un des villages de la Vallée du Kou où *An. coluzzii* domine toute l'année, à Soumousso, un village de savane classique où *An. gambiae* domine pendant la saison des pluies et à Bana où les deux espèces sont présentes à des proportions presque similaires pendant la saison des pluies. Un grand effort d'échantillonnage et d'identification a été réalisé dans le but de détecter des essaims mixtes de mâles, des femelles visitant des essaims hétérosécifiques et des couples intra ou intersécifiques. Dans le même temps, des femelles au repos ont été collectées dans les maisons d'habitation à VK7 et à Soumousso ainsi que décrit aux chapitres III.1.1.3 ; l'objectif étant d'estimer le taux d'hybridation entre *An. gambiae* et *An. coluzzii* au stade adulte.

Très spécifiquement, les femelles capturées en couple avec un mâle hétérosécifique ont été disséquées pour vérifier s'il y a eu transfert de sperme. Ainsi, la spermathèque isolée a été ouverte afin de transférer la boule de sperme dans un tube de 1,5 ml comme il a été décrit dans les études précédentes (Tripet *et al.*, 2001 ; 2005). Le sperme a été analysé en utilisant un protocole d'extraction d'ADN pour des échantillons de petite taille en utilisant le ChargeSwitch® gDNA Micro Tissue Kit (Life Technologies, USA) suivant les instructions du fabricant (Voir Annexe 1).

Enfin une prospection larvaire a également été faite à VK7 et à Soumousso comme décrit au chapitre III.1.1.1 des Matériels et méthodes pour la recherche des hybrides. L'idée fondamentale ici étant que, si une sélection contre les hybrides existe, elle serait moins manifeste contre les stades larvaires. De ce fait la proportion des hybrides au stade larvaire devrait être plus élevée que la proportion au stade adulte. En somme, regarder le taux d'hybridation à différents niveaux de vie des moustiques (pontes, larves, adultes au repos et accouplement mixte) nous indiquerait la force de cette sélection si elle existe.

2.2.2. Identification des moustiques par PCR

L'extrait d'ADN de chaque moustique ainsi que celui du sperme (Figure 18 et 19) ont été génétiquement analysés en utilisant la PCR-RFLP (Fanello *et al.*, 2002) (cf Matériels et méthodes III.1.1.4).

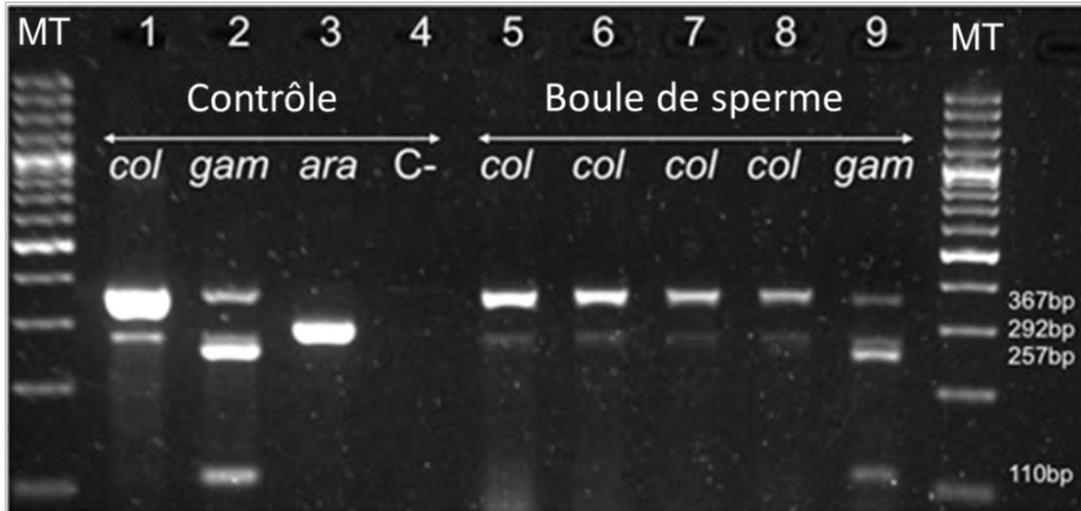


Figure 18: Caractérisation spécifique de la boule de sperme extraite de la spermathèque des femelles inséminées d'*An. gambiae* s.s. Les bandes d'ADN sont représentées par deux marqueurs de taille de 100 pb (MT) ; contrôle négatif (C-, 4) ; boules de sperme récupérées des spermathèques de femelles capturées en couples interspécifiques d'*An. gambiae* (col, 5-8) et *An. coluzzii* (gam, 9). Les bandes attendues sont indiquées en (pb).

Du fait que les hybrides mâles soient hémizygotes et possèdent une seule copie du chromosome X, ils ne peuvent pas être identifiés en utilisant les méthodes moléculaires classiques de diagnostic sur la base du simple polymorphisme observé dans la région de l'ADNr sur ce chromosome. Par conséquent, toutes les larves ont été identifiées spécifiquement et leur sexe déterminé en utilisant une PCR multiplexe. Celle-ci résulte de la combinaison des amorces spécifiques du chromosome Y utilisées ailleurs pour la détection du sperme (Ng'habi *et al.*, 2007) avec les amorces ciblant une insertion spécifique d'un SINE (Short Interspersed Element) localisé dans la division 6 du chromosome X et généralement utilisées pour l'identification de 3 espèces du complexe *An. gambiae* (Santolamazza *et al.*, 2008). Les amorces (S200X6-1F 5'-TCGCCTTAGACCTTGCCTTA-3'; S200X6-1R 5'-CGCTTCAAGAATTCGAGATAC-3'; S23-F 5'-CAAAACGACAGCAGTTCC-3'; S23-R 5'-TAAACCAAGTCCGTCGCT-3') ont été combinées dans une réaction après

avoir vérifié la possibilité de formation des dimères en utilisant un puissant outil de contrôle de biologie moléculaire en ligne disponible sur le site <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/multipleprimer/>. La solution mixte contenant ainsi 2 µl d'ADN, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µl du tampon 5X, 0,2 mM de chacun des 4 DNTPs, 1,5 pmol de chacun des deux amorces revers et forward S200X6.1, 2 pmol de chacun des S23 et 0,05 unités de Taq polymérase dans un volume total de 25 µl a été utilisée. La PCR a été réalisée dans un Thermocycler de type Bio-Rad S1000™ avec une dénaturation initiale à 94°C pour une durée de 10 mn, suivie par 35 cycles de 94°C de 30 secondes, 54°C de 30 secondes, et 72°C d'une minute, suivis par une étape d'élongation finale à 72°C de 10 minutes. Les produits de la PCR ont été séparés par électrophorèse dans un gel pour générer des bandes spécifiques du sexe et de l'espèce (Figure 19).

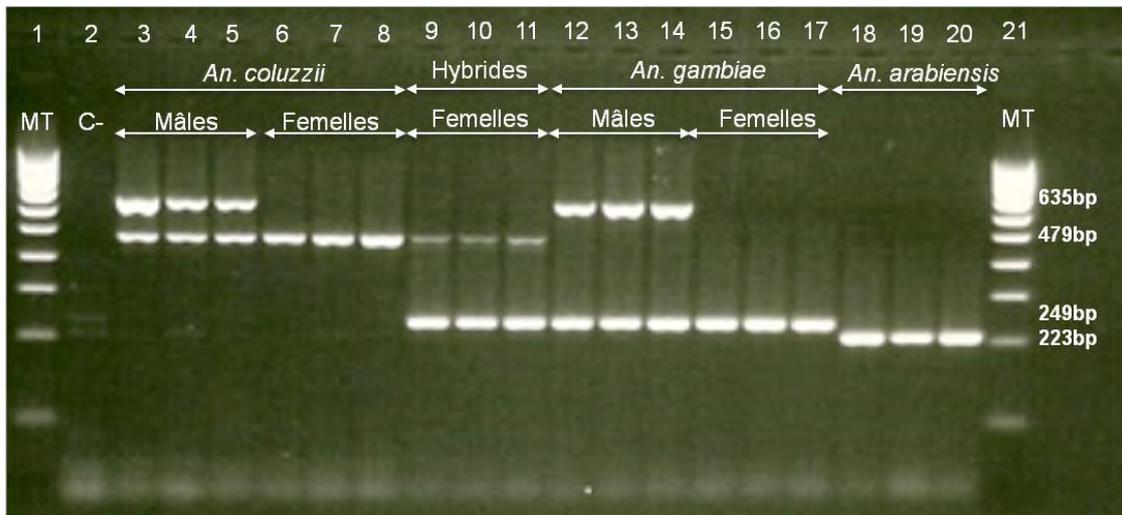


Figure 19: PCR multiplexe pour le sexage et l'identification spécifique des larves d'*An. gambiae* s.l. Les bandes d'ADN sont représentées par deux marqueurs de taille de 100 pb (1, 21) ; contrôle négatif (C-, 2) ; mâles (3-5) et femelles (6-8) *An. coluzzii*, femelles hybrides (9-11), mâles (12-14) et femelles (15-17) *An. gambiae* s.s. et femelles *An. arabiensis* (18-20). Les bandes attendues sont indiquées en (pb).

2.2.3. Analyse des données

Les proportions des inséminations croisées ont été comparées aux taux d'hybridation calculés chez les larves et chez les femelles au repos pour chaque espèce. Cependant, les échantillons mâles issus de la cohorte larvaire et leurs génotypes n'ont pas été utilisés dans l'analyse subséquente des données.

2.3. Résultats

2.3.1. Suivi des essaims

A VK7, 2289 moustiques mâles échantillonnés de 44 essaims ont été spécifiquement identifiés. Parmi ceux-ci, 41 essaims (93,18%) étaient exclusivement composés d'*An. coluzzii*, et les 3 essaims restants (6,82%) étaient un mélange de mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* avec une large majorité d'*An. coluzzii* (98,08%, soit 256/261) (Tableau 2). Trente-une femelles en vol libre c'est-à-dire non couplées collectées des différents essaims ont été identifiées comme étant de l'espèce *An. coluzzii*. Un total de 138 couples était collecté dans 12 essaims. Parmi ceux-ci, 133 soit 96,38% étaient des couples mono-spécifiques d'*An. coluzzii*. Les 5 couples restants collectés dans 3 essaims étaient hétérospécifiques dont 4 composés de femelles *An. gambiae* couplées à des mâles *An. coluzzii* et un couple avec la combinaison inverse. Des couples mono-spécifiques d'*An. gambiae* n'ont pas été observés (Tableau 2). Des analyses répétées par PCR-RFLP de l'ADN du sperme extrait des spermathèques ont montré que ces accouplements interspécifiques ont conduit à un transfert effectif du sperme dans les 5 cas (Figure 18). La proportion des rares accouplements croisés d'*An. gambiae* a atteint 100% soit 5/5 (IC_{95%}: 56,6-100) alors que, pour *An. coluzzii* la proportion des accouplements croisés était inférieure à 3,62% soit 5/138 (IC_{95%}: 1,56-8,20) (Test de Fisher-Irwin : N=143 ; df=1 ; P<0.001) (Figure 20).

A Soumouso, au total, 1046 mâles ont été collectés dont 1014 (96,94%) mâles *An. gambiae* s.s. dans 27 essaims mono-spécifiques et 32 (3,06%) mâles *An. coluzzii* dans un essaim mono-spécifique aussi. En plus, 49 couples et 2 femelles en vol libre collectés dans 13 essaims ont été tous identifiés comme appartenant à l'espèce *An. gambiae* (Tableau 2).

A Bana un total de 352 mâles a été collecté dans 37 essaims mono-spécifiques, avec 120 (34,09%) mâles *An. coluzzii* issus de 18 essaims et 232 (65,91%) mâles *An. gambiae* issus de 19 essaims (Tableau 2). Aucun essaim mixte n'a été détecté ni à Soumouso, ni à Bana (Tableau 2).

Tableau 2: Accouplement positivement assorti incomplet entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* dans les essais collectés à VK7, Soumousso et Bana

Localités	Essais		Mâles non couplés		Femelles non couplées		Couple mono-spécifique [†]		Couple mixte [†]	
	Essais	Espèces	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>
VK7	41	<i>An. coluzzii</i>	2028	0	29	0	97	0	0	3
VK7	0	<i>An. gambiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
VK7	3	mixte	256	5	2	0	36	0	1	1
Soumousso	1	<i>An. coluzzii</i>	32	0	0	0	0	0	0	0
Soumousso	27	<i>An. gambiae</i>	0	1014	0	2	0	49	0	0
Soumousso	0	mixte	-	-	-	-	-	-	-	-
Bana	18	<i>An. coluzzii</i>	120	0	0	0	0	0	0	0
Bana	19	<i>An. gambiae</i>	0	232	0	0	0	0	0	0
Bana	0	mixte	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	60	<i>An. coluzzii</i>	2180	0	29	0	97	0	1	0
Total	46	<i>An. gambiae</i>	-	1246	0	2	0	49	0	4
Total	3	mixte	256	5	2	0	36	0	0	0
Total	109		2436	1251	33	0	133	49	1	4

[†] Indique l'espèce des femelles collectées en couples mono-spécifique ou mixte.

2.3.2. Femelles sauvages collectées au stade larvaire

L'échantillonnage des larves a été conduit à VK7 et à Soumouso de juillet à novembre 2011 à la même période que celle de l'échantillonnage des essaims. Il s'en suit un sexage et une identification de l'espèce de 1438 larves sauvages collectées dans 12 gîtes larvaires à VK7 (36,4%) et 21 à Soumouso (63,6%). A VK7, parmi les 659 larves identifiées 312 (47,3%) étaient des femelles et 347 (52,7%) des mâles. Les 779 larves échantillonnées à Soumouso étaient composées de 407 (52,2%) femelles et 372 (47,8%) mâles. Seules les femelles ont été utilisées pour la comparaison des fréquences relatives des deux espèces jumelles et la détection de leurs hybrides (Tableau 3).

Comme attendue, la grande majorité des 312 larves de 1^{er} stade (L1) collectées à VK7 et identifiées était *An. coluzzii* (98,72%). Seulement 3 *An. gambiae* (0,96%) et une larve hybride (0,32%) ont été trouvés. A Soumouso, 82,56% des 407 larves étaient de l'espèce *An. gambiae*, 16,95% *An. coluzzii*, et seulement 2 spécimens (0,49%) hybrides. Les taux d'hybridation résultant du stade larvaire étaient de 0,32% et 0,25% pour *An. coluzzii* et *An. gambiae* à VK7 respectivement ; et de 2,82% et 0,59% à Soumouso (Tableau 3, Figure 20).

2.3.3. Femelles au stade adulte collectées au repos

Quant à la collecte des femelles au repos dans les maisons d'habitation, au total 733 femelles adultes, dont 329 (44,9%) à VK7 et 404 (55,1%) à Soumouso ont été collectées à la même période que l'échantillonnage des larves et des essaims. A VK7 98,78% des femelles adultes étaient de l'espèce *An. coluzzii*, 2 (0,61%) d'*An. gambiae*, et 2 (0,61%) des hybrides. A Soumouso, 73,02% étaient de l'espèce *An. gambiae* et 26,73% d'*An. coluzzii*, alors qu'une seule femelle hybride (0,25%) a été détectée. A VK7 les taux d'hybridation au stade adulte étaient de 0,61% pour *An. coluzzii* et 50% pour *An. gambiae* alors qu'à Soumouso ils étaient très faibles pour les deux espèces avec des valeurs respectives de 0,92 et 0,34% (Tableau 3 et Figure 20).

Tableau 3: Fréquences des femelles *An. coluzzii*, *An. gambiae* et hybrides au stades larvaire et adulte au repos à VK7 et à Soumouso

Localité	Stade de vie	Nombre (%)				Taux d'hybridation (IC _{95%})		
		<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	Hybrides	Total	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	Total
VK7	larves	308 (98,72)	3 (0,96)	1 (0,32)	312	0,32 (0,05-1,81)	25,0 (4,5-69,9)	0,32 (0,06-1,81)
VK7	adultes	325 (98,78)	2 (0,61)	2 (0,61)	329	0,61 (0,16-2,22)	50,0 (0,15-84,99)	0,61 (0,17-2,22)
VK7	Total	633 (98,75)	5 (0,78)	3 (0,47)	641	0,47 (0,16-1,38)	37,5 (13,68-69,42)	0,47 (0,16-1,37)
Soumouso	larves	69 (16,95)	336 (82,56)	2 (0,49)	407	2,82 (0,78-9,70)	0,59 (0,16-2,13)	0,49 (0,13-1,78)
Soumouso	adultes	108 (26,73)	295 (73,02)	1 (0,25)	404	0,92 (0,16-5,01)	0,34 (0,06-1,89)	0,25 (0,04-1,14)
Soumouso	Total	177 (21,82)	631 (77,81)	3 (0,37)	811	1,67 (0,57-4,78)	0,47 (0,16-1,38)	0,37 (0,13-1,08)
Total	larves	377 (52,43)	339 (47,15)	3 (0,42)	719	0,79 (0,27-2,30)	0,88 (0,30-0,25)	0,42 (0,14-1,22)
Total	adultes	433 (59,07)	297 (40,51)	3 (0,41)	733	0,69 (0,23-2,00)	1,00 (0,34-2,90)	0,41 (0,14-1,20)
Total		810 (55,78)	636 (43,80)	6 (0,41)	1452	0,74 (0,34-1,59)	0,94 (0,43-0,20)	0,41 (0,19-0,90)

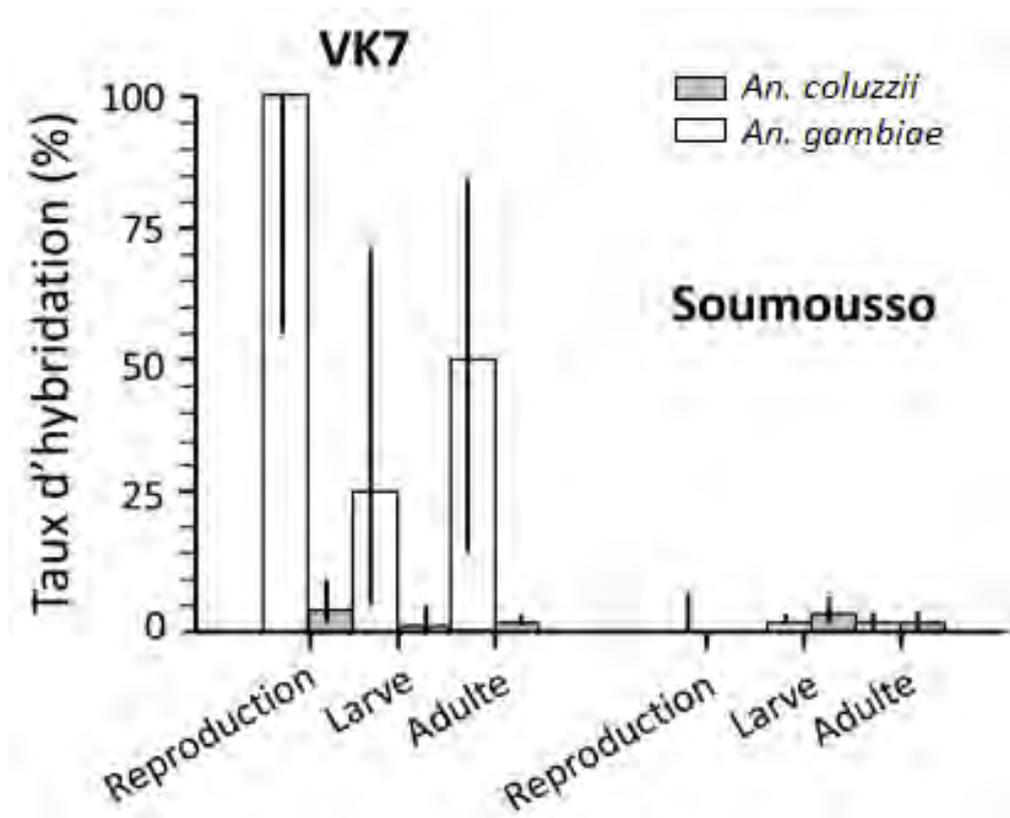


Figure 20: Comparaison des taux d'hybridation aux stades de reproduction (couples collectés dans les essais), larvaire et adulte au repos.

2.3.3. Taux d'hybridation et la sélection contre les hybrides

La différence entre les taux d'hybridation au stade de reproduction estimés par la proportion des inséminations croisées observées dans les essais et chez les femelles aux stades adulte au repos et larvaire des populations de VK7 et Soumoussou ainsi que la possibilité de sélection contre les hybrides ont été analysées en utilisant un modèle de Régression Logistique (Tableau 4). Le taux d'hybridation a été significativement plus élevé chez *An. gambiae* à VK7 qu'à Soumoussou et il y'avait une forte interaction entre espèce et population sur le taux d'hybridation. En d'autre terme, *An. gambiae* s'hybridait à un taux nettement plus élevé à VK7 lorsqu'il est moins abondant mais à un taux comparable à celui d'*An. coluzzii* à Soumoussou (Tableau 4). Basé sur le même modèle statistique, aucune évidence d'une sélection plus forte contre les hybrides opérant au stade larvaire versus stade adulte comparativement aux individus de la forme parentale n'a été détectée (Chi-square sur odds ratios: $P= 0,851$). Cependant, les résultats ont montré une baisse considérable des taux

d'hybridation du stade de reproduction dans les essais aux stades larvaire ou adulte (Chi-square sur odds ratios: $P < 0,003$ dans les deux cas), suggérant une présence d'une pression de sélection post-copulatoire qui agit légèrement après l'insémination croisée ou au stade très précoce de la vie larvaire.

Tableau 4: Régression Logistique des effets de la localité (VK7 et Soumouso), espèces jumelles et le stade de vie sur les taux d'hybridation entre *An. coluzzii* and *An. gambiae*

Source de variation	Nparm	ddl	L	P-value
Localité	1	1	9.04	0,0026
Espèce	1	1	16.94	<0,001
Stade de vie	2	2	10.78	0,005
Espèce*Localité	1	1	27.46	<0,001

Nparm= Nombre de paramètres, ddl=degré de liberté, P-value<0,05

2.4. Discussion

Les résultats de cette étude confirment l'importance de la ségrégation spatiale des essais comme un mécanisme d'isolement reproductif entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* dans différentes localités des zones écologiques soudanienne et sahélienne (Diabaté *et al.*, 2009 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2014). En outre, cette étude offre de nouveaux axes de recherche sur les conditions environnementales qui maintiennent une hybridation résiduelle et des potentialités d'introgession entre des taxa cryptiques dans leurs communautés naturelles. Pendant la saison pluvieuse de 2011, des essais mixtes ont été détectés uniquement dans le village de VK7 où *An. coluzzii* représentait l'espèce hautement prédominante sur *An. gambiae*. Les quelques spécimens adultes *An. gambiae* capturés à VK7 étaient tous retrouvés dans des essais hétérospécifiques, suggérant qu'ils ne pouvaient probablement pas trouver des accouplements conspécifiques dans un habitat saturé par des essais d'*An. coluzzii*. La dominance asymétrique était moins prononcée à Soumouso où aucun essaim mixte n'a été détecté malgré le fait que de rares essais mixtes aient été signalés dans cette localité dans les années précédentes (Diabaté *et al.*, 2006 ; Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2014). Finalement à Bana, où les deux espèces jumelles ont été trouvées à des fréquences

comparables, aucun essaim mixte n'a été non plus détecté. Crucialement, la présence de rares individus *An. gambiae* dans les essais d'*An. coluzzii* a conduit aux accouplements et inséminations croisés tel qu'il a été décrit dans une étude de terrain réalisée au Mali (Tripet *et al.*, 2001). A la date d'aujourd'hui nous ne savons pas pourquoi les inséminations croisées n'ont jamais pu être confirmées dans les couples mixtes capturés dans les essais suivis dans les mêmes localités Burkinabè étudiées précédemment (Dabiré *et al.*, 2013). Cependant, grâce à la technique d'extraction utilisée ici la contamination de la boule du sperme ou de la réaction PCR par de l'ADN hétérospécifique était moindre (Tripet *et al.*, 2005). Elle permettait également de refaire la PCR plusieurs fois. Ce qui nous a donné une bonne assurance dans l'interprétation de nos résultats.

Quatre des cinq couples mixtes étaient formés par des femelles *An. gambiae* et de mâles *An. coluzzii* confirmant les observations précédentes sur l'analyse du sperme (Tripet *et al.*, 2001) et les déductions faites sur les analyses génétiques des spécimens hybrides de mâles adultes (Lee *et al.*, 2013), suggérant que les femelles *An. gambiae* sont plus réceptives aux accouplements croisés que celles d'*An. coluzzii*. Cependant, aucune des populations étudiées n'est exactement semblable à celle d'*An. gambiae* à VK7 en terme d'espèce rare vis-à-vis d'*An. coluzzii*. Ainsi, comprendre si le taux élevé des inséminations croisées d'*An. gambiae* est lié à des différences comportementales intrinsèques ou simplement à des variations saisonnières de son abondance conduisant souvent à l'extrême dominance d'*An. coluzzii* dans les zones soudanienne et sahélienne va requérir des études supplémentaires. La présence des femelles *An. coluzzii* dans les essais mixtes et la capture d'une femelle de la même espèce en couple avec insémination effective par un mâle *An. gambiae* tendent à supporter la dernière hypothèse.

La présence des mâles et femelles *An. gambiae* dans les essais d'*An. coluzzii* suggère deux mécanismes possibles qui mènent à un accouplement croisé. Premièrement, les mâles *An. gambiae* isolés ne pouvant pas former des essais mono-spécifiques entre eux, pourraient joindre les essais d'*An. coluzzii* formant ainsi des essais mixtes. Il a été démontré que le nombre de couples et celui des femelles libres étaient corrélés avec le nombre de mâles formant les essais (Diabaté *et al.*, 2011 ; Sawadogo *et al.*, 2014). Ceci pourrait être perçu comme une stratégie d'adaptation tendant vers un équilibre du coût de l'accouplement croisé une fois dans un essaim de grande taille et de ne pas pouvoir s'accoupler tout simplement. A supposer que l'accouplement dans les essais est essentiellement gouverné par le choix que

les femelles portent sur les mâles. Dans ce cas la présence des mâles des deux espèces dans les essaims mixtes va créer des conditions dans lesquelles les femelles visiteuses d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* pourraient faire de très rares erreurs pendant une très courte durée de reconnaissance du partenaire sexuel, entraînant ainsi l'hybridation de l'espèce minoritaire. Un deuxième mécanisme non exclusif est supporté par l'observation des accouplements interspécifiques par des femelles *An. gambiae* dans des essaims composés exclusivement de mâles *An. coluzzii* comme c'est le cas à VK7. Ici, les femelles *An. gambiae* l'espèce rare, tout comme leurs mâles, à force de chercher un partenaire sexuel, pourraient se retrouver dans les essaims mixtes. Une fois à ce niveau, elles décident de s'accoupler avec les mâles de l'autre espèce pour ne pas ressortir infructueuses. Il se pourrait bien aussi qu'elles soient accouplées de force, si les mâles de l'espèce dominante sont très harassants. La valeur adaptative de ces stratégies serait remarquablement dépendante du coût associé à l'hybridation. Par conséquent, ce coût peut varier selon les conditions environnementales. La possibilité que les accouplements croisés se réalisent par simples erreurs adaptatives sans aucun bénéfice lié à la fitness ne peut expliquer l'imminente évidence que les hybrides F_1 et F_{1+n} peuvent être trouvés dans plusieurs populations après des efforts adéquats d'échantillonnage et de génotypage (Lee *et al.*, 2013a).

L'accouplement positivement assorti et les barrières de reproduction extrinsèques sont des éléments clé dans le processus de spéciation incipiente qui éventuellement aboutira à un isolement reproductif post-zygotique intrinsèque (Lee *et al.*, 2013a ; Fontaine *et al.*, 2015 ; Neafsey *et al.*, 2015). Bien qu'il y ait l'évidence des adaptations écologiques divergentes liées aux préférences de l'habitat larvaire (Lehmann & Diabaté, 2008 ; Simard *et al.*, 2009 ; Kamdem *et al.*, 2012), au comportement d'évitement des prédateurs (Diabaté *et al.*, 2008 ; Gimonneau *et al.*, 2010), et aux stratégies d'estivation chez les adultes (Dao *et al.*, 2014), la baisse de la fitness des hybrides n'est jusqu'aujourd'hui qu'une déduction indirectement supportée par des données de la génomique des populations (Lee *et al.*, 2013a ; Norris *et al.*, 2015 ; Weetman *et al.*, 2012 ; Clarkson *et al.*, 2014). Ici, nous montrons une forte corrélation entre les taux d'hybridation déduits du taux d'inséminations croisées au stade de reproduction et ceux estimés à partir de collections de femelles de larves et de femelles adultes au repos réalisées dans les mêmes villages à des périodes synchrones. Les taux d'hybridation dépendant fortement de la localité considérée, étaient élevés chez *An. gambiae* à VK7 où *An. coluzzii* était hautement dominant mais plus bas à Soumouso où *An. gambiae* dominait

fortement (Figure 20). Contrairement aux conclusions de l'étude précédente (Dabiré *et al.*, 2013), ces données suggèrent que l'accouplement croisé chez les hybrides ainsi obtenus crée des opportunités d'introgressions effectives entre espèces jumelles. Le taux d'hybridation était plus élevé pour *An. gambiae* comparé à *An. coluzzii* à VK7 alors que, vue la rareté de cette espèce jumelle dans cet habitat, il ne devrait pas en résulter des taux d'hybridation aussi élevés pour cette espèce dans les deux types d'habitat. Crucialement, les taux d'hybridation baissent significativement du stade de reproduction au stade larvaire mais pas du stade larvaire au stade adulte. Présentement, on ne sait pas si des phénomènes d'hybridation comparables à celui décrit ici pour VK7 en 2011 ont lieu chaque année dans des habitats similaires. Des études précédentes dans cette zone ont, d'une façon répétitive rapporté la formation des essaims mixtes à des fréquences très faibles, suggérant que l'hybridation pourrait aussi être très commune (Dabiré *et al.*, 2013 ; Sawadogo *et al.*, 2014). Il faut noter que cette étude n'a pas permis de détecter d'autres sources possibles de sélection agissant tardivement contre les hybrides au cours de leur vie, par exemple au stade adulte. C'est ce que nous testerons dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Estimation de l'isolement reproductif post-zygotique entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de deux communications orales et un article en cours de rédaction :

Niang Abdoulaye, Sawadogo Simon, Maïga Hamidou, Dabiré K Roch, Tripet Frederic, Lehmann Tovi and Diabaté Abdoulaye. Assessment of the ecologically dependent postmating isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *6th international congress of Society for Vector Ecology (SOVE)*, 22-27 September 2013, California, USA.

Niang Abdoulaye, Sawadogo Simon, Maïga Hamidou, Dabiré K Roch, Tripet Frederic, Lehmann Tovi and Diabaté Abdoulaye. Evidence of ecological selection against hybrids as a post-zygotic isolation between M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *6th MIM Pan-African Malaria Conference*, 6-11 October 2013, Durban, South Africa.

Abdoulaye Niang, Nignan Charles, Hamidou Maïga, Simon P. Sawadogo, Lassana Konaté, Ousmane Faye, Roch K. Dabiré, Frederic Tripet and Abdoulaye Diabaté. Assesment of the ecologically-dependant post-zygotic isolation between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*

3.1. Problématique

Des études récentes analysant des données génomiques ont suggéré que les hybrides entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* font l'objet d'une sélection dans la plupart des aires de distribution des deux espèces jumelles (White *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013a). Cependant aucune étude expérimentale n'a été réalisée en milieu naturel ou semi-naturel pour le confirmer. Pour élucider la cause de la rareté des hybrides, des expériences de transplantations larvaires sont nécessaires pour servir de complément aux données de laboratoire et de la génomique des populations disponibles afin de démontrer l'efficacité des barrières post-zygotiques écologie-dépendantes entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Dans ce chapitre, nous testons la survie et la performance des hybrides pour un certain nombre de caractères dans l'environnement naturel des parents. Par le moyen d'une expérience de transplantations, nous avons examiné le développement potentiel des espèces parentales *An. coluzzii* et *An. gambiae* comparé à celui de leurs hybrides réciproques.

3.2. Méthodologie

Des femelles gorgées ou gravides d'*An. gambiae* s.l. ont été collectées au repos dans des maisons d'habitation ainsi que décrit au chapitre III.1.2.1 de la section Matériels et méthodes. De retour au laboratoire, ces femelles ont été mises en ponte individuelle. En moyenne 5 larves issues de chacune des pontes ont été analysées par PCR de même que la femelle ayant pondu afin de déterminer l'espèce d'appartenance. Les larves ont ensuite été regroupées par espèce dans des bacs d'élevage et maintenues jusqu'au stade adulte (cf Matériels et méthodes III.1.2.2). Les adultes ont ensuite été croisés ainsi que décrit au chapitre III.1.2.2 et les femelles encore mises en ponte individuelle. Les larves issues de ces pontes ont enfin été ramenées sur le terrain et transplantées en milieu rizicole à raison de 150 larves de stade L1 (50 *An. coluzzii* + 50 *An. gambiae* + 50 hybrides col/gam, ou 50 *An. coluzzii* + 50 *An. gambiae* + 50 hybrides gam/col cf Matériels et méthodes III.1.2.3) en présence ou absence de prédateurs. Quatre paramètres ont été évalués. Il s'agit de 1) le taux d'émergence des larves transplantées, 2) le sexe-ratio, 3) le temps de développement larvaire, 4) et la taille des ailes.

3.3. Résultats

3.3.1. Le taux d'émergence globale

Un total de 5 400 larves de stade L1 a été transplanté dans 36 cages placées dans les eaux des rizières avec ou sans prédateurs. Les larves étaient composées d'*An. coluzzii*, *An. gambiae* et leurs hybrides réciproques col/gam et gam/col. Nous avons évalué leurs performances mesurées en termes de succès à l'émergence des adultes, leur temps de développement larvaire et la taille de leurs ailes. Globalement 1 987 spécimens soit un taux d'émergence de 36,8%, ont été collectés. Une différence significative du sexe-ratio a été trouvée, avec 908 (45,7%) mâles et 1079 (54,3%) femelles ($P < 0,0001$; $\chi^2 = 23,01$). L'identification des espèces a pu être réalisée sur 1070 femelles alors que l'amplification de 9 spécimens n'a pas réussi.

3.3.2. Comparaison du succès à l'émergence des adultes

Globalement le succès à l'émergence est 2,5 fois plus élevé dans les cages sans prédateurs que les cages en présence de prédateurs (Figure 21A) et le développement des espèces parentales est 2 fois meilleur à l'absence des prédateurs qu'à leur présence. D'une façon similaire le succès à l'émergence des hybrides est 1,5 fois plus élevé dans les cages sans prédateurs (Figure 21B). La comparaison du succès à l'émergence des différentes espèces et leurs hybrides réciproques est illustrée dans le tableau de contingence (Tableau 5). Dans la première série des données *An. gambiae* se développe mieux que *An. coluzzii* et l'hybride col/gam à l'absence des prédateurs, alors que ces derniers sont plus performants en présence des prédateurs (Tableau 5a $\chi^2 = 12,8$; $P = 0,0003$; Tableau 5c $\chi^2 = 12,2$; $P = 0,0005$). Aucune différence significative du succès à l'émergence d'*An. coluzzii* et l'hybride col/gam n'a été trouvée. Leur succès à l'émergence est comparativement égal aussi bien en l'absence qu'en présence des prédateurs ($\chi^2 = 0,005$; $P = 0,94$), suggérant que les hybrides dont les « mamans » sont *An. coluzzii* survivent mieux l'attaque des prédateurs. Dans la deuxième série des données, *An. gambiae* et l'hybride gam/col ont montré un succès au développement plus élevé que *An. coluzzii* en l'absence des prédateurs, alors qu'en présence des prédateurs ils étaient de faibles compétiteurs (Tableau 5d $\chi^2 = 6,5$; $P = 0,01$; Tableau 5e $\chi^2 = 15$; $P = 0,0001$). Aucune différence significative n'a été trouvée entre *An. gambiae* et l'hybride gam/col, suggérant encore une fois un effet maternel. Conformément aux analyses du tableau de contingence, une

analyse de régression logistique a montré que la prédation a un impact significatif sur le succès au développement des différentes espèces ($t = -4,76$; $P < 0,00005$).

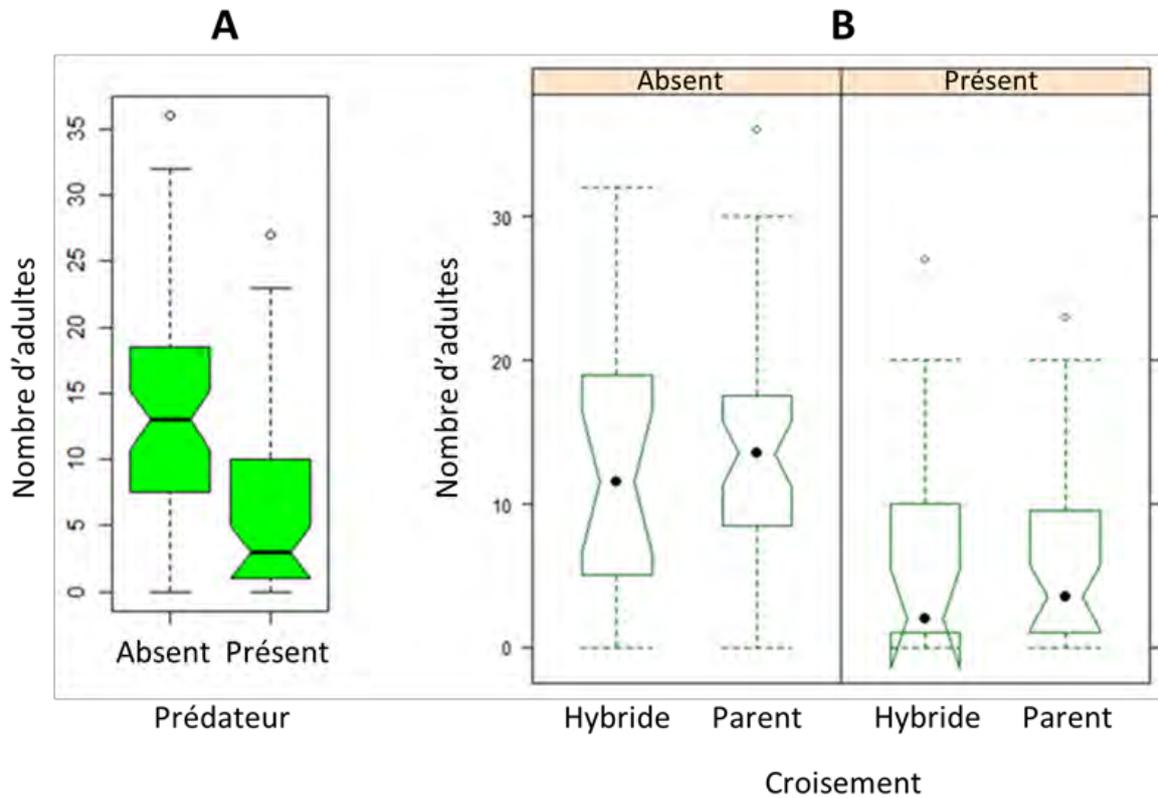


Figure 21: Nombre de moustiques émergents : (A) Comparaison des taux d'émergence des adultes dans les cages avec et sans prédateurs. (B) Comparaison des taux d'émergence des femelles des espèces parentales et leurs hybrides réciproques. Les rectangles rétrécis au milieu verts (21A) et blancs (21B) indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux intersectant les lignes verticales en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les traits (21A) et les points (21B) noir foncés correspondent à la médiane.

Tableau 5: Tableaux de contingence comparatifs du succès au développement d'*An. coluzzii*, *An. gambiae* et leurs hybrides réciproques en l'absence et en présence des prédateurs

Tableau 5a			Tableau 5b			Tableau 5c		
	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>		<i>An. coluzzii</i>	Hybride col/gam		<i>An. gambiae</i>	Hybride col/gam
Absent	30,1	40,2	Absent	30,1	29,6	Absent	40,2	29,6
Présent	39,4	22,5	Présent	39,4	38,1	Présent	22,5	38,1
$\chi^2=12,8$; P=0,0003			$\chi^2=0,005$; P=0,94			$\chi^2=12,2$; P=0,0005		
Tableau 5d			Tableau 5e			Tableau 5f		
	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>		<i>An. coluzzii</i>	Hybride gam/col		<i>An. gambiae</i>	Hybride gam/col
Absent	24,3	39,7	Absent	24,3	35,9	Absent	39,7	35,9
Présent	40,1	36,9	Présent	40,1	22,9	Présent	36,9	22,9
$\chi^2=6,5$; P=0,01			$\chi^2=15$; P=0,0001			$\chi^2=2,44$; P=0,11		

3.3.3. Le temps de développement larvaire

Le temps de développement des femelles ainsi que des mâles dans les cages en présence des prédateurs était significativement plus court que celui des individus des deux sexes élevés en absence de prédateurs reflétant probablement un manque de compétition pour la nourriture et de l'espace due à la prédation dans les premières types de cages ($P < 0,0001$; $t = 10,83$ et $P < 0,0001$; $t = 9,35$ respectivement ; Figure 22). Du fait que la prédation n'affectait pas de la même façon les différentes espèces et leurs hybrides réciproques, le temps de développement dans les cages avec prédateurs tendait à la baisse dans l'analyse suivante. Globalement les mâles se développaient plus vite que les femelles ($P = 0,0001$; $t = 3,88$; Figure 22).

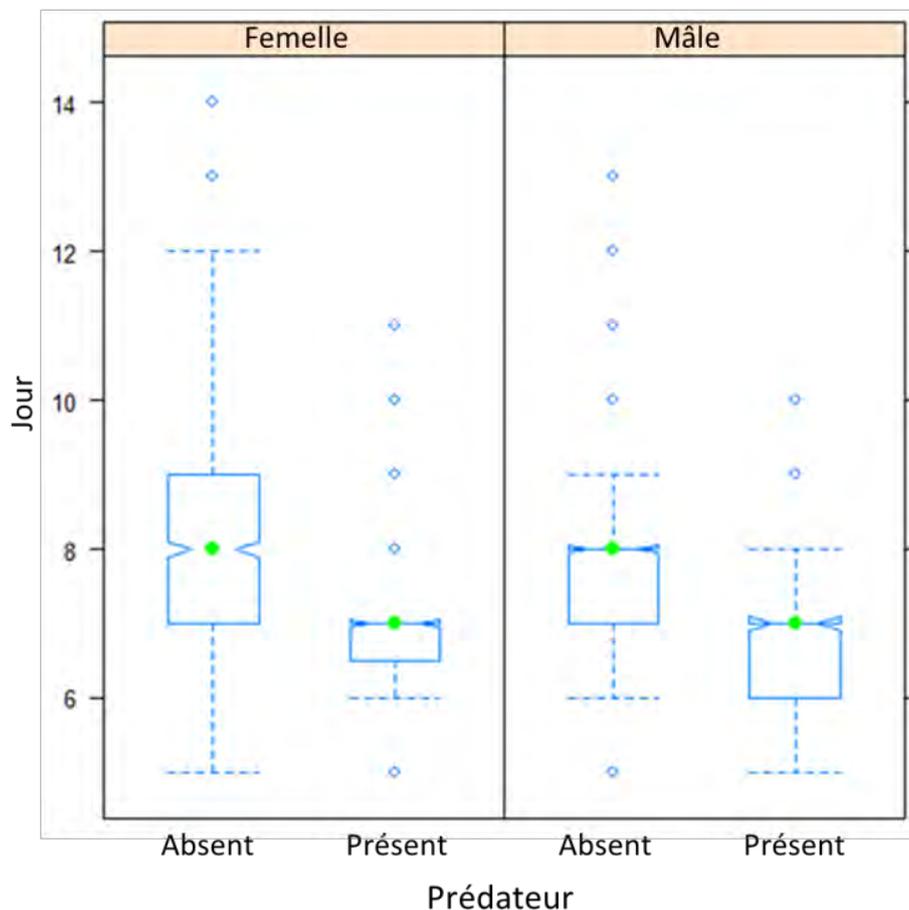


Figure 22: Comparaison du temps de développement larvaire des mâles et femelles dans les cages avec et sans prédateurs. Les rectangles retrassés indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les points verts correspondent à la médiane.

La comparaison spécifique du temps de développement entre les espèces parentales et les hybrides réciproques a été faite uniquement pour les femelles étant donné que les mâles hybrides ne pouvaient pas être identifiés avec précision. En somme l'étude du temps de développement des espèces montrait une dispersion allant de 6 à 14 jours avec une moyenne de 7 jours (Figure 23). Des comparaisons multiples utilisant le test de Tukey pour la recherche de différences significatives du temps de développement entre les différentes espèces sont montrées à la Figure 23. Les comparaisons ayant des intervalles qui ne chevauchent pas la ligne verticale entrecoupée sont significativement différentes. Cette ligne verticale indique qu'il n'y a pas de différence entre les valeurs moyennes pour les comparaisons des espèces indiquées sur l'axe y. Ainsi, nous pouvons dire qu'*An. gambiae* a un temps de développement significativement plus court qu'*An. coluzzii* ainsi que les deux types hybrides. Aucune différence n'a été trouvée entre *An. coluzzii* et les hybrides (Figure 23).

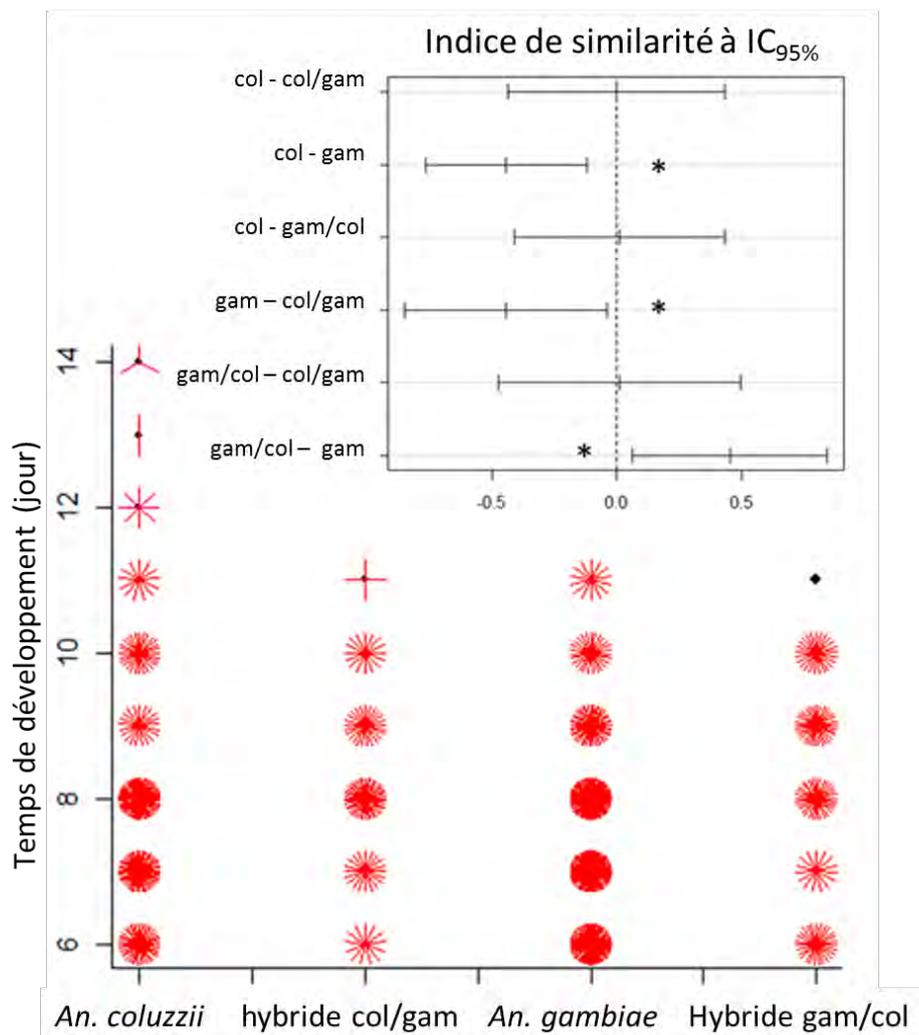


Figure 23: Temps de développement des espèces parentales et les hybrides réciproques

3.3.4. La mesure de la taille des ailes

La variation de la taille des ailes entre les espèces parentales *An. coluzzii*, *An. gambiae* et leurs hybrides réciproques col/gam et gam/col a été estimée en utilisant la mesure de la longueur et la largeur de l'aile droite. Etant donné qu'aucune différence significative n'a pu être trouvée entre les cages avec prédateurs et les cages sans prédateurs ni sur la longueur ($P=0,262$; $t=0,63$; $df=133$) ou sur la largeur ($P=0,225$; $t=1,21$; $df=133$ Figure 24) des ailes, nous avons supprimé les cages avec prédateurs dans l'analyse suivante pour être conforme à l'analyse du succès à l'émergence. L'analyse de la variance de la taille des ailes n'a montré aucune différence significative sur la longueur de l'aile ($P=0,104$; $F=2,12$) et la largeur non plus ($P=0,252$; $F=1,39$) entre espèces parentales et leurs hybrides réciproques (Figure 25).

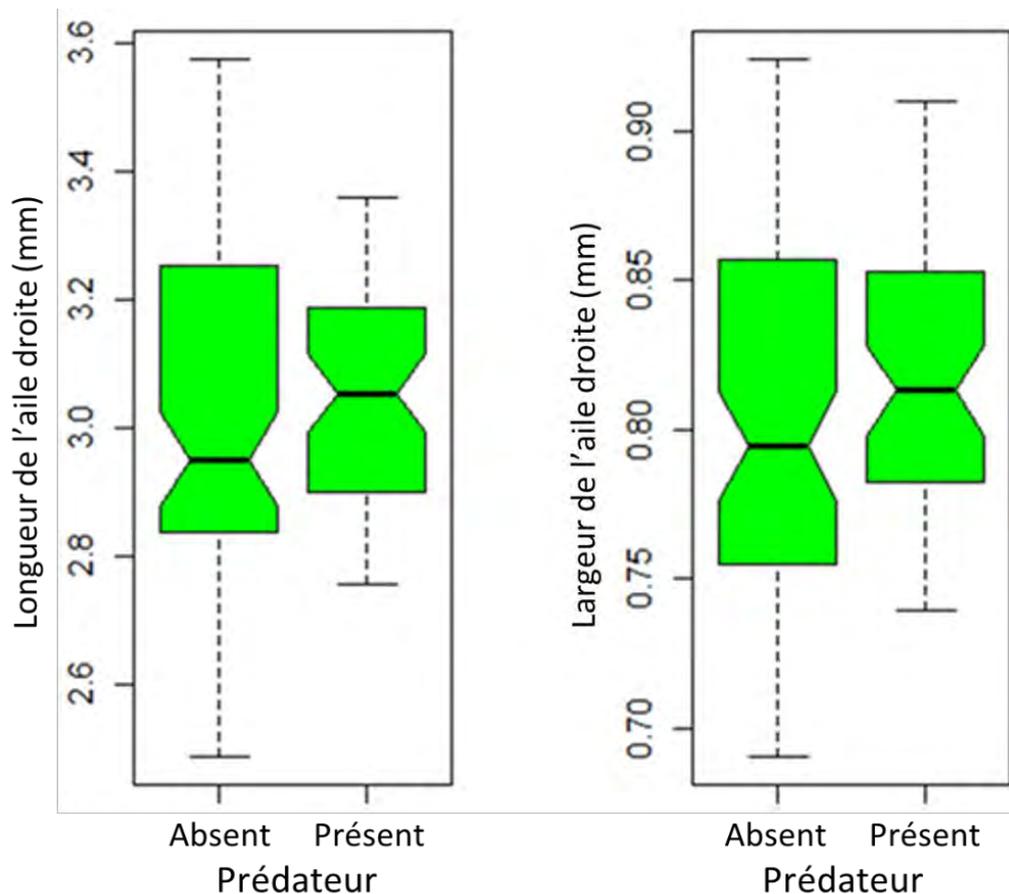


Figure 24: Taille des ailes des adultes émergents des cages avec et sans prédateurs. Les rectangles verts retrassis au milieu indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux interseptant les lignes verticales en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les traits noir foncé correspondent à la médiane.

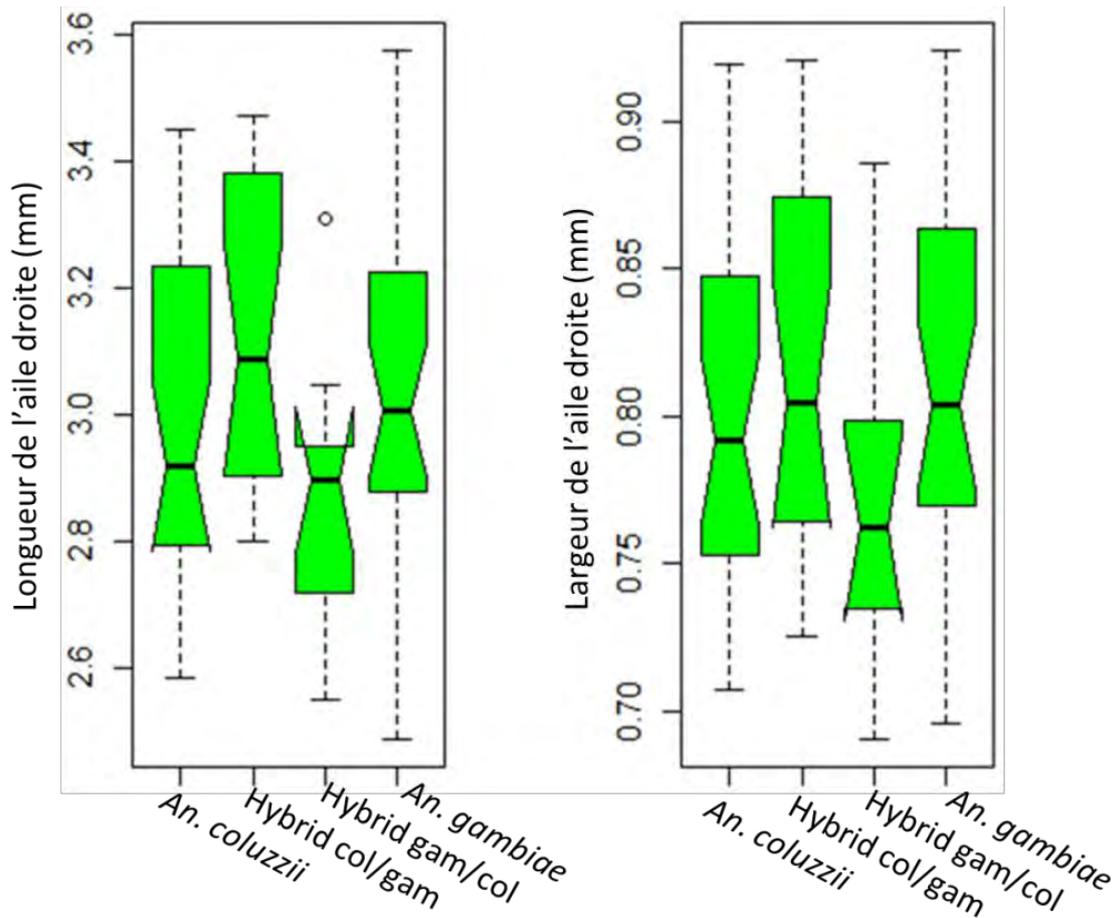


Figure 25: Taille des ailes des espèces parentales et leurs hybrides réciproques. Les rectangles verts retrassis au milieu indiquent la dispersion des données. Les traits horizontaux intersectant les lignes verticales en pointillé représentent les valeurs maximale et minimale de cette dispersion. Les traits noir foncé correspondent à la médiane.

3.4. Discussion

Sous l'hypothèse de la spéciation écologique, l'isolement reproductif survient comme une conséquence de la sélection naturelle divergente entre différents environnements (Schluter, 1996 ; 2000). Ici nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'isolement reproductif post-zygotique écologie-dépendant, une des prédictions de la spéciation écologique entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Dans des études expérimentales, Diabaté *et al.* (2008) investiguant les différences adaptatives entre les deux espèces jumelles, ont mis en évidence le rôle de la prédation comme une des forces écologiques majeures conduisant à la ségrégation de l'habitat entre les deux espèces (Diabaté *et al.*, 2005 ; 2008). En effet, ces auteurs ont trouvé une

différence significative dans l'habilité des espèces à exploiter les différents gîtes larvaires. En l'absence de prédateurs, *An. gambiae* survit mieux que *An. coluzzii* mais c'est plutôt le contraire en présence de prédateurs. Les gîtes larvaires temporaires à faible densité de prédateurs sont plus favorables au développement d'*An. gambiae* alors que *An. coluzzii* se développe mieux dans des gîtes larvaires permanents avec un niveau de prédation plus élevé. Cette étude suggère que la prédation larvaire module le schéma de la ségrégation de l'habitat entre les deux espèces comme cela a été confirmé par plusieurs autres études (Diabaté *et al.*, 2008, Simard *et al.*, 2009 ; Gimonneau *et al.*, 2010 ; 2012a ; 2012b ; Roux *et al.*, 2013).

La prédiction que la rareté des hybrides entre les deux espèces sur le terrain pourrait résulter de la réduction de la fitness de ces hybrides est couramment supportée par des données de génomique des populations (White *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2013a) mais cela n'a jamais été expérimentalement testé sur le terrain. Du fait que la pression de sélection contre les hybrides en milieu naturel puisse être responsable de la divergence des espèces elles-mêmes, des études ont démontré la nécessité d'évaluer l'influence de la prédation larvaire sur les hybrides dans leurs environnements parentaux. Ici nous avons étendu les études de transplantations larvaires d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* (Diabaté *et al.*, 2005 ; 2008) à leurs hybrides réciproques col/gam et gam/col en présence et en l'absence des prédateurs. Ainsi, des larves de stade L1 des 4 groupes générés par la technique de l'accouplement forcé ont été transplantées dans des gîtes larvaires produits dans les rizières de la Vallée du Kou. Nous avons examiné la survie des larves dans chaque sous-population en présence et en l'absence des prédateurs pour détecter des interactions entre les espèces parentales et leurs hybrides réciproques. Nos résultats ont montré un effet significativement élevé de la prédation sur les proportions des adultes émergents. Ces résultats sont comparables aux résultats des études précédentes qui ont révélé qu'*An. coluzzii* était plus efficace qu'*An. gambiae* en présence des prédateurs (Diabaté *et al.*, 2008), probablement grâce à son meilleur comportement de camouflage et d'évitement des prédateurs (Gimonneau *et al.*, 2010 ; Roux *et al.*, 2013).

Estimant le succès du développement larvaire, les valeurs observées dans cette étude montrent que l'hybride col/gam était similaire à *An. coluzzii*. Cette similarité a été aussi retrouvée entre l'hybride gam/col et *An. gambiae*. Du fait que les hybrides col/gam et gam/col soient issus de femelles *An. coluzzii* et *An. gambiae* respectivement, ce résultat suggère un effet maternel dans la réponse anti-prédation des larves dans les conditions écologiques de notre étude. Bien que la taille des ailes des adultes émergents n'ait pas varié

significativement, les deux types hybrides, col/gam et gam/col semblent prendre avantage de leurs parents maternels pour la survie sous la pression de prédation sélective. On parle d'effets maternels lorsque le phénotype des mamans ou leur expérience vis-à-vis des conditions écologiques ou environnementales influence le phénotype de leurs descendances. L'impact de l'effet maternel sur le phénotype de la progéniture a été reporté dans plusieurs études (Bernardo, 1996a ; Fox & Mousseau, 1996 ; Mousseau & Fox, 1998). En effet, il a été démontré que les mères peuvent conférer des adaptations phénotypiques à leurs descendances aux changements stressants de leur environnement local (Mousseau & Dingle, 1991 ; Galloway, 1995). Divers traits probablement influencés par des effets maternels génèrent souvent des différences entre les individus de la descendance chez les hybrides réciproques. Par exemple la taille des graines chez les plantes (Byers *et al.*, 1997), la taille du corps chez les lemmings (Boonstra & Hochachka, 1997), l'induction à la diapause chez les insectes (Mousseau & Dingle, 1991) et le nombre d'ovarioles chez la drosophile (Starmer *et al.*, 1998) ont été attribués aux effets maternels. Utilisant des données de la littérature sur des hybrides réciproques pour examiner l'influence relative des effets maternels sur les différences phénotypiques entre sous espèces ou des populations d'espèces Reinhold, (2002) a montré une contribution significative des effets maternels sur le comportement et la morphologie des mammifères. En accord avec cette conclusion, la taille et le développement des individus de la descendance des mammifères sont souvent influencés par l'âge, la taille et les conditions environnementales des parents femelles (Ellis *et al.*, 2000). Pakkasma *et al.* (2003) ont investigué l'importance relative de la génétique et des effets maternels comme déterminants des variations phénotypiques de la viabilité et des traits liés à la viabilité chez la grenouille, *Rana temporaria*. Les effets maternels ont représenté la plus importante source de variations pouvant atteindre 70% de variance de la probabilité de survie. Leur action sur la taille et la forme des individus de la descendance a été trouvée fortement associée à la taille des œufs variant d'une femelle maternelle à l'autre sous la dépendance de l'environnement. Chez les insectes, les effets maternels peuvent avoir aussi une grande influence sur les caractères des individus de la descendance (Kerver & Rotman, 1987 ; Fox & Savalli, 1998 ; Gil *et al.*, 1999 ; Hockham *et al.*, 2001 ; Royle *et al.*, 2001). Il a été rapporté que les effets maternels sur l'isolement reproductif post-zygotique sont très communs au sein des populations du genre *Drosophila* (Kerver & Rotman, 1987). Chez *Drosophila pseudoobscura*, la différence entre les individus de la génération F₁ issus des croisements réciproques était sous le contrôle des effets maternels (Dobzensky, 1933). La cause génétique de la non viabilité des hybrides entre

les espèces du complexe *D. melanogaster* inclut clairement des interactions entre le génotype de la maman et celui du zygote qui peuvent être interprétées comme des effets maternels du fait que les hybrides survivent si leurs maman est *D. melanogaster* mais ils meurent au stade embryonnaire si leur maman est l'espèce jumelle, *D. simulans* (Watanabe *et al.*, 1977 ; Hutter *et al.*, 1990).

Le temps de développement, c'est-à-dire la période allant de l'éclosion de la larve à l'émergence de l'adulte est très crucial pour la survie des moustiques. La durée de la vie larvaire a ainsi un important rôle sur les paramètres de développement des populations du fait d'abord, de sa relation directe avec l'âge de la maturité sexuelle (Dingle, 1990 ; Foster, 1995), mais aussi de son influence indirecte sur la taille et la fécondité (Roff, 1986 ; Foster, 1995). Nos résultats n'ont pas montré des variations significatives de la taille des ailes mais le temps de développement larvaire a significativement varié entre espèces parentales et hybrides réciproques. Des effets maternels sur le temps de développement ont été signalés chez *D. melanogaster* (Millis & Hartmann-Goldstein, 1985).

La distorsion du sexe-ratio à la faveur des femelles reflète soit, le sexe-ratio des larves qui ont été introduites dans les cages de transplantation au début de l'expérience ou un résultat de la règle de Haldane. Selon cette dernière, lorsque l'un des sexes est absent, rare, ou stérile chez les hybrides F₁ issus d'un croisement entre deux races ou espèces, ce sexe est la plupart le sexe hétérogame (Haldane, 1922). Plusieurs espèces de la classe des Insectes sont régies par cette règle (Laurie, 1997) qui semble être un modèle standard de l'évolution de la stérilité et la non-viabilité (Coyne & Orr, 1989 ; 1997). Ce modèle épistatique est largement expliquée par l'existence des gènes complémentaires (Bateson, 1909 ; Dobzhansky, 1936 ; Muller, 1940) qui peuvent produire la non-viabilité ou la stérilité entre deux populations sympatriques. En effet, les allèles divergents deviennent fixés à différents loci entre populations et causent une incompatibilité seulement, lorsqu'ils se retrouvent ensemble chez les génotypes hybrides. Si des gènes ou des complexes de gènes complémentaires des chromosomes sexuels ont des allèles récessifs de la stérilité des hybrides, le sexe hétérogame souffrira plus tôt des effets d'incompatibilités avant le sexe homogame (Turelli & Orr, 1995). Cependant, plusieurs observations sur les diptères ont inspiré d'autres modèles. Ainsi, au sein du genre *Drosophila* la règle de Haldane concernant la stérilité prédomine largement celle pour la non-viabilité (Wu & Davis, 1993). Les facteurs de la stérilité semblent s'accumuler plus rapidement chez les mâles contrairement aux loci de la non-viabilité. La stérilité des

mâles a été observée chez les moustiques hybrides du genre *Aedes*. Toutefois, aucun isolement reproductif post-zygotique intrinsèque n'est encore établi entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* (Diabaté *et al.*, 2007) alors que l'effet de baisse de la fitness des hybrides pouvant résulter des incompatibilités génétiques serait plus important dans des environnements plus hostiles (Rundle & Whitlock, 2001). Une meilleure compréhension de ces aspects nécessite d'autres investigations.

Chapitre 4 : Rôle des réserves nutritionnelles et la taille sur le succès reproducteur des mâles *An. coluzzii* et *An.gambiae* s.s.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article suivant:

Maïga H, Niang A, Sawadogo SP, Dabiré RK, Lees RS, Gilles JR, Tripet F, and Diabaté A. Role of nutritional reserves and body size in *Anopheles gambiae* males mating success. *Acta Tropica* 132S (2014) S102–S107

4.1. Problématique

Les réserves nutritionnelles accumulées au cours du développement larvaire et à chaque repas sucré pendant la vie adulte sont des facteurs déterminants pour la survie et le succès reproducteur (Foster, 1995). Pour s'accoupler le mâle a besoin de voler. La dépense énergétique nécessaire pour ce vol provient des sucres et du glycogène issus des repas sucrés (Yuval *et al.*, 1994 ; Bargielowski *et al.*, 2012). Par conséquent, une étude globale du niveau de variations des ressources énergétiques disponibles à différents états physiologiques chez des mâles collectés à différents moments de la journée permettrait d'estimer l'énergie allouée aux activités essentielles telles que l'essaimage et l'accouplement. Dans ce chapitre nous étudions la variation des réserves énergétiques entre les mâles nouvellement émergés, au repos dans les habitations humaines et en activité d'essaimage chez les populations naturelles d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*. Spécifiquement, nous déterminerons d'abord, le bilan énergétique des sucres totaux et du glycogène chez des mâles sauvages collectés à VK7 et à Soumousso. En comparant ensuite, le bilan énergétique des mâles couplés à celui des mâles non-couplés dans les essais, nous montrerons si le succès à l'accouplement est lié ou non à la disponibilité des réserves énergétiques. Enfin, nous mesurerons la taille des mâles et évaluerons son importance dans le succès à l'accouplement.

4.2. Méthodologie

Les moustiques collectés ainsi qu'il suit dans les Matériels et méthodes, section III.2.1 ont été identifiés morphologiquement (Gillies & De Meillon, 1968). Seuls les moustiques mâles d'*An. gambiae* s.l. ont été conservés pour le dosage des principaux métabolites (sucres totaux, glycogène, protéines et lipides) par spectrophotométrie (cf Matériels et méthodes III.2.2.2) et la mesure de la taille des ailes (cf Matériels et méthodes III.2.3).

4.3. Résultats

4.3.1. Variations des réserves énergétiques en fonction de l'activité des mâles

Les sucres totaux, le glycogène, les lipides et les protéines des différents groupes de moustiques ont été quantifiés. Les mâles au repos avaient significativement plus de réserves en sucres totaux que les mâles nouvellement émergés (Mann-Whitney $U=218$; $P<0,0001$; Figure 26 : Sucres totaux) ainsi que les mâles collectés dans les essais ($U=1204$; $P<0,0001$). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les mâles nouvellement émergés et les mâles des essais ($U=716$; $P=0,38$). Toutefois, la différence était significative entre ces deux groupes lorsque les mâles des essais étaient collectés seulement cinq minutes après le début de l'essaimage ($U=110$; $P=0,0028$). Pour les réserves en glycogène, seuls les mâles au repos comparés aux mâles des essais ont montré une différence significative ($U=1879$; $P=0,0146$; Figure 26 : Glycogène). Les réserves en lipides et en protéines n'ont pas varié de façon significative entre les groupes ($P>0,05$; Figures 26 : Lipides ; Protéines).

Lorsque les réserves des mâles collectés au repos (matin et soir) et dans les essais ont été comparées (Tableau 6), des différences significatives en sucres totaux ($P<0,0001$; Kruskal-Wallis) et en glycogène ($P=0,039$; Kruskal-Wallis) ont été observées entre les trois groupes. Les mâles au repos collectés le matin, ont montré la plus forte réserve en sucres, suggérant que 59% des sucres totaux sont brûlés pendant le repos avant même que les mâles participent aux essais au crépuscule. De même, les réserves en glycogène sont plus élevées chez les mâles au repos collectés le matin mais subissent une réduction de 32% le soir à l'heure des essais (Tableau 6). Aucune différence en lipides et protéines n'a été observée entre les différents groupes ($P>0,05$; Tableau 6).

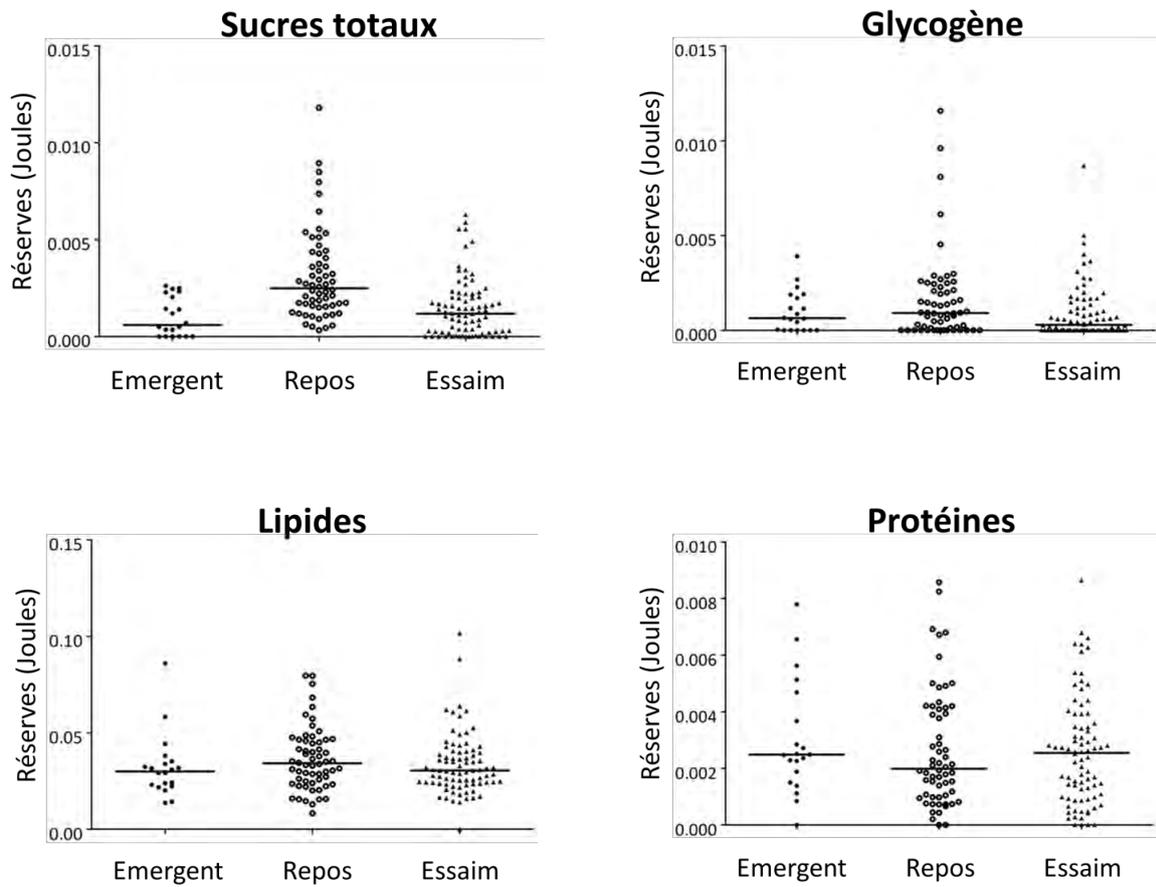


Figure 26: Comparaison des réserves énergétiques des mâles nouvellement émergés (Emergent), des mâles au repos (matin + soir) et dans des essaims (pic)

Tableau 6 : Valeurs moyennes des sucres totaux, du glycogène, des lipides et des protéines contenues dans différents groupes de moustiques collectés au repos (matin, soir) et en activité d'essaimage

	Mâles au repos (Matin)	Mâles au repos (Soir)	Mâles (Essaims)	P (H ; df)
Sucres totaux (J)	$4,4 \times 10^{-3} \pm 0,0005$	$1,8 \times 10^{-3} \pm 0,0002$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 0,0002$	$<0,0001^*$ (40,47 ; 2)
Glycogène (J)	$1,9 \times 10^{-3} \pm 0,0005$	$1,3 \times 10^{-3} \pm 0,003$	$0,9 \times 10^{-3} \pm 0,0002$	0,039* (6,48 ; 2)
Lipide (J)	$39 \times 10^{-3} \pm 0,003$	$34 \times 10^{-3} \pm 0,0005$	$34 \times 10^{-3} \pm 0,002$	0,121 (4,22 ; 2)
Protéine (J)	$2,9 \times 10^{-3} \pm 0,0004$	$2,5 \times 10^{-3} \pm 0,0003$	$2,6 \times 10^{-3} \pm 0,0002$	0,876 (0,26 ; 2)

J indique l'unité d'énergie (Joule) ; * moyennes significatives. Un total de 30 mâles collectés le matin, 30, le soir dans 20 concessions, 162 mâles des essaims (54 essaims) ont été utilisés dans cette analyse.

4.3.2. Bilan énergétique des mâles des essaims d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*

Les réserves en sucres totaux des moustiques collectés en F1 (5mn après le début de l'essaimage) étaient plus élevées que celles des mâles collectés en F3 (fin de l'essaimage, 25 min après le début) aussi bien chez *An. coluzzii* que chez *An. gambiae* (Mann Whitney ; VK7 : $U=758$; $P=0,0004$; Figure 27A et Soumouso : $U=105$; $P=0,0497$; Figure 27B). Il en était de même pour les réserves en glycogène (VK7 : $U=837$; $P=0,022$; Figure 27C et Soumouso : $U=83$; $P=0,023$; Figure 27D). Ces résultats suggèrent que l'activité d'essaimage impliquerait environ 50 à 60% des réserves en sucres (VK7 : 48,5% ; Soumouso : 56,2%) et en glycogène (VK7 : 53,1% ; Soumouso : 59%). Dans l'ensemble, lorsque les réserves en glucides (sucres totaux et glycogène) ont été combinées, la dépense énergétique pour l'essaimage d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* était 52,4% et 58,1% des réserves initiales, respectivement.

Les réserves en sucres totaux chez les mâles des essaims à Soumouso étaient significativement différentes de celles des mâles des essaims à VK7 ($U=2718$; $P=0,0001$). Toutefois, d'autres comparaisons de réserves énergétiques entre les mâles au repos d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* collectés à Soumouso n'ont pas montré de différence, suggérant que ce sont les différences écologiques entre les sites qui pourraient être à l'origine des variations observées (sucres : $U=231$; $P=0,71$; glycogène : $U=216$; $P=0,5$). Contrairement aux mâles collectés dans les essaims, les teneurs en glycogène étaient significativement plus élevées chez les mâles nouvellement émergés à Soumouso qu'à VK7 ($U=58$; $P=0,011$).

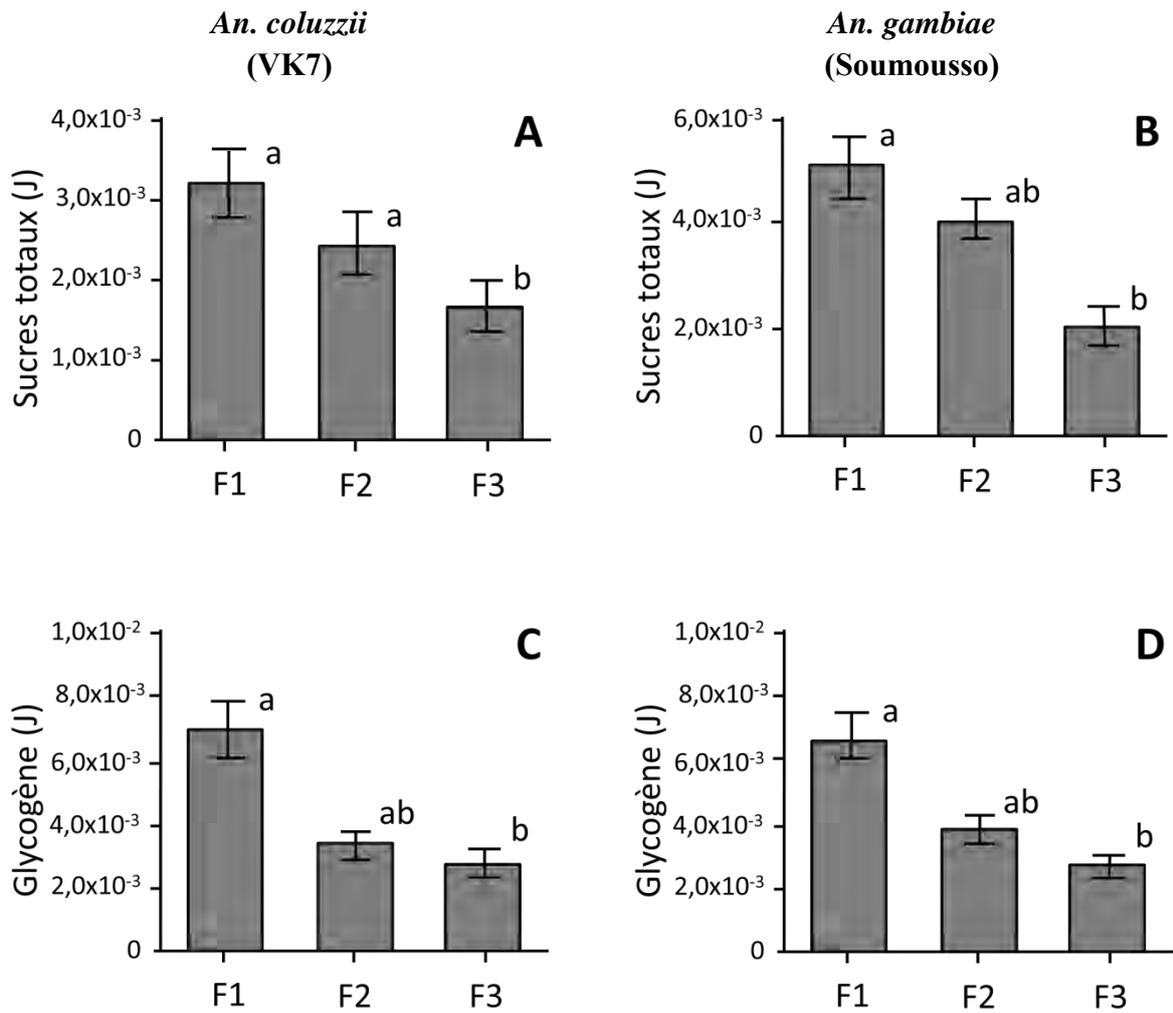


Figure 27: Bilan énergétique (sucres totaux (A et B) et glycogène (C et D)) des mâles (collectés au début (F1), au pic (F2) et à la fin de l'essaimage (F3)) d'*An. coluzzii* (A et C) et *An. gambiae* (B et D). Les mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont été collectés respectivement à VK7 et à Soumouso. Les graphes du même groupe ayant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents ($P > 0.05$).

4.3.3. Réserves énergétiques des mâles couplés et non-couplés dans les essaims

Un total de 110 mâles *in copula* et 150 non-couplés d'*An. coluzzii* a été collecté pendant trois mois (juillet, août et novembre) à VK7. Les analyses énergétiques ont montré que les teneurs en glycogène ($U=8147$; $P=0,8$) et en sucres totaux ($U=7886$; $P=0,5$) étaient similaires au sein des deux groupes.

4.3.4. Mesure de la taille des ailes

4.3.4.1. Implication de la taille des ailes dans le succès reproducteur

La taille des ailes considérée comme un proxy de la taille du moustique a été mesurée. Les mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* couplés sont relativement plus grands que les autres mâles des essaims (*An. coluzzii* : $t=2,09$; $df=348$; $P=0,036$; Figure 28A ; *An. gambiae* : $t=2,97$; $df=56$; $P=0,0043$; Figure 28B). La taille des mâles des essaims ne varie ni en fonction du site de collecte ni selon qu'ils aient été collectés au début, au pic ou à la fin de l'essaimage (VK7 : ANOVA ; $P=0,116$; $F=2,16$; Figure 28A ; Soumouso : $P=0,128$; $F=2,08$; Figure 28B). La taille des mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* couplés est principalement distribuée autour d'une valeur intermédiaire (Figure 29B, D). Nous avons aussi observé une faible corrélation entre la taille des mâles et celle des femelles capturées *in copula* (Figure 29A, C), suggérant que dans nos sites d'étude, la formation des couples chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* ne se ferait pas suivant des tailles similaires.

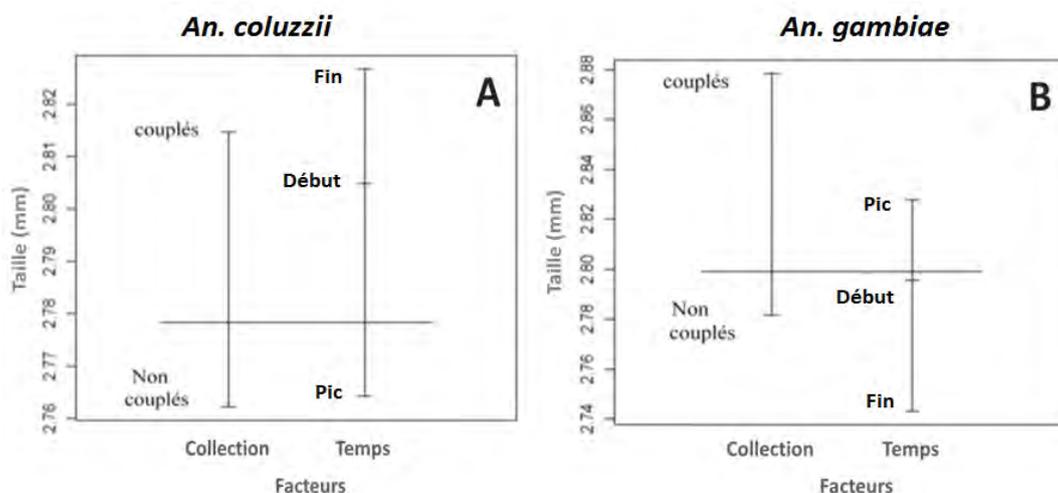


Figure 28: Comparaison de la taille des mâles couplés et non-couplés ainsi que des mâles collectés à différents temps donnés au cours de l'essaimage d'*An. coluzzii* à VK7 (A) et *An. gambiae* à Soumouso (B)

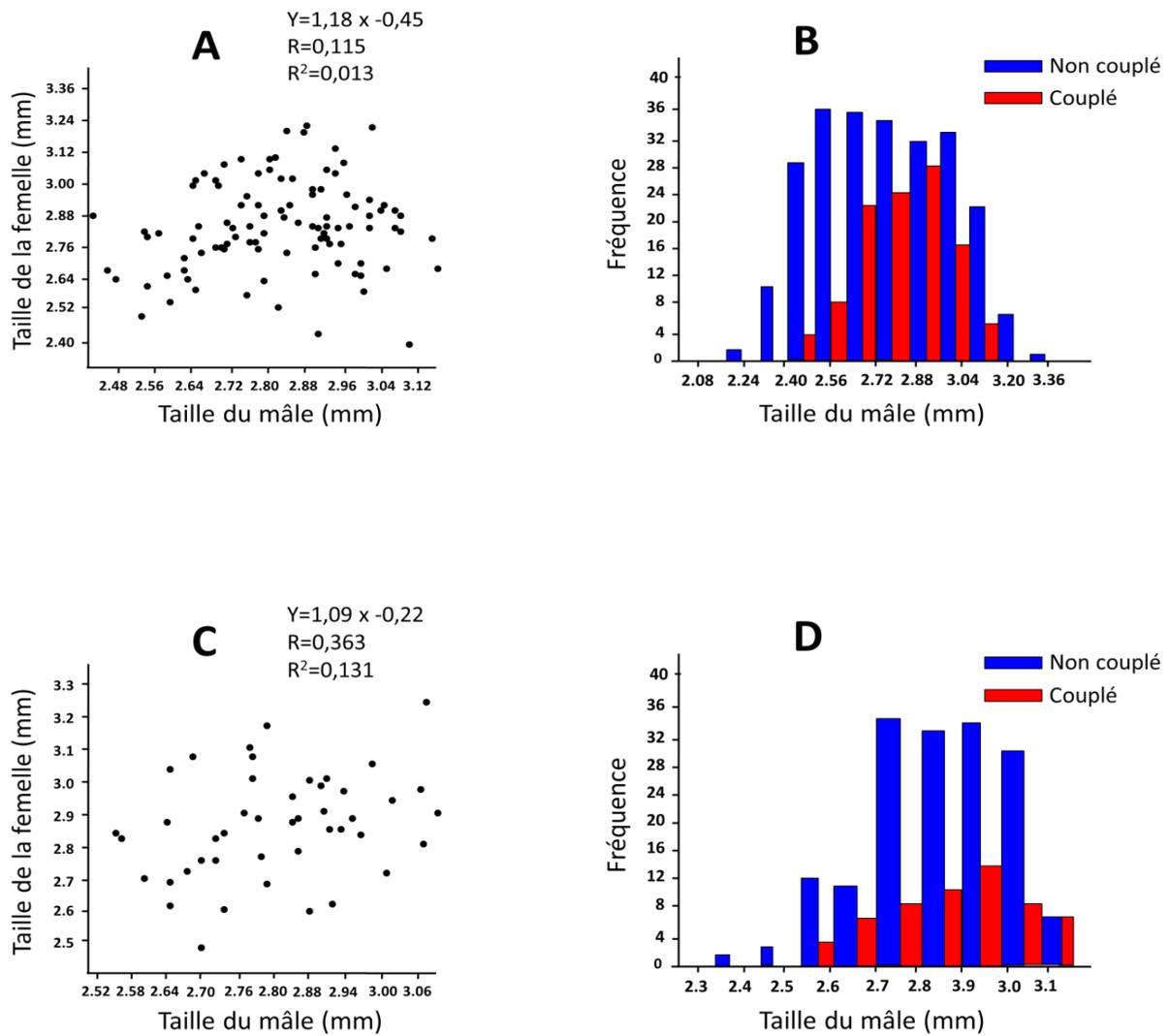


Figure 29: Comparaison de la taille des mâles et celle des femelles pris en couples et distribution des fréquences de la taille des mâles couplés (en rouge) et non-couplés (en bleu) chez *An. coluzzii* (VK7) (A, B) et *An. gambiae* (Soumouso) (C, D)

4.3.4.2. Estimation de la symétrie

Le test de corrélation de Pearson a montré qu'il y avait une forte corrélation de la taille entre les ailes gauches et droites chez les mâles couplés et non-couplés d'*An. coluzzii* (couplés : $r=0,99$; $P<0,0001$; non-couplés : $r=0,98$; $P<0,0001$) collectés dans les essaims (Figure 30). Le résultat indique également que les ailes des mâles couplés étaient aussi symétriques que celles des mâles non-couplés car aucune différence significative de la taille n'a été observée entre les deux groupes de moustiques ($t=0,24$; $df=240$; $P=0,8$).

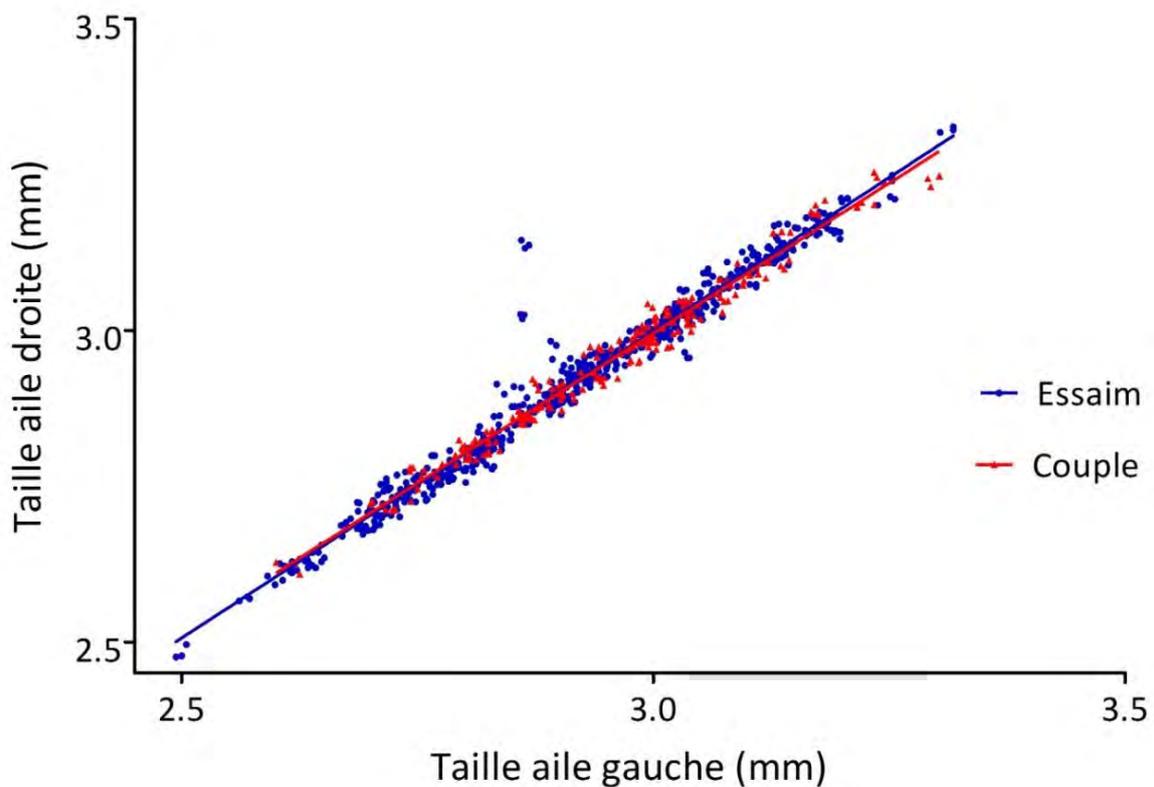


Figure 30: Corrélation entre la taille des ailes gauches et droites des mâles couplés et non-couplés capturés dans les essaims

4.4. Discussion

L'objectif de la présente étude était d'évaluer les variations des réserves énergétiques au cours de l'essaimage et de la formation des couples. Il était aussi question d'estimer le rôle de la taille et de la symétrie des ailes du mâle dans le succès de la reproduction en milieu naturel.

4.4.1. Variations des réserves énergétiques en fonction de l'activité des mâles

Nous avons constaté une variation des réserves en sucres totaux et en glycogène mais pas en lipides et en protéines chez les différents groupes de mâles collectés, suggérant que les sucres totaux et le glycogène sont les principales réserves utilisées lors des activités de reproduction. Le rôle des sucres dans la biologie des mâles a été démontré dans les études précédentes (Müller & Schlein, 2006 ; Gouagna *et al.*, 2010). C'est la seule nourriture pour les mâles (Foster, 1995 ; Gu *et al.*, 2011). En outre, le sucre est une source d'énergie nécessaire au vol pour les deux sexes (Nayar & Van Handel, 1971) et pourrait même améliorer leur fécondité (Foster, 1995). Les mâles sont particulièrement vulnérables au manque de sucre juste après l'émergence des gîtes larvaires (Foster, 1995). Notre étude a montré que les réserves en sucres et en glycogène des mâles au repos collectés le matin étaient supérieures à celles des mâles au repos collectés le soir. Cela reflèterait bien le comportement trophique des espèces *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Dao *et al.* (2008) ont montré, grâce à l'utilisation des pièges placés à l'intérieur et à l'extérieur des habitations, que les moustiques s'activent au crépuscule à la recherche soit des sites d'essaimage pour la reproduction, soit pour la recherche d'un repas de sang et/ou sucré. Après avoir retrouvé l'énergie, ces moustiques recherchent à nouveau les sites de repos le lendemain en fin de nuit. De même, Yuval *et al.* (1994) avaient préalablement montré que la recherche du repas sucré chez *An. freeborni* avait lieu juste après l'heure des essaims, avant de regagner les sites de repos. Ces auteurs ont en effet trouvé que les teneurs en sucres et en glycogène des mâles *An. freeborni* collectés le matin étaient supérieures à celles des mâles collectés le soir dans les sites de repos. Ces réserves ainsi acquises assurent les besoins quotidiens notamment l'activité d'essaimage (Yuval, 1992 ; Yuval *et al.*, 1994).

La présente étude suggère que 59% des sucres totaux et 32% du glycogène sont consommés lorsque les moustiques sont au repos et 15,9 % des sucres totaux sont alloués aux activités d'essaimage. Compte tenu du fait que l'essaimage dure environ 30 min et que les

mâles passent en moyenne 660 min au repos (de 06:00 à 17:00, respectivement heure de collecte le matin et du soir dans les sites de repos), les mâles qui essaient consomment proportionnellement 5,9 fois plus d'énergie provenant des sucres que les mâles au repos. Par conséquent, les sucres sont extrêmement importants dans la survie du mâle. Des études expérimentales ont montré l'incapacité des mâles dépourvus de sucres à féconder des femelles (Gary *et al.*, 2009 ; Stone *et al.*, 2009). Huho *et al.* (2007) ont rapporté que les réserves en sucres et en glycogène chez des moustiques sauvages étaient nulles comparés aux moustiques élevés au laboratoire. Cela pourrait être dû au fait que ces derniers avaient déjà épuisé leur stock en sucres avant d'être collectés.

La teneur en protéines dans les différents groupes de mâles collectés au cours du temps ne varie pas indiquant que les protéines, principalement obtenues au stade larvaire (Foster, 1995) joueraient plutôt un rôle structural. Au cours du développement pré-imaginal, les larves se nourrissent dans les gîtes, de différentes matières organiques dégradées par des bactéries et des champignons. Les réserves nutritives accumulées au cours de cette vie larvaire sont essentiellement constituées de protéines et de lipides. Des études sur les besoins nutritionnels ont montré qu'un régime dépourvu de protéines inhiberait le développement larvaire d'*Ae. aegypti*. De même, la teneur en lipides n'a pas significativement varié entre les différents groupes de moustiques en fonction du temps (matin, soir, essaim) et de l'activité (essaim, repos). Nayar & Van Handel (1971) ont démontré que ce sont les sucres qui sont utilisés pour le vol et non les lipides chez *Aedes sollicitans*. Les lipides ne sont pas utilisés pour le vol mais pourraient être métabolisés en glucose et glycogène pour compenser le manque de sucres en situation de stress (Yuval *et al.*, 1994).

4.4.2. Bilan énergétique des mâles des essaims d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*

Nos résultats ont démontré que l'essaimage chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* est très coûteux. La moitié des réserves totales en glucides (sucres et glycogène) s'épuise au cours d'une soirée d'essaimage comme l'atteste la variation que nous avons notée entre les mâles collectés au début et à la fin de l'essaimage. Ce constat confirme que les glucides constituent le principal combustible utilisé en vol (Nayar & Van Handel, 1971 ; Yuval *et al.*, 1994 ; Briegel *et al.*, 2001; Huho *et al.*, 2007). Il faut noter cependant que bilan énergétique prend en compte plusieurs facteurs qui pourraient rendre difficile son estimation. Selon Oliva *et al.* (2012) le coût de la reproduction pour un mâle d'*Aedes albopictus* comprend les dépenses

liées à la recherche de la femelle, à l'accouplement et au transfert de la semence sans occulter la compétition entre mâles. Papadopoulos *et al.* (2010) par contre ont montré que la recherche de la femelle chez mouches de fruits serait plus coûteuse que l'accouplement et pourrait même impacter leur survie. Toutefois, ces constats révèlent la nécessité de reconstituer au quotidien les réserves afin d'assurer la survie et les activités de reproduction, conformément à l'observation de Yuval *et al.* (1994).

Dans cette étude, les mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont consommé près de la moitié de leurs réserves en glucides au cours de l'essaimage. Cependant, *An. gambiae* (Soumouso) a investi environ 6% de plus que *An. coluzzii* (VK7). Cette différence pourrait être liée à la qualité des nutriments des gîtes larvaires (Ng'habi *et al.*, 2008) rencontrés sur ces deux sites d'échantillonnage. Foster (1995) a également souligné l'importance du repas sucré pour le mâle et sa variation en fonction des espèces et de leur habitat. L'analyse des réserves des mâles au repos et des mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* collectés sur le même site de Soumouso s'est révélée similaire. Par contre, les réserves en glucides (sucres totaux et glycogène) des mâles nouvellement émergés d'*An. gambiae* (Soumouso) étaient sensiblement plus élevées que ceux des mâles *An. coluzzii* (VK7). Ces différences confirment que les variations écologiques pourraient expliquer la différence en réserves énergétiques notée chez ces deux espèces collectées sur des sites différents.

4.4.3. Réserves énergétiques des mâles couplés et non-couplés dans les essaims

Les mâles couplés n'ont pas plus de réserves énergétiques que les mâles non-couplés, contrairement à toute attente. Cela suggèrerait que les réserves énergétiques ne seraient peut-être pas le facteur le plus important dans le succès de l'accouplement bien que le rôle du repas sucré dans l'essaimage ait été bien documenté (Yuval *et al.*, 1994 ; Briegel *et al.*, 2001). Les mâles, après l'émergence, ont besoin de faire le plein d'énergie ; le stock d'énergie acquis au stade larvaire en milieu naturel étant rarement suffisant pour assurer les activités de reproduction. Selon Yuval *et al.* (1994), c'est le succès dans la cueillette du nectar qui déterminera la capacité d'un mâle à participer à l'essaimage. D'autres auteurs ont suggéré que les mâles qui participent à l'essaimage auraient les mêmes qualités car, en milieu naturel seuls les individus résistants aux conditions difficiles du stade larvaire émergent (Huho *et al.*, 2007). L'essaimage a un coût et il semble qu'un seuil de réserves énergétiques pourrait

influencer la participation des mâles aux essaims et par conséquent, la chance pour un mâle de s'accoupler dépendrait du temps passé dans un essaim (Yuval *et al.*, 1994).

4.4.4. Taille des ailes et symétrie du mâle

Des études ont investigué le rôle de la taille dans la sélection sexuelle. Ces études ont montré que la préférence pour des femelles plus larges aurait une influence génétique sur la descendance (Okanda *et al.*, 2002). Les mêmes auteurs ont montré qu'en situation de compétition où des milliers de mâles concourent pour quelques femelles, celles plus larges sont susceptibles d'être inséminées et de pondre plus d'œufs. Cela montre l'avantage de la grande taille chez les femelles. Cependant, le rôle de la taille dans le succès reproducteur chez les mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* nécessite plus d'attention. Dans les systèmes de reproduction se caractérisant par un regroupement des mâles, la taille joue un rôle important car elle est synonyme de force physique permettant de défendre un territoire (Diabaté *et al.*, 2011). Cependant, il reste à savoir si cette règle s'applique aussi aux mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Peu importe le site de collecte des moustiques (VK7 ou Soumousso), aucune différence de taille des ailes n'a été observée chez les mâles collectés au début, au pic et à la fin de l'essaimage. Cela signifie que la taille des mâles ne jouerait pas un rôle important dans la participation à l'essaimage. Toutefois, il a été établi que les mâles couplés d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* étaient en moyenne significativement plus grands que les mâles non-couplés. Un constat similaire a été fait chez *An. freeborni* par Yuval *et al.* en 1998, tandis que Charlwood *et al.* (2002) n'ont trouvé aucune différence dans la taille. Nous avons constaté que la taille des mâles couplés était principalement distribuée autour d'une valeur intermédiaire chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*, suggérant que l'agilité dans le vol pourrait également jouer un rôle important dans le succès à l'accouplement. Cela confirme les conclusions de N'ghabi *et al.* (2008) qui ont montré que les mâles ayant une taille intermédiaire avaient plus de succès à l'accouplement comparativement aux mâles plus petits ou plus grands. Peckarsky *et al.* (2002) ont aussi montré que les mâles d'éphémères (*Baetis bicaudatus*) ayant une taille intermédiaire pourraient être avantagés dans l'accouplement en raison de leur agilité. En outre nous avons observé une faible corrélation entre la taille des femelles et celle des mâles capturés *in copula*, suggérant que la distribution de la taille des moustiques dans les couples n'est pas homogène. Si la taille intermédiaire est avantageuse, il n'existerait cependant pas de choix délibéré entre les moustiques de sorte que les petits mâles s'accouplent avec les petites femelles et les grands mâles aux grandes femelles dans notre étude. Cela est un aspect

important dans la production en masse au laboratoire dans les programmes de lutte génétique nécessitant des lâchers massifs de mâles.

Le succès à l'accouplement de certains insectes est associé à la symétrie alaire. Les mâles symétriques auraient plus de chance d'être « choisis » par les femelles du fait de leur « vigueur » génétique. Par contre, les individus asymétriques se caractériseraient par une forte mortalité, une faible fécondité et une croissance plus lente (McLachlan & Cant, 1995). Nos résultats n'ont pas montré de différence de symétrie entre les mâles couplés et non-couplés. Il existe une forte corrélation entre les ailes gauches et droites des mâles couplés et non-couplés. Cependant, il serait intéressant de développer d'autres méthodes de mesure de la symétrie, notamment celles utilisées en morphométrie géométrique afin de confirmer cette observation.

**CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion générale

Cette étude avait pour objectifs d'identifier les facteurs génétiques et écologiques qui favorisent l'isolement reproductif précopulatoire entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*, d'étudier les mécanismes d'isolement reproductif post-copulatoire extrinsèque et des paramètres fondamentaux qui modulent le succès reproducteur des mâles dans la nature.

Nos résultats ont montré une persistance des introgressions entre les deux espèces jumelles dont la majorité des essaims a été trouvée mono-spécifique et formée soit par *An. coluzzii* ou par *An. gambiae*, avec seulement quelques rares essaims mixtes collectés à VK7 et à Soumouso. La répartition des hybrides mâles et femelles de génération F_1 et des générations F_{1+n} dans les essaims d'*An. coluzzii* ou *An. gambiae* était globalement déterminée par les génotypes de l'île de spéciation dans le chromosome X. Chez les mâles comme chez les femelles, l'association entre le type d'essaim et l'île de spéciation du chromosome 3L était moins forte que celle observée entre le type d'essaim et l'île de spéciation du chromosome X. L'association avec l'île de spéciation du chromosome 2L était interrompue complètement chez les deux sexes. Ces résultats sont compatibles avec le modèle de la spéciation sympatrique dans lequel l'île de spéciation du chromosome X jouerait un rôle crucialement actif dans l'isolement reproductif précopulatoire intrinsèque.

L'étude a permis également de clarifier le rôle hypothétique de l'extrême dominance asymétrique des espèces dans l'isolement reproductif entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Dans les conditions écologiques caractérisées par une extrême dominance de l'une des deux espèces, les femelles *An. gambiae* étaient plus permissibles aux accouplements interspécifiques que celles d'*An. coluzzii*. Le taux d'hybridation d'*An. gambiae* était trouvé suffisamment élevé à même de maintenir un flux de gènes résiduel entre les deux espèces. La comparaison des taux d'hybridation à différents stades supporte l'idée d'une possible source de pression sélective contre les hybrides agissant à un stade très précoce de leur vie dans ces conditions écologiques favorables à la perte de l'isolement reproductif précopulatoire.

Les résultats de l'évaluation de l'isolement reproductif post-zygotique écologie-dépendant ont mis en évidence pour la première fois dans une étude expérimentale, l'existence d'une barrière post-zygotique sous forme d'effet maternel dans la réponse anti-prédation des larves d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*. En effet, la comparaison du succès du développement larvaire a

montré que l'hybride col/gam était similaire à *An. coluzzii* et l'hybride gam/col à *An. gambiae*. Ces résultats sont d'une importance significative et contribuent à une meilleure compréhension de la spéciation en cours entre les deux espèces jumelles. La mesure de la taille n'a montré aucune différence significative entre espèces parentales et hybrides réciproques. Toutefois, l'étude souligne l'importance d'investiguer des facteurs intrinsèques directement impliqués dans le système de reproduction et fortement liés à l'écologie de chacune des deux espèces au sein des populations naturelles.

L'étude a enfin montré que l'activité d'essaimage des mâles d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* requiert une proportion significative des réserves énergétiques, principalement les sucres totaux et le glycogène. Même si nous n'avons pas pu trouver de différence significative des réserves énergétiques entre mâles couplés et mâles non-couplés, les mâles couplés des deux espèces collectés dans deux sites différents, étaient en moyenne significativement plus grands que les mâles non-couplés. Toutefois, la taille des mâles couplés se situait autour d'une valeur centrale intermédiaire, suggérant que l'agilité dans le vol pourrait également jouer un rôle important dans le succès de l'accouplement. Enfin, la mesure de la taille n'a pas pu déterminer si les mâles en couples étaient significativement plus symétriques que les mâles non-couplés. Il en est de même pour l'hypothèse d'homogamie basée sur la taille entre mâles et femelles d'une même espèce.

Perspectives

Nos résultats ont montré que les essais jouent un rôle clé dans l'isolement précopulatoire entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Pour mieux comprendre ce processus il est crucial de rechercher les gènes ou complexes de gènes du comportement d'essaimage, notamment ceux impliqués dans la ségrégation spatiale des essais, dans l'île de spéciation du chromosome X. En outre identifier les phénotypes des individus porteurs de ces gènes pourrait conduire à d'autres voies de recherches par lesquelles il serait possible d'attirer puis tuer les mâles et les femelles dans les essais naturelles.

L'étude des paramètres intrinsèques des mâles ouvre également une piste de recherche sur le phénotype des mâles reproducteurs et les meilleures sources naturelles d'énergie pour une bonne capacité de vol dans les essais. L'investigation de ces pistes aiderait à bien cerner la clé du succès de reproduction des mâles dans la nature afin d'améliorer la compétitivité

sexuelle et sa spécificité dans la production de moustiques en élevage de masse dans les programmes de lâchers de mâles stériles ou transgéniques envisagés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aboagye-Antwi F, Alhafez N, Weedall GD, Brothwood J, Kandola S, Paton D, Fofana A, Olohan L, Betancourth MP, Ekechukwu NE *et al*: Experimental swap of *Anopheles gambiae*'s assortative mating preferences demonstrates key role of X-chromosome divergence island in incipient sympatric speciation. *PLoS Genet* 2015, 11(4):e1005141.
- Aboagye-Antwi F, Tripet F: Effects of larval growth condition and water availability on desiccation resistance and its physiological basis in adult *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Malar J* 2010, 9:225.
- Abraham EG, Donnelly-Doman M, Fujioka H, Ghosh A, Moreira L, Jacobs-Lorena M: Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgAper1 regulatory elements. *Insect Mol Biol* 2005, 14(3):271-279.
- Adamou A, Dao A, Timbine S, Kassogue Y, Yaro AS, Diallo M, Traore SF, Huestis DL, Lehmann T: The contribution of aestivating mosquitoes to the persistence of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *Malar J* 2011, 10:151.
- Alphey L, Beard CB, Billingsley P, Coetzee M, Crisanti A, Curtis C, Eggleston P, Godfray C, Hemingway J, Jacobs-Lorena M *et al*: Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science* 2002, 298(5591):119-121.
- Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougaard JM, Chandre F, Corbel V, Darriet F, Zaim M, Rowland MW: Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J* 2005, 4:25.
- Bailey RI, Innocenti P, Morrow EH, Friberg U, Qvarnstrom A: Female *Drosophila melanogaster* gene expression and mate choice: the X chromosome harbours candidate genes underlying sexual isolation. *PLoS One* 2011, 6(2):e17358.
- Baldet T, Diabaté A, Guiguemdé TR: Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama), Burkina Faso. *Cahier Santé* 2003, 13:55-60.
- Baldet T: Etude comparative de deux stratégies de lutte contre *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 par *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 dans la ville de Maroua (Nord Cameroun). *Thèse Université Montpellier II* 1995:294p.
- Bargielowski I, Kaufmann C, Alphey L, Reiter P, Koella J: Flight performance and teneral energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2012, 12 : 1053–1058.
- Bargielowski I, Kaufmann C, Alphey L, Reiter P, Koella J: Flight performance and teneral energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, 12(12):1053-1058.
- Benedict MQ, Hood-Nowotny RC, Howell PI, Wilkins EE: Methylparaben in *Anopheles gambiae* s.l. sugar meals increases longevity and malaria oocyst abundance but is not a preferred diet. *J Insect Physiol* 2009, 55(3):197-204.
- Benedict MQ, Robinson AS: The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol* 2003, 19(8):349-355.
- Bernardo J: Maternal effects in animal ecology. *Am Zool* 1996, 36:83-105.
- Black WCt, Lanzaro GC: Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s: introgressive hybridization, adaptive inversions, or recent reproductive isolation? *Insect Mol Biol* 2001, 10(1):3-7.
- Boonstra R, Hochachka WM: Maternal effects and additive genetic inheritance in the collard lemming *Dicrostonyx groenlandicus*. *Evol Ecol* 1997, 11:169-182.

- Briegel H, Knusel I, Timmermann SE: *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *J Vector Ecol* 2001, 26(1):21-31.
- Briegel H: Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *J Med Entomol* 1990, 27(5):839-850.
- Bruce-Chwatt LJ: John Hull Grundy lecture. Mosquitoes, malaria and war; then and now. *J R Army Med Corps* 1985, 131(2):85-99.
- Bryan JH, Di Deco MA, Petrarca V, Coluzzi M: Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s. s. in The Gambia, West Africa. *Genetica* 1982, 59: 167-176.
- Bryan JH: Results of consecutive matings of female *Anopheles gambiae* species B with fertile and sterile males. *Nature* 1968, 218:p. 489.
- Byers DL, Platenkamp GAJ, Shaw RG: Variation in seed characters in *Nemophila menziesii*: evidence of a genetic basis for maternal effect. *Evolution* 1997, 51: 1445-1456.
- Caljon G, De Vooght L, Van Den Abbeele J: Options for the delivery of anti-pathogen molecules in arthropod vectors. *J Invertebr Pathol* 2013, 112 Suppl:S75-82.
- Caputo B, Nwakanma D, Jawara M, Adiamoh M, Dia I, Konate L, Petrarca V, Conway DJ, della Torre A: *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s. *Malar J* 2008, 7:182.
- Caputo B, Santolamazza F, Vicente JL, Nwakanma DC, Jawara M, Palsson K, Jaenson T, White BJ, Mancini E, Petrarca V *et al*: The "far-west" of *Anopheles gambiae* molecular forms. *PLoS One* 2011, 6(2):e16415.
- Carneiro M, Blanco-Aguilar JA, Villafuerte R, Ferrand N, Nachman MW: Speciation in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): islands of differentiation on the X chromosome and autosomes. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 2010, 64(12):3443-3460.
- 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(2):135-138.
- Catteruccia F: Malaria vector control in the third millennium: progress and perspectives of molecular approaches. *Pest Manag Sci* 2007, 63(7):634-640.
- Cavalié P, Mouchet J: [The experimental campaigns of malaria eradication in the northern part of the Cameroon Republic. I. The vectors of malaria epidemiology in North-Cameroon]. *Med Trop (Mars)* 1961, 21:846-869.
- Chan YS, Naujoks DA, Huen DS, Russell S: Insect population control by homing endonuclease-based gene drive: an evaluation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2011, 188(1):33-44.
- Charlwood JD, Pinto J, Sousa CA, Ferreira C, Do Rosario VE: Male size does not affect mating success (of *Anopheles gambiae* in Sao Tomé). *Med Vet Entomol* 2002, 16:109-113.
- Chauvet G, Gillies MT, Coz J, Adam JP, Mouchet J: Ecologie, physiologie et comportement des vecteurs du paludisme humain et animal en région éthiopienne. *Cahiers ORSTOM, Sér Ent Méd et Par* 1968, Vol. VI, n° 3/4.
- Cheng C, White BJ, Kamdem C, Mockaitis K, Costantini C, Hahn MW, Besansky NJ: Ecological genomics of *Anopheles gambiae* along a latitudinal cline: a population-resequencing approach. *Genetics* 2012, 190(4):1417-1432.
- Cisse B, Sokhna C, Boulanger D, Milet J, Ba el H, Richardson K, Hallett R, Sutherland C, Simondon K, Simondon F *et al*: Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet* 2006, 367(9511):659-667.

- Cisse MB, Keita C, Dicko A, Dengela D, Coleman J, Lucas B, Mihigo J, Sadou A, Belemvire A, George K *et al*: Characterizing the insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in Mali. *Malar J* 2015, 14:327.
- Clarkson CS, Weetman D, Essandoh J, Yawson AE, Maslen G, Manske M, Field SG, Webster M, Antao T, MacInnis B *et al*: Adaptive introgression between *Anopheles* sibling species eliminates a major genomic island but not reproductive isolation. *Nat Commun* 2014, 5:4248.
- Coetzee M, Craig M, le Sueur D: Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* 2000, 16(2):74-77.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ: *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 2013, 3619:246-274.
- Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA: Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bollettino di Zoologia* 1985, 52(1-2):45-63.
- Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V: A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* 2002, 298(5597):1415-1418.
- 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(5):483-497.
- Coluzzi M, Sabatini A: Cytogenetic observations on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 1967, 9, 73.
- Coluzzi M, Sabatini A: Cytogenetic observations on species C of the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 1968, 10, 155.
- Coluzzi M, Sabatini A: Cytogenetic observations on the saltwater species, *Anopheles merus* and *Anopheles melas*, of the *gambiae* complex. *Parassitologia* 1969, 11, 177.
- Coluzzi M: Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull WHO* 1984, 62: 107-113.
- Coluzzi M: Osservazioni comparative sul cromosoma X nella specie A e B del complesso *Anopheles gambiae*. *R C Accad naz Lincei* 1966, 40, 671.
- Corbett-Detig RB, Hartl DL: Population genomics of inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 2012, 8(12):e1003056.
- Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, Ose K, Fotsing JM, Sagnon N, Fontenille D *et al*: Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol* 2009, 9:16.
- Coyne JA, Orr HA: Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* 1989, 43: 362-381.
- Coyne JA, Orr HA: "Patterns of speciation in *Drosophila*" revisited. *Evolution* 1997, 51: 295-303.
- Craig GB: Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science* 1967, 156:1499-1501.
- Dabiré KR, Baldet T, Diabaté A, Dia I, Costantini C, Cohuet A, Guiguemde TR, Fontenille D: *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol* 2007, 44: 990-997.
- Dabire KR, Diabate A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R, Ouedraogo JB, Hougard JM, Chandre F, Baldet T: Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J* 2008, 7:188.

- Dabire KR, Diabate A, Namountougou M, Toe KH, Ouari A, Kengne P, Bass C, Baldet T: Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009, 103(11):1113-1120.
- Dabire KR, Sawadodogo S, Diabate A, Toe KH, Kengne P, Ouari A, Costantini C, Gouagna C, Simard F, Baldet T *et al*: Assortative mating in mixed swarms of the mosquito *Anopheles gambiae* s.s. M and S molecular forms, in Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol* 2013, 27(3):298-312.
- Dabire RK, Namountougou M, Diabate A, Soma DD, Bado J, Toe HK, Bass C, Combarry P: Correction: Distribution and Frequency of kdr Mutations within *Anopheles gambiae* s.l. Populations and First Report of the Ace.1G119S Mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *PLoS One* 2015, 10(11):e0141645.
- Damiens D, Benedict MQ, Wille M, Gilles JR: An inexpensive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): eat like a horse, a bird, or a fish? *J Med Entomol* 2012, 49(5):1001-1011.
- Dao A, Adamou A, Yaro AS, Maiga HM, Kassogue Y, Traore SF, Lehmann T: Assessment of alternative mating strategies in *Anopheles gambiae*: Does mating occur indoors? *J Med Entomol* 2008, 45(4):643-652.
- Dao A, Yaro AS, Diallo M, Timbine S, Huestis DL, Kassogue Y, Traore AI, Sanogo ZL, Samake D, Lehmann T: Signatures of aestivation and migration in Sahelian malaria mosquito populations. *Nature* 2014, 516(7531):387-390.
- Darriet F, Marcombe S, Etienne M, Yebakima A, Agnew P, Yp-Tcha MM, Corbel V: Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). *Parasit Vectors* 2010, 3:88.
- Davidson G, Hunt RH: The crossing and chromosome characteristics of a new, sixth species in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 1973, 15(1):121-128.
- Davidson G, Odetoyinbo JA, Colussa B, Coz J: A field attempt to assess the mating competitiveness of sterile males produced by crossing 2 member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Bulletin of the World Health Organization* 1970, 42:55-67.
- De Queiroz K: Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* 2007, 56(6):879-886.
- della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, Coluzzi M: Speciation within *Anopheles gambiae*--the glass is half full. *Science* 2002, 298(5591):115-117.
- della Torre A, Tu Z, Petrarca V: On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochem Mol Biol* 2005, 35(7):755-769.
- Di Deco MA, Petrarca V, Villani F, Coluzzi M. Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di *Anopheles allevati* in laboratorio. *Parassitologia* 1980, 22: 304-306.
- Dia I, Diop T, Rakotoarivony I, Kengne P, Fontenille D: 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(3):279-283.
- Diabate A, Baldet T, Brengues C, Kengne P, Dabire KR, Simard F, Chandre F, Hougard JM, Hemingway J, Ouedraogo JB *et al*: Natural swarming behaviour of the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003, 97(6):713-716.
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde RT, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM: First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, west Africa. *Parassitologia* 2002, 44(3-4):157-158.

- Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, Akogbeto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J *et al*: The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health* 2004, 9(12):1267-1273.
- Diabate A, Dabire RK, Heidenberger K, Crawford J, Lamp WO, Culler LE, Lehmann T: Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evol Biol* 2008, 8:5.
- Diabate A, Dabire RK, Kengne P, Brengues C, Baldet T, Ouari A, Simard F, Lehmann T: Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol* 2006, 43(3):480-483.
- Diabate A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, Millogo N, Baldet T, Simard F, Gimnig JE, Hawley WA, Lehmann T: Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol* 2005, 42(4):548-553.
- Diabate A, Dabire RK, Millogo N, Lehmann T: Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2007, 44(1):60-64.
- Diabate A, Dao A, Yaro AS, Adamou A, Gonzalez R, Manoukis NC, Traore SF, Gwadz RW, Lehmann T: Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proc Biol Sci* 2009, 276(1676):4215-4222.
- Diabate A, Tripet F: Targeting male mosquito mating behaviour for malaria control. *Parasites & Vectors* 2015, 8(347).
- Diabate A, Yaro AS, Dao A, Diallo M, Huestis DL, Lehmann T: Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evol Biol* 2011, 11:184.
- Dicko A, Sagara I, Sissoko MS, Guindo O, Diallo AI, Kone M, Toure OB, Sacko M, Doumbo OK: Impact of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine targeting the transmission season on the incidence of clinical malaria in children in Mali. *Malar J* 2008, 7:123.
- Dingle H: The evolution of life histories. In *Population Biology*, ed K Woehrmann, S Jain 1990:pp. 267-289 Berlin: Springer.
- Dobzhansky T: Role of the Autosomes in the *Drosophila pseudoobscura* Hybrids. *Proc Nat Acad Sci* 1933, 19:950-953.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ *et al*: Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009, 361(5):455-467.
- Doudou DT, Doannio JMC, Konan LY, Djouaka R, Toé LP, Akogbéto: La moustiquaire imprégnée d'insecticide comme moyen de lutte contre le paludisme : les raisons d'une adoption limitée en Côte d'Ivoire. *Compte rendu de recherche. Natures Sciences Sociétés* 2006, 14:431-433.
- Eisele TP, Keating J, Littrell M, Larsen D, Macintyre K: Assessment of insecticide-treated bednet use among children and pregnant women across 15 countries using standardized national surveys. *Am J Trop Med Hyg* 2009, 80(2):209-214.
- Ellis SL, Bowen WD, Boness DJ, Iverson SJ: Maternal effects on offspring mass and stage of development at birth in the harbour seal, *Phoca vitulina*. *J Mamm Evol* 2000, 81:1143-1156.
- 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(4):461-464.

- Favia G, della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N, Toure YT, Coluzzi M: Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 1997, 6(4):377-383.
- Feder JL, Egan SP, Nosil P: The genomics of speciation-with-gene-flow. *Trends Genet* 2012, 28(7):342-350.
- Ferguson FM, John B, Ng'habi KR, Knols BGJ: Addressing the sex imbalance in knowledge of vector biology. *Trends in Evolution and Ecology* 2005, 20:202-209.
- Fernandes L, Briegel H: Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol* 2005, 30(1):11-26.
- Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, Cheng Q, Hudson BJ: *Plasmodium knowlesi* in human, Indonesian Borneo. *Emerg Infect Dis* 2010, 16(4):672-674.
- Fontaine MC, Pease JB, Steele A, Waterhouse RM, Neafsey DE, Sharakhov IV, Jiang X, Hall AB, Catteruccia F, Kakani E *et al*: Mosquito genomics. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science* 2015, 347(6217):1258524.
- Fontenille D, Cohuet A, Awono-Ambene P, Kengne P, Antonio-Nkondjio C, Wondji C, Simard F: [Malaria vectors: from the field to genetics. Research in Africa]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2005, 53(3):283-290.
- 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(5):357-375.
- Foster WA, Takken W: Nectar-related vs. human-related volatiles: behavioural response and choice by female and male *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) between emergence and first feeding. *Bull Entomol Res* 2004, 94(2):145-157.
- Foster WA: Mosquito sugar feeding and reproductive energetic. *Ann Rev Entomol* 1995, 40:443-474.
- Fox CW, Mousseau TA: Larval host plant affects the fitness consequences of egg size in the seed beetle *Stator limbatus*. *Oecologia* 1996, 107:541-548.
- Fox CW, Savalli UM: Inheritance of environmental variation in body size: superparasitism of seeds affects progeny and grandprogeny body size via a nongenetic maternal effect. *Evolution* 1998, 52(1):172-182.
- Galloway LF: Response to natural environmental heterogeneity: maternal effects and selection on lifehistory characters and plasticities in *Mimulus guttatus*. *Evolution* 1995, 49:1095-1107.
- Gary RE, Jr., Cannon JW, 3rd, Foster WA: Effect of sugar on male *Anopheles gambiae* mating performance, as modified by temperature, space, and body size. *Parasit Vectors* 2009, 2(1):19.
- Gary RE, Jr., Foster WA: Diel timing and frequency of sugar feeding in the mosquito *Anopheles gambiae*, depending on sex, gonotrophic state and resource availability. *Med Vet Entomol* 2006, 20(3):308-316.
- Gatton ML, Chitnis N, Churcher T, Donnelly MJ, Ghani AC, Godfray HC, Gould F, Hastings I, Marshall J, Ranson H *et al*: The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 2013, 67(4):1218-1230.
- Gentile JE, Rund SS, Madey GR: Modelling sterile insect technique to control the population of *Anopheles gambiae*. *Malar J* 2015, 14:92.
- Gil D, Graves J, Hazon N, Wells A: Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science* 1999, 286(5437):126-128.

- Gilles JR, Schetelig MF, Scolari F, Marec F, Capurro ML, Franz G, Bourtzis K: Towards mosquito sterile insect technique programmes: exploring genetic, molecular, mechanical and behavioural methods of sex separation in mosquitoes. *Acta Trop* 2014, 132 Suppl:S178-187.
- Gillies M, De Meillon BD: The *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). *Publ South Afr Inst Med Res* 1968, 54:343 p.
- Gimenez MD, White TA, Hauffe HC, Panithanarak T, Searle JB: Understanding the basis of diminished gene flow between hybridizing chromosome races of the house mouse. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 2013, 67(5):1446-1462.
- Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A, Simard F: A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol* 2010, 21(5):1087-1092.
- Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabire RK, Simard F: Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol* 2012a, 26(1):9-17.
- Gimonneau G, Pombi M, Dabire RK, Diabate A, Morand S, Simard F: Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasit Vectors* 2012b, 5:65.
- Gouagna LC, Poueme RS, Dabire KR, Ouedraogo JB, Fontenille D, Simard F: Patterns of sugar feeding and host plant preferences in adult males of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 2010, 35(2):267-276.
- Greenwood B, Doumbo OK: Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01. *Lancet* 2015.
- Greenwood B, Mutabingwa T: Malaria in 2002. *Nature* 2002, 415(6872):670-672.
- Gruha JW, Taylor OR: The effect of x-chromosome inheritance on mate-selection behavior in the sulfur butterflies, *Colias eurytheme* and *Colias philodice*. *Evolution* 1980, 34:688-695.
- Gu W, Muller G, Schlein Y, Novak RJ, Beier JC: Natural plant sugar sources of *Anopheles* mosquitoes strongly impact malaria transmission potential. *PLoS One* 2011, 6(1):e15996.
- Haddow AJ: The mosquitoes of Bwamba County, Uganda; the vertical distribution of mosquitoes in a banana plantation and the biting cycle of *Aedes* (*Stegomyia*) *simpsoni*, Theo. *Bull Entomol Res* 1945, 36:297-304.
- Haldane JBS: Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 1922, 12: 101-109.
- Hamon J, Coz J: [General epidemiology of human malaria in western Africa. Distribution and frequency of the parasites and vectors and recent observations on some of the factors governing the transmission of this disease]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1966, 59(4):466-483.
- Hamon J, Devemy P, Rickenbach A, Causse G: [Mosquitoes of Casamance, French West Africa]. *Ann Parasitol Hum Comp* 1956, 31(5-6):607-618.
- Hamon J, Mouchet J: [Secondary vectors of human malaria in Africa]. *Med Trop (Mars)* 1961, 21(Special):643-660.
- Haque U, Overgaard HJ, Clements AC, Norris DE, Islam N, Karim J, Roy S, Haque W, Kabir M, Smith DL *et al*: Malaria burden and control in Bangladesh and prospects for elimination: an epidemiological and economic assessment. *Lancet Glob Health* 2014, 2(2):e98-105.
- Harbach RE: The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* 2004, 94(6):537-553.

- Harris AF, McKemey AR, Nimmo D, Curtis Z, Black I, Morgan SA, Oviedo MN, Lacroix R, Naish N, Morrison NI *et al*: Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol* 2012, 30(9):828-830.
- Harris AF, Nimmo D, McKemey AR, Kelly N, Scaife S, Donnelly CA, Beech C, Petrie WD, Alphey L: Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol* 2011, 29(11):1034-1037.
- Hockham LR, Graves JA, Ritchie MG: Variable maternal control of facultative egg diapause in the bushcricket *Ephippiger ephippiger*. *Ecological Entomology* 2001, 26:143-147.
- Holstein M: [Epidemiological study of malaria in the Bobo-Dioulasso district (Upper Volta, 1949-50)]. *Acta Trop* 1953, 10(2):113-125.
- Howard DJ: In Hybrid Zones and the Evolutionary Process. *Harrison, Ed (Oxford Univ Press, New York)* 1993:pp.46-69.
- Howell PI, Knols BG: Male mating biology. *Malar J* 2009, 8 Suppl 2:S8.
- Huho BJ, Ng'habi KR, Killeen GF, Nkwengulila G, Knols BG, Ferguson HM: Nature beats nurture: a case study of the physiological fitness of free-living and laboratory-reared male *Anopheles gambiae* s.l. *J Exp Biol* 2007, 210(Pt 16):2939-2947.
- Huho BJ, Ng'habi KR, Killeen GF, Nkwengulila G, Knols BG, Ferguson HM: A reliable morphological method to assess the age of male *Anopheles gambiae*. *Malar J* 2006, 5:62.
- Hunt RH, Coetzee M, Fettene M: The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998, 92(2):231-235.
- Hutter P, Roote J, Ashburner M: A genetic basis for the inviability of hybrids between sibling species of *Drosophila*. *Genetics* 1990, 124(4):909-920.
- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M: Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 2002, 417(6887):452-455.
- Kamdem C, Tene Fossog B, Simard F, Etouna J, Ndo C, Kengne P, Bousses P, Etoa FX, Awono-Ambene P, Fontenille D *et al*: Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 2012, 7(6):e39453.
- Kerver WJM, Rotman G: Development of ethanol tolerance in relation to the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. II. The influence of phenotypic adaptation and maternal effect on survival on alcohol supplemented media. *Heredity (Edinb)* 1987, 58:239-248.
- Klowden MJ, Chambers GM: Male accessory gland substances activate egg development in nutritionally stressed *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Insect Physiol* 1991, 37(10):721-726.
- Klowden MJ: The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. *J Am Mosq Control Assoc* 1999, 15(2):213-220.
- Knipling EF, Laven H, Craig GB, Pal R, Kitzmiller JB, Smith CN, Brown AW: Genetic control of insects of public health importance. *Bulletin of the World Health Organization* 1968, 38(3):421-438.
- Kokoza VA, Raikhel AS: Targeted gene expression in the transgenic *Aedes aegypti* using the binary Gal4-UAS system. *Insect Biochem Mol Biol* 2011, 41(8):637-644.
- Lacroix R, McKemey AR, Raduan N, Kwee Wee L, Hong Ming W, Guat Ney T, Rahidah AAS, Salman S, Subramaniam S, Nordin O *et al*: Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS One* 2012, 7(8):e42771.

- Lanzaro GC, Lee Y: Speciation in *Anopheles gambiae* - The Distribution of Genetic Polymorphism and Patterns of Reproductive Isolation Among Natural Populations. <http://dxdoiorg/105772/56232> 2013.
- Lanzaro GC, Toure YT, Carnahan J, Zheng L, Dolo G, Traore S, Petrarca V, Vernick KD, Taylor CE: Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(24):14260-14265.
- Lanzaro GC, Tripet F: Gene flow among populations of *Anopheles gambiae*: A critical review. *Wageningen Frontis Series* 2003:109-132.
- Laurie CC: The weaker sex is heterogametic: 75 years of Haldane's rule. *Genetics* 1997, 147(3):937-951.
- Leahy MG, Craig GB: Accessory Gland Substance as a Stimulant for Oviposition in *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. *Mosquito News* 1965, 25(4):448-452.
- Lee Y, Collier TC, Sanford MR, Marsden CD, Fofana A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Chromosome inversions, genomic differentiation and speciation in the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 2013, 8(3):e57887.
- Lee Y, Marsden CD, Nieman C, Lanzaro GC: A new multiplex SNP genotyping assay for detecting hybridization and introgression between the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol Resour* 2014, 14(2):297-305.
- Lee Y, Marsden CD, Norris LC, Collier TC, Main BJ, Fofana A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Spatiotemporal dynamics of gene flow and hybrid fitness between the M and S forms of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(49):19854-19859.
- Lee Y, Meneses CR, Fofana A, Lanzaro GC: Desiccation resistance among subpopulations of *Anopheles gambiae* s.s. from Selinkenyi, Mali. *J Med Entomol* 2009, 46(2):316-320.
- Lee YW, Zairi J: Laboratory evaluation of Bacillus thuringiensis H-14 against *Aedes aegypti*. *Trop Biomed* 2005, 22(1):5-10.
- Lehmann T, Dao A, Yaro AS, Adamou A, Kassogue Y, Diallo M, Sekou T, Coscaron-Arias C: Aestivation of the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* in the Sahel. *Am J Trop Med Hyg* 2010, 83(3):601-606.
- Lehmann T, Diabate A: The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective. *Infect Genet Evol* 2008, 8(5):737-746.
- Lehmann T, Licht M, Elissa N, Maega BT, Chimumbwa JM, Watsenga FT, Wondji CS, Simard F, Hawley WA: Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *J Hered* 2003, 94(2):133-147.
- Lemasson JJ, Fontenille D, Lochouarn L, Dia I, Simard F, Ba K, Diop A, Diatta M, Molez JF: Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera:Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J Med Entomol* 1997, 34(4):396-403.
- Lindquist DA, Abusowa M, Hall MJ: The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol* 1992, 6:2-8.
- Lyimo EO, Takken W, Koella JC: Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1992, 63:265-271.
- Lynd A, Lycett GJ: Development of the bi-partite Gal4-UAS system in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 2012, 7(2):e31552.

- Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C: Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health* 2004, 9(8):846-856.
- Maiga H, Dabire RK, Lehmann T, Tripet F, Diabate A: Variation in energy reserves and role of body size in the mating system of *Anopheles gambiae*. *J Vector Ecol* 2012, 37(2):289-297.
- Maiga H, Niang A, Sawadogo SP, Dabire RK, Lees RS, Gilles JR, Tripet F, Diabate A: Role of nutritional reserves and body size in *Anopheles gambiae* males mating success. *Acta Trop* 2014, 132 Suppl:S102-107.
- MalERA: A research agenda for malaria eradication: vector control. *PLoS Med* 2011, 8(1):e1000401.
- Manda H, Gouagna LC, Foster WA, Jackson RR, Beier JC, Githure JJ, Hassanali A: Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. *Malar J* 2007, 6:113.
- Manoukis NC, Toure MB, Sissoko I, Doumbia S, Traore SF, Diuk-Wasser MA, Taylor CE: Is vector body size the key to reduced malaria transmission in the irrigated region of Niono, Mali? *J Med Entomol* 2006, 43(5):820-827.
- Marchand RP: Field observations on swarming and mating in *Anopheles gambiae* mosquitoes in Tanzania. *Neth J Zool* 1984, 34:367-387.
- Marsden CD, Lee Y, Nieman CC, Sanford MR, Dinis J, Martins C, Rodrigues A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Asymmetric introgression between the M and S forms of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, maintains divergence despite extensive hybridization. *Mol Ecol* 2011, 20(23):4983-4994.
- Masendu HT, Hunt RH, Govere J, Brooke BD, Awolola TS, Coetzee M: The sympatric occurrence of two molecular forms of the malaria vector *Anopheles gambiae* Giles sensu stricto in Kanyemba, in the Zambezi Valley, Zimbabwe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, 98(7):393-396.
- McGaugh SE, Noor MA: Genomic impacts of chromosomal inversions in parapatric *Drosophila* species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012, 367(1587):422-429.
- McLachlan A, Cant M: Small males are more symmetrical: mating success in the midge *Chironomus plumosus* (Diptera Chironomidae). *Anim Behav* 1995, 50:841-846.
- Michel AP, Sim S, Powell TH, Taylor MS, Nosil P, Feder JL: Widespread genomic divergence during sympatric speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(21):9724-9729.
- Millis A, Hartmann-Goldstein I: Maternal age, development time, and position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genet Sel Evol* 1985, 17:171-178.
- Mitchell SN, Stevenson BJ, Muller P, Wilding CS, Egyir-Yawson A, Field SG, Hemingway J, Paine MJ, Ranson H, Donnelly MJ: Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109(16):6147-6152.
- Mouchet J, Blanchy S, Rakotonjanabelo A, Ranaivoson G, Rajaonarivelo E, Laventure S, Rossella M, Aknouche F: [Epidemiological stratification of malaria in Madagascar]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1993, 60(1-2):50-59.
- Mouchet J, Gariou J: [Gonotrophic cycle of *Anopheles moucheti* Evans 1925, in a region of the South Cameroon]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1957, 50(5):676-681.
- Mousseau TA, Dingle H: Maternal effects in insect life histories. *Annu Rev Entomol* 1991, 36:511-534.

- Mousseau TA, Fox CW: The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecol Evol* 1998, 13(10):403-407.
- Mulamba C, Irving H, Riveron JM, Mukwaya LG, Birungi J, Wondji CS: Contrasting *Plasmodium* infection rates and insecticide susceptibility profiles between the sympatric sibling species *Anopheles parensis* and *Anopheles funestus* s.s: a potential challenge for malaria vector control in Uganda. *Parasit Vectors* 2014, 7:71.
- Müller G, Schlein Y: Sugar questing mosquitoes in arid areas gather on scarce blossoms that can be used for control. *Int J Parasitol* 2006, 36(10-11):1077-1080.
- Mutunga JM, Anderson TD, Craft DT, Gross AD, Swale DR, Tong F, Wong DM, Carlier PR, Bloomquist JR: Carbamate and pyrethroid resistance in the akron strain of *Anopheles gambiae*. *Pestic Biochem Physiol* 2015, 121:116-121.
- Nayar JK, Van Handel E: The fuel for sustained mosquito flight. *J Insect Physiol* 1971, 17:471-481.
- Neafsey DE, Waterhouse RM, Abai MR, Aganezov SS, Alekseyev MA, Allen JE, Amon J, Arca B, Arensburger P, Artemov G et al: Mosquito genomics. Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. *Science* 2015, 347(6217):1258522.
- Ng'habi KR, Horton A, Knols BG, Lanzaro GC: A new robust diagnostic polymerase chain reaction for determining the mating status of female *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 77(3):485-487.
- Ng'habi KR, Huho BJ, Nkwengulila G, Killeen GF, Knols BGJ, Ferguson HM: Sexual selection in mosquito swarms: may the best man lose? *Anim Behav* 2008, 76(105-112).
- Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM: Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008, 359(24):2619-2620.
- Nolan T, Papathanos P, Windbichler N, Magnusson K, Benton J, Catteruccia F, Crisanti A: Developing transgenic *Anopheles* mosquitoes for the sterile insect technique. *Genetica* 2011, 139(1):33-39.
- Noor AM, Mutheu JJ, Tatem AJ, Hay SI, Snow RW: Insecticide-treated net coverage in Africa: mapping progress in 2000-07. *Lancet* 2009, 373(9657):58-67.
- Norris LC, Main BJ, Lee Y, Collier TC, Fofana A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Adaptive introgression in an African malaria mosquito coincident with the increased usage of insecticide-treated bed nets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112(3):815-820.
- Norris LC, Main BJ, Lee Y, Collier TC, Fofana A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Adaptive introgression in an African malaria mosquito coincident with the increased usage of insecticide-treated bed nets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112(3):815-820.
- Nwakanma DC, Neafsey DE, Jawara M, Adiamoh M, Lund E, Rodrigues A, Loua KM, Konate L, Sy N, Dia I et al: Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Genetics* 2013, 193(4):1221-1231.
- Okanda FM, Dao A, Njiru BN, Arija J, Akelo HA, Toure Y, Odulaja A, Beier JC, Githure JI, Yan G et al: Behavioural determinants of gene flow in malaria vector populations: *Anopheles gambiae* males select large females as mates. *Malar J* 2002, 1:10.
- Oliva CF, Benedict MQ, Lemperiere G, Gilles J: Laboratory selection for an accelerated mosquito sexual development rate. *Malar J* 2011, 10:135.
- Oliva CF, Maier MJ, Gilles J, Jacquet M, Lemperiere G, Quilici S, Vreysen MJ, Schooneman F, Chadee DD, Boyer S: Effects of irradiation, presence of females, and sugar supply on the longevity of sterile males *Aedes albopictus* (Skuse) under semi-field conditions on Reunion Island. *Acta Trop* 2013, 125(3):287-293.

- Oliveira E, Salgueiro P, Palsson K, Vicente JL, Arez AP, Jaenson TG, Caccone A, Pinto J: High levels of hybridization between molecular forms of *Anopheles gambiae* from Guinea Bissau. *J Med Entomol* 2008, 45(6):1057-1063.
- Pakkasma S, Merila J, O'Hara RB: Genetic and maternal effect influences on viability of common frog tadpoles under different environmental conditions. *Heredity (Edinb)* 2003, 91(2):117-124.
- Papadopoulos NT, Liedo P, Muller HG, Wang JL, Molleman F, Carey JR: Cost of reproduction in male medflies: the primacy of sexual courting in extreme longevity reduction. *J Insect Physiol* 2010, 56(3):283-287.
- Pecharsky BL, McIntosh AR, Caudill CC, Dahl J: Swarming and mating behavior of mayfly *Baetis bicaudatus* suggest stabilizing selection for male body size. *Behav Ecol Sociobiol* 2002, 51:530-537.
- Penetier C, Warren B, Dabire KR, Russell IJ, Gibson G: "Singing on the wing" as a mechanism for species recognition in the malarial mosquito *Anopheles gambiae*. *Curr Biol* 2010, 20(2):131-136.
- Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, ler Moo C, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM *et al*: Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 2012, 379(9830):1960-1966.
- Pombi M, Caputo B, Simard F, Di Deco MA, Coluzzi M, della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Petrarca V: Chromosomal plasticity and evolutionary potential in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto: insights from three decades of rare paracentric inversions. *BMC Evol Biol* 2008, 8:309.
- Qvarnström A, Bailey RI: Speciation through evolution of sex-linked genes. *Heredity (Edinb)* 2009, 102:4-15.
- Ranson H, Abdallah H, Badolo A, Guelbeogo WM, Keraf-Hinzoumbe C, Yangalbe-Kalnone E, Sagnon N, Simard F, Coetzee M: Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malar J* 2009, 8:299.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V: Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 2011, 27(2):91-98.
- Reidenbach KR, Neafsey DE, Costantini C, Sagnon N, Simard F, Ragland GJ, Egan SP, Feder JL, Muskavitch MA, Besansky NJ: Patterns of genomic differentiation between ecologically differentiated M and S forms of *Anopheles gambiae* in West and Central Africa. *Genome Biol Evol* 2012, 4(12):1202-1212.
- Reinhold K: Maternal effects and the evolution of behavioral and morphological characters: a literature review indicates the importance of extended maternal care. *J Hered* 2002, 93(6):400-405.
- Riehle MM, Guelbeogo WM, Gneme A, Eiglmeier K, Holm I, Bischoff E, Garnier T, Snyder GM, Li X, Markianos K *et al*: A cryptic subgroup of *Anopheles gambiae* is highly susceptible to human malaria parasites. *Science* 2011, 331(6017):596-598.
- Rivero A, Agnew P, Bedhomme S, Sidobre C, Michalakis Y: Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis*. *Parasitology* 2007, 134(Pt 10):1355-1362.
- Roff DA: Predicting body size with life history models. *Bioscience* 1986, 36:316-323.
- Roux O, Diabaté A, Simard F: Larvae of cryptic species of *Anopheles gambiae* respond differently to cues of predation risk. *Freshwater Biology* 2013, 58:1178-1189.

- Royle NJ, Surai PF, Hartley IR: Maternally derived androgens and antioxidants in bird eggs: complementary but opposing effects? . *Behav Ecol* 2001, 12:381-385.
- Rundle HD, Nosil P: Ecological speciation. *Ecological Letter* 2005, 8:336-352.
- Rundle HD, Whitlock MC: A genetic interpretation of ecologically dependent isolation. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 2001, 55(1):198-201.
- Saether SA, Saetre GP, Borge T, Wiley C, Svedin N, Andersson G, Veen T, Haavie J, Servedio MR, Bures S *et al*: Sex chromosome-linked species recognition and evolution of reproductive isolation in flycatchers. *Science* 2007, 318(5847):95-97.
- Sanford MR, Demirci B, Marsden CD, Lee Y, Cornel AJ, Lanzaro GC: Morphological differentiation may mediate mate-choice between incipient species of *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS One* 2011, 6(11):e27920.
- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A: Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J* 2008, 7:163.
- Sawadogo PS, Namountougou M, Toe KH, Rouamba J, Maiga H, Ouedraogo KR, Baldet T, Gouagna LC, Kengne P, Simard F *et al*: Swarming behaviour in natural populations of *Anopheles gambiae* and *An. coluzzii*: Review of 4 years survey in rural areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop* 2014, 130C:24-34.
- Sawadogo SP, Costantini C, Penetier C, Diabate A, Gibson G, Dabire RK: Differences in timing of mating swarms in sympatric populations of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. (formerly *An. gambiae* M and S molecular forms) in Burkina Faso, West Africa. *Parasit Vectors* 2013a, 6:275.
- Sawadogo SP, Diabate A, Toe HK, Sanon A, Lefevre T, Baldet T, Gilles J, Simard F, Gibson G, Sinkins S *et al*: Effects of age and size on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *J Med Entomol* 2013b, 50 (2) : 285-293.
- Schluter D: Adaptive Radiation Along Genetic Lines of Least Resistance. *Evolution* 1996, 50 (5): 1766-1774.
- Schluter D: Ecology and the origin of species. *Trends Ecol Evol* 2001, 16(7):372-380.
- Schluter D: The Ecology of Adaptive Radiation. 2000, *Oxford University*(Press, Oxford).
- Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS, Carleton KL, Mrosso HD, Miyagi SI, Schneider MV, Maan ME, Tachida H, Imai H *et al*: Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* 2008, 455(7213):620-626.
- Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, Fotsing JM, Fontenille D, Besansky NJ, Costantini C: Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol* 2009, 9:17.
- Sinègre G, Babinot M, Vigo G, Gaven G, Julien JL: *Bacillus sphaericus* et démoustication urbaine. Bilan de cinq années d'utilisation expérimental de la spécialité Sphérimos dans le sud de la France. *Doc EILDm n°62* 1993, 21p.
- Slotman MA, Tripet F, Cornel AJ, Meneses CR, Lee Y, Reimer LJ, Thiemann TC, Fondjo E, Fofana A, Traore SF *et al*: Evidence for subdivision within the M molecular form of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* 2007, 16(3):639-649.
- Smith DL, Hay SI, Noor AM, Snow RW: Predicting changing malaria risk after expanded insecticide-treated net coverage in Africa. *Trends Parasitol* 2009, 25(11):511-516.
- Snow JW: Radiation, insects and eradication in North America. *An overview from screwworm to bollworm* 1988:3-13.

- Sokhna C, Cisse B, Ba el H, Milligan P, Hallett R, Sutherland C, Gaye O, Boulanger D, Simondon K, Simondon F *et al*: A trial of the efficacy, safety and impact on drug resistance of four drug regimens for seasonal intermittent preventive treatment for malaria in Senegalese children. *PLoS One* 2008, 3(1):e1471.
- Starmer WT, Polak M, Wolf LL, Barker JSF: Reproductive characteristics of the flower breeding *Drosophila hibisci* Bock (Drosophilidae) in eastern Australia: genetic and environmental determinants of ovariole number. *Evolution* 1998, 52: 806-815.
- Stone CM, Taylor RM, Roitberg BD, Foster WA: Sugar deprivation reduces insemination of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), despite daily recruitment of adults, and predicts decline in model populations. *J Med Entomol* 2009, 46(6):1327-1337.
- Stump AD, Fitzpatrick MC, Lobo NF, Traore S, Sagnon N, Costantini C, Collins FH, Besansky NJ: Centromere-proximal differentiation and speciation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(44):15930-15935.
- Takken W: Chemical ecology of insect vectors: temporal, environmental and physiological aspects. *Trends Parasitol* 2005, 21(2):57.
- Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, Tagbor H, Williams J, Bojang K, Njie F *et al*: Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *J Infect Dis* 2015, 211(5):680-688.
- Toe KH, N'Fale S, Dabire RK, Ranson H, Jones CM: The recent escalation in strength of pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzi* in West Africa is linked to increased expression of multiple gene families. *BMC Genomics* 2015, 16:146.
- Toe LP, Skovmand O, Dabire KR, Diabate A, Diallo Y, Guiguemde TR, Doannio JM, Akogbeto M, Baldet T, Gruenais ME: Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. *Malar J* 2009, 8:175.
- Touré YT, Petrarca V, Coluzzi M : Il complesso *Anopheles gambiae* in Mali. *Parassitologia* 1983, 25: 367-370.
- Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M: Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.str. in Mali, west Africa. *Genetica* 1994, 94(2-3):213-223.
- Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M: The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 1998, 40(4):477-511.
- Tripet F, *et al*.: Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76(1):81-87.
- Tripet F, Dolo G, Lanzaro GC: Multilevel analyses of genetic differentiation in *Anopheles gambiae* s.s. reveal patterns of gene flow important for malaria-fighting mosquito projects. *Genetics* 2005, 169(1):313-324.
- Tripet F, Toure YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G, Lanzaro GC: DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* 2001, 10(7):1725-1732.
- Turelli M, Orr HA: The dominance theory of Haldane's rule. *Genetics* 1995, 140(1):389-402.
- Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV: Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol* 2005, 3(9):e285.
- Turner TL, Hahn MW: Genomic islands of speciation or genomic islands and speciation? *Mol Ecol* 2010, 19(5):848-850.

- Van Handel E: Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of American mosquito Control Association* 1985a, 1:299-301.
- Van Handel E: Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of American mosquito Control Association* 1985b, 1: 302-303.
- Via S: Divergence hitchhiking and the spread of genomic isolation during ecological speciation-with-gene-flow. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012, 367(1587):451-460.
- Via S: Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends Ecol Evol* 2001, 16(7):381-390.
- Vreysen MJ, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, Juma KG, Dyck VA, Msangi AR, Mkonyi PA, Feldmann HU: *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *Journal of Economic Entomology* 2000, 93:123-135.
- Wang-Sattler R, Blandin S, Ning Y, Blass C, Dolo G, Toure YT, delle Torre A, Lanzaro GC, Steinmetz LM, Kafatos FC *et al*: Mosaic genome architecture of the *Anopheles gambiae* species complex. *PLoS One* 2007, 2(11):e1249.
- Watanabe TK, Lee WH, Inoue Y, Kawanishi M: Genetic variation of the hybrid crossability between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Jpn J Genet* 1977, 52:1-8.
- Weetman D, Wilding CS, Steen K, Pinto J, Donnelly MJ: Gene flow-dependent genomic divergence between *Anopheles gambiae* M and S forms. *Mol Biol Evol* 2012, 29(1):279-291.
- Weill M, *et al*.: The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol* 2000, 9(5):451-455.
- White BJ, Cheng C, Simard F, Costantini C, Besansky NJ: Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* 2010, 19(5):925-939.
- White BJ, Lawniczak MK, Cheng C, Coulibaly MB, Wilson MD, Sagnon N, Costantini C, Simard F, Christophides GK, Besansky NJ: Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(1):244-249.
- WHO, 2005. World malaria Report. RBM/WHO/UNICEF, Geneva, 120p.
- WHO: World malaria report. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/2014.
- WHO: World malaria report. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/2015>.
- Windbichler N, Papathanos PA, Crisanti A: Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet* 2008, 4(12):e1000291.
- 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(1):11-19.
- Wondji CS, Irving H, Morgan J, Lobo NF, Collins FH, Hunt RH, Coetzee M, Hemingway J, Ranson H: Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res* 2009, 19(3):452-459.
- Wu CI, Davis AW: Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *The American Naturalist* 1993, 142(2):187-212.

- Yaro AS, Traore AI, Huestis DL, Adamou A, Timbine S, Kassogue Y, Diallo M, Dao A, Traore SF, Lehmann T: Dry season reproductive depression of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *J Insect Physiol* 2012, 58(8):1050-1059.
- Yeh C, Klowden MJ: Effects of male accessory gland substances on the pre-oviposition behaviour of *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Insect Physiol* 1990, 36(11):799-803.
- Yuval B, Holliday-Hanson M, Washino RK: Energy budget of swarming male mosquitoes. *Ecol Entomol* 1994, 19:74-78.
- Yuval B, Kaspi R, Shloush S, Warburg MS: Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecol Entomol* 1998, 23:211-215.
- Yuval B: The other habit-sugar feeding by mosquitoes. *Bull Soc Vector Ecol* 1992, 17:150 - 156.

ANNEXES

Annexe 1 : Le Principe de la PCR et procédure d'extraction d'ADN

Le principe de la PCR

La PCR est une technique de biologie moléculaire découverte en 1983 par Karry Mullis et qui permet d'amplifier, en une très grande quantité, un fragment d'ADN. Elle correspond à la succession de plusieurs cycles de réaction comportant chacun 3 étapes qui s'effectuent à des températures différentes :

- **La dénaturation**, pendant laquelle l'ADN est dénaturé par une élévation de la température. A une température de 94°C, les liaisons hydrogènes établies entre les bases complémentaires des brins s'estompent, les deux brins se séparent et l'ADN double brins se dénature en ADN simple brin.

- **L'hybridation** : avec une baisse de la température jusqu'à 50°C, les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en formant des liaisons hydrogènes ; on dit que les amorces s'hybrident.

- **L'élongation ou extension**: 72°C est une température optimale pour l'activité de l'ADN polymérase (Taq polymérase), enzyme thermostable. Cette dernière est extraite d'une bactérie extrémophile appelée *Thermus aquaticus* vivant dans des sources thermales. Grâce aux dNTPs (Adénosine, Cytosine, Guanine et Thymine-triphosphates) libres dans la solution, la Taq polymérase synthétise des brins complémentaires à ceux de l'ADN matrice dont les bases s'apparient dans le sens 5' vers 3'.

Procédure d'extraction d'ADN au DNAzol pour des échantillons de moustiques frais, congelés ou conservés dans l'éthanol 70%

1. Placer l'échantillon dans un tube 1,5 ml stérile, ajouter 100µl de DNAzol et homogénéiser avec un broyeur électrique muni d'un piston
2. Centrifuger à 10000tours/mn pendant 10 mn
3. Transférer le surnageant dans un nouveau tube 1,5 ml
4. Ajouter 50 µl d'éthanol 100% dans chaque tube. Mélanger en inversant le tube 5 à 8 fois et garder à la température ambiante pendant 3 mn.
5. Centrifuger à 10000 tours/mn pendant 10 mn et jeter le surnageant.

6. Laver le culot d'ADN avec 750 µl d'éthanol et mélanger en inversant les tubes 5 à 8 fois pour suspendre le culot.
7. Centrifuger à 10000 tours/mn pendant 10 mn et jeter le surnageant.
8. Incuber les tubes ouverts à 25°C pendant au moins 3h pour sécher l'ADN
9. Ajouter 200 µl de tampon TE
10. Chauffer les tubes à 80°C pendant 1h afin de s'assurer que le culot d'ADN est bien dissout.
11. Vortexer et mesurer la concentration d'ADN à l'aide d'un NanoDrop.
12. Transférer la solution dans des tubes à conservation permanente et garder à -80°C.

Procédure d'extraction d'ADN du sperme récupéré dans la spermathèque des femelles

Un protocole pour l'isolement de l'ADN génomique du sperme extrait de la spermathèque de femelles d'*An. gambiae* s.l. en utilisant le « *Kit chargeSwitch* » d'ADN génomique des micro tissus

1. Chauffer le tampon de lyse à 55°C
2. Pour chaque échantillon, mélanger 500µl du tampon de Lyse (L15) et 5µl de la Proténase K
 - a. Préparer la lyse des tissus**
 1. Ajouter l'échantillon du sperme dans un tube Eppendorf stérile numéroté et ajouter 500µl du mélange
 2. Incuber l'échantillon de sperme dans le mélange à 55°C pendant une nuit
 3. Vortexer délicatement pendant 10-15 secondes pour mélanger
 4. Ajouter 2,5µl de Rnase A dans chaque tube
 5. Mélanger délicatement 5 fois à l'aide d'une pipette
 6. Incuber à la température ambiante pendant 5 minutes
 - b. Liaison magnétique de l'ADN**
 1. Vortexer le tube contenant les perles magnétiques pour obtenir une suspension
 2. Ajouter 100µl du Tampon de Purification (N5) à l'échantillon et mélanger 2 fois à l'aide d'une pipette
 3. Ajouter 20µl de la suspension magnétique à l'échantillon et mélanger 5 fois à l'aide d'une pipette

4. Incuber à la température ambiante pendant une minute pour permettre l'ADN à se lier aux perles magnétiques
5. Placer l'échantillon dans le « *MagnaRack* » pendant une minute
6. Récupérer soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette et jeter

c. Lavage

1. Enlever le tube du « *MagnaRack* »
2. Ajouter 500µl de tampon de lavage (W11) et mélanger délicatement 2 fois à l'aide d'une pipette pour suspendre de nouveau les perles magnétiques
3. Placer le tube dans le « *MagnaRack* » pendant une minute
4. A l'aide d'une pipette récupérer le surnageant et jeter

d. Elution de l'ADN

1. Enlever le tube du « *MagnaRack* » et ajouter 75µl de tampon d'élution (E5)
2. Mélanger délicatement à l'aide d'une pipette 10 fois pour re-suspendre les perles magnétiques
3. Incuber à la température ambiante pendant 5 minutes
4. Placer le tube dans le « *MagnaRack* » pendant une minute
5. Récupérer la suspension contenant l'ADN purifié et mettre dans un autre tube Eppendorf stérile numéroté
6. Conserver l'ADN à -20°C avant l'utilisation.

Annexe 2 :Protocole de dosage des métabolites d'*An. gambiae* s.l. par spectrophotométrie, gamme des standards et Préparations des réactifs et solutions

Protocole de dosage des métabolites

- * Enlever une patte et une aile
- * Placer le reste du moustique dans un tube (1,5ml) Eppendorf
- * Ajouter 100 µl de méthanol puis broyer
- * Ajouter à nouveau 100 µl de méthanol puis vortexer.
- * Séparer l'échantillon en deux fractions: 70µl pour les protéines et 70 µl pour les lipides, sucres et glycogène

PROTEINES	LIPIDES, SUCRES, GLYCOGENE		
Ajouter 730µl H ₂ O physiologique	Ajouter 680µl de chloroforme : méthanol		
Puis 200µl Bradford	Puis 100µl de sulfate de sodium		
Lire après 15mn à 595 nm	Centrifuger (maximum)		
	Séparer le surnageant en deux fractions de 350µl, une pour l'analyse des lipides et l'autre pour les sucres, et le culot pour l'analyse du glycogène		
	LIPIDES	SUCRES	GLYCOGENE
	Evaporer le surnageant à 95°C	Evaporer le surnageant à 95°C (éviter la dessiccation)	Renverser le tube sur du papier absorbant pour éliminer le reste du solvant
	Ajouter 37,5µl d'acide sulfurique	Ajouter 1000µl Anthrone	Ajouter 1000µl Anthrone
	Chauffer pendant 5mn	Chauffer pendant 15mn	Chauffer pendant 15mn
	Refroidir puis ajouter 1000µl Vanilline	Refroidir puis lire à 625nm	Refroidir puis lire à 625nm
	Lire après 10-15mn à 525 nm		

Gamme des standards utilisée

Gamme de standards Protéines									
Standard Albumine (25µg/ml H ₂ O physiologique)	0 (Contrôle)	50µl (1,25µg)	100µl (2,5µg)	200µl (5µg)	300µl (7,5µg)	400µl (10µg)	500µl (12,5µg)	600µl (15µg)	700µl (17,5µg)
Méthanol	70µl								
H ₂ O physiologique	730µl	680µl	630µl	530µl	430µl	330µl	230µl	130µl	30µl
Réactif de Bradford	200µl								
Lire après 15 mn à 595 nm									
Gamme de standards Lipides									
Standard Lipide (1µg/µl chloroforme)	0 (Contrôle)	50µl (1,25µg)	100µl (2,5µg)	200µl (5µg)	300µl (7,5µg)	400µl (10µg)	500µl (12,5µg)	600µl (15µg)	700µl (17,5µg)
Evaporer à 95°C									
Acide sulfurique	37,5µl								
Chauffer pendant 5mn									
Réactif de Vanilline	1000µl								
Lire après 10-15mn à 525nm									
Gamme de standards Sucres et Glycogène									
Standard de Glucose (µg/µl éthanol)	0 (Contrôle)	1µl	2µl	5µl	10µl	15µl	20µl	25µl	30µl
Evaporer à 95°C en évitant la dessiccation pour les sucres									
Anthrone	1000µl								
Chauffer pendant 15mn puis refroidir									
Lire à 625nm									

Préparations des réactifs et solutions

Réactif d'Anthrone:

- Mettre 300ml d'eau dans un Erlenmeyer
- Verser soigneusement 760ml d'acide sulfurique concentrée
- Dissoudre 1500mg d'Anthrone puis garder au réfrigérateur

Réactif de Vanilline:

- Dissoudre 600 mg de vanilline dans 100 ml d'eau chaude
- Ajouter 400 ml d'acide phosphorique 85% puis garder dans une bouteille ambrée.

Sulfate de sodium:

- Mettre 2 g de sulfate de sodium dans un bécher
- Compléter avec 100 ml d'eau puis garder la solution au réfrigérateur.

Solution standard de glucose (1mg/ml) pour la courbe d'étalonnage: Dissoudre 100mg de glucose dans 100ml d'éthanol 25% puis garder au réfrigérateur.

Solution standard de lipides (100mg/100ml) pour la courbe d'étalonnage: Dissoudre 100 mg d'huile végétale commerciale dans 100 ml de chloroforme puis garder à la température de laboratoire.

Chloroforme: Méthanol (1:2) : Mélanger un (1) volume de chloroforme pour deux (2) volumes de méthanol, puis garder à la température de laboratoire.

Eau physiologique : Dissoudre 2,19 g de NaCl dans 250 ml d'eau puis garder au réfrigérateur.

Annexe 2 : Protocole de dosage des métabolites d'*An. gambiae* s.l. par spectrophotométrie, gamme des standards et Préparations des réactifs et solutions

Protocole de dosage des métabolites

- * Enlever une patte et une aile
- * Placer le reste du moustique dans un tube (1,5ml) Eppendorf
- * Ajouter 100 µl de méthanol puis broyer
- * Ajouter à nouveau 100 µl de méthanol puis vortexer.
- * Séparer l'échantillon en deux fractions: 70µl pour les protéines et 70 µl pour les lipides, sucres et glycogène

PROTEINES	LIPIDES, SUCRES, GLYCOGENE		
Ajouter 730µl H ₂ O physiologique	Ajouter 680µl de chloroforme : méthanol		
Puis 200µl Bradford	Puis 100µl de sulfate de sodium		
Lire après 15mn à 595 nm	Centrifuger (maximum)		
	Séparer le surnageant en deux fractions de 350µl, une pour l'analyse des lipides et l'autre pour les sucres, et le culot pour l'analyse du glycogène		
	LIPIDES	SUCRES	GLYCOGENE
	Evaporer le surnageant à 95°C	Evaporer le surnageant à 95°C (éviter la dessiccation)	Renverser le tube sur du papier absorbant pour éliminer le reste du solvant
	Ajouter 37,5µl d'acide sulfurique	Ajouter 1000µl Anthrone	Ajouter 1000µl Anthrone
	Chauffer pendant 5mn	Chauffer pendant 15mn	Chauffer pendant 15mn
	Refroidir puis ajouter 1000µl Vanilline	Refroidir puis lire à 625nm	Refroidir puis lire à 625nm
	Lire après 10-15mn à 525 nm		

Gamme des standards utilisée

Gamme de standards Protéines									
Standard Albumine (25µg/ml H ₂ O physiologique)	0 (Contrôle)	50µl (1,25µg)	100µl (2,5µg)	200µl (5µg)	300µl (7,5µg)	400µl (10µg)	500µl (12,5µg)	600µl (15µg)	700µl (17,5µg)
Méthanol	70µl								
H ₂ O physiologique	730µl	680µl	630µl	530µl	430µl	330µl	230µl	130µl	30µl
Réactif de Bradford	200µl								
Lire après 15 mn à 595 nm									
Gamme de standards Lipides									
Standard Lipide (1µg/µl chloroforme)	0 (Contrôle)	50µl (1,25µg)	100µl (2,5µg)	200µl (5µg)	300µl (7,5µg)	400µl (10µg)	500µl (12,5µg)	600µl (15µg)	700µl (17,5µg)
Evaporer à 95°C									
Acide sulfurique	37,5µl								
Chauffer pendant 5mn									
Réactif de Vanilline	1000µl								
Lire après 10-15mn à 525nm									
Gamme de standards Sucres et Glycogène									
Standard de Glucose (µg/µl éthanol)	0 (Contrôle)	1µl	2µl	5µl	10µl	15µl	20µl	25µl	30µl
Evaporer à 95°C en évitant la dessiccation pour les sucres									
Anthrone	1000µl								
Chauffer pendant 15mn puis refroidir									
Lire à 625nm									

Préparations des réactifs et solutions

Réactif d'Anthrone:

- Mettre 300ml d'eau dans un Erlenmeyer
- Verser soigneusement 760ml d'acide sulfurique concentrée
- Dissoudre 1500mg d'Anthrone puis garder au réfrigérateur

Réactif de Vanilline:

- Dissoudre 600 mg de vanilline dans 100 ml d'eau chaude
- Ajouter 400 ml d'acide phosphorique 85% puis garder dans une bouteille ambrée.

Sulfate de sodium:

- Mettre 2 g de sulfate de sodium dans un bécher
- Compléter avec 100 ml d'eau puis garder la solution au réfrigérateur.

Solution standard de glucose (1mg/ml) pour la courbe d'étalonnage: Dissoudre 100mg de glucose dans 100ml d'éthanol 25% puis garder au réfrigérateur.

Solution standard de lipides (100mg/100ml) pour la courbe d'étalonnage: Dissoudre 100 mg d'huile végétale commerciale dans 100 ml de chloroforme puis garder à la température de laboratoire.

Chloroforme: Méthanol (1:2) : Mélanger un (1) volume de chloroforme pour deux (2) volumes de méthanol, puis garder à la température de laboratoire.

Eau physiologique : Dissoudre 2,19 g de NaCl dans 250 ml d'eau puis garder au réfrigérateur.

Annexe 3 : Communications orales et affichées

Sawadogo S.P., Niang A., Sanon A., Namountougou M., Maïga H., Toe K.H., Costantini C., Ouedraogo J-B., Guiguemde T.R., Dabire K.R. et Diabaté A., 2011. Etude de la selection intersexuelle et l'impact du statut nutritionnel sur les performances sexuelles d'*Anopheles gambiae* s.s. au Burkina Faso. 19th Conference of the African Association of Insect Scientists (AAIS), 09-12 November 2011, Nairobi, Kenya [Présentation orale].

Niang A, Maïga H, Sawadogo S, Dabiré K R, Tripet F & Diabaté A. Système de reproduction d'*Anopheles gambiae* : mécanismes d'isolement reproductif entre les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. 16 èmes Journées des Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso (JSSB), 08-11 mai 2012, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso [Poster].

Diabaté Abdoulaye, Niang Abdoulaye, Sawadogo Simon, Maïga Hamidou, Dabiré K Roch, Tripet Frederic and Lehmann Tovi. Assessment of the ecologically dependent postmating isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. EMBO Conference, 15-19 July 2013, Kolymbari, Greece [Présentation orale].

Hamidou Maïga, Abdoulaye Niang, Simon Sawadogo, Roch Dabire, Susan Rosemary Lees, Jeremy Gilles, Frederic Tripet, Abdoulaye Diabate. Energy budget and wing size of swarming and mating m and s molecular forms of *An. gambiae* s.s. males in wild populations. EMBO Conference, 15-19 July 2013, Kolymbari, Greece [Présentation orale].

Niang Abdoulaye, Sawadogo Simon, Maïga Hamidou, Dabiré K Roch, Tripet Frederic, Lehmann Tovi and Diabaté Abdoulaye. Assessment of the ecologically dependent postmating isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. 6th international congress of Society for Vector Ecology (SOVE), 22-27 September 2013, California, USA [Présentation orale].

Niang Abdoulaye, Sawadogo Simon, Maïga Hamidou, Dabiré K Roch, Tripet Frederic, Lehmann Tovi and Diabaté Abdoulaye. Evidence of ecological selection against hybrids as a post-zygotic isolation between M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. 6th MIM Pan-African Malaria Conference, 6-11 October 2013, Durban, South Africa [Présentation orale].

Sawadogo S. P., **Niang A.**, Maïga H., Dabiré K. R., Tripet F., and Diabaté A., 2013. Targeting male mosquito behaviour for malaria control. Sixth MIM Pan-African Malaria Conference, 6-11 October 2013 in Durban, South Africa [Poster].

Niang A, Sawadogo S, Maïga H, Dabiré K R, Konaté Lassana, Tripet F, Lehmann T and Diabaté A. Mise en évidence des barrières reproductives écologique et intrinsèque entre *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae* en milieu sémi-naturel. 17èmes Journées des Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso (JSSB), 06-09 mai 2014, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso [Présentation orale].

Sawadogo S.P., **Niang A.**, Maïga H., Poda S., Dabiré K.R., Diabaté A., 2015. Development of New Approach to Effectively Measure Malaria Vector Abundance: Potentials in Using Mosquito Swarms. 2nd Pan-African Mosquito Control Association (PAMCA) Annual Conference, 6th - 8th of October 2015 at Dar es Salaam International Conference Centre, Tanzania [Présentation orale].

Abdoulaye Niang, Simon P. Sawadogo, Patric Stéphane Epopa, Hamidou Maïga, Lassana Konaté, Roch K. Dabiré, Abdoulaye Diabaté, Frederic Tripet. Genomic islands, reproductive isolation and asymmetric introgression between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*. 64th annual meeting, American Society of Tropical Medicine & Hygiene (ASTMH), 25-29 October 2015, Philadelphia, USA [Présentation orale].

Annexe 4 : Articles publiés ou soumis

Article 1 :

Niang et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:596
DOI 10.1186/s13071-015-1190-x



RESEARCH

Open Access



Does extreme asymmetric dominance promote hybridization between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. in seasonal malaria mosquito communities of West Africa?

Abdoulaye Niang¹, Patric S. Epopa¹, Simon P. Sawadogo¹, Hamidou Maïga¹, Lassana Konaté², Ousmane Faye², Roch K. Dabiré¹, Frédéric Tripet^{2*} and Abdoulaye Diabaté¹

Abstract

Background: *Anopheles gambiae* s.s. and *An. coluzzii* are two of the most important malaria vector species in sub-Saharan Africa. These recently-diverged sibling species do not exhibit intrinsic post-zygotic barriers to reproduction and are thought to be separated by strong assortative mating combined with selection against hybrids. At present, little is known about the ecological conditions that determine hybridization and introgression between these cryptic taxa.

Methods: Swarm segregation and assortative mating were studied in Western Burkina Faso in the villages of Vallée du Kou (VK7) and Soumoussou which differed in terms of which sibling species was much rarer than the other, and in Bana where both occurred in similar proportions. Swarms and pairs in copula were collected and genotyped, the proportion of intra and interspecific mating determined, and interspecific sperm transfer checked genetically. Females were collected through larval and adult indoor collections and genotyped or sexed-and-genotyped via a novel multiplex PCR.

Results: A total of 3687 males and 220 females were collected and genotyped from 109 swarms. Only 3 swarms were composed of males from both species, and these were from the village of VK7 where *An. gambiae* s.s. was comparatively rare. Mixed-species pairs captured in copula were only detected in that area and made for 3.62 % and 100 % of mating pairs involving *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. individuals, respectively. The high *An. gambiae* s.s. cross-mating rate was mirrored by high rates of hybridizations estimated from female larvae and adults indoor collections. This contrasted with Soumoussou, where despite being much less common than *An. gambiae* s.s., *An. coluzzii* males did not form mixed swarms, females were not found in interspecific swarms or copula and hybridization rates were low in both sibling species.

Conclusions: These data suggest that ecological conditions leading to rare *An. gambiae* s.s. in populations dominated by *An. coluzzii* may promote a breakdown of spatial swarm segregation and assortative mating between the two species. The lower overall hybridization rates observed at the larval and adult indoor stages compared to cross-mating rates support the idea that post-mating selection processes acting against hybrids may occur mostly prior to and/or at the early larval stages.

* Correspondence: frtripet@leeds.ac.uk

²Centre for Applied Entomology and Parasitology, School of Life Sciences, Leeds University, Staffordshire, UK

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Niang et al.; licensee BioMed Central. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The *Anopheles gambiae* complex is responsible for the vast majority of malaria transmission in sub-Saharan Africa [1, 2]. Within the complex, the sibling species *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson and *An. gambiae* s.s. Giles, formerly known as the M and S molecular form of *An. gambiae* s.s. [3], are dominant in many malaria vector communities [1, 4]. These cryptic taxa are thought to be undergoing a process of speciation with gene flow [1, 5, 6] and understanding their mechanisms of pre-mating and post-mating reproductive isolation has important implications for vector control [7, 8].

In the laboratory, hybridization between the sibling species produces fertile and viable 1st generation progeny and backcrosses [9]. Therefore, reproductive isolation in natural populations is thought to occur through strong assortative mating combined with selection against hybrids [10, 11]. Of these two processes, the first is the best documented [8]. The two species mate in flying aggregations formed by males at dusk called swarms. These swarms are visited by females to find a mate, leading to the formation of a mating pair that leaves the swarm in copula [8, 12]. Assortative mating occurs via a combination of spatial swarm segregation [13, 14] and, within swarms, by short-range recognition mechanisms, among which flight-tones are believed to play an important role [8, 15]. In most parts of West Africa, despite these strong pre-mating barriers, cross-insemination between the two species occurs occasionally, resulting in rare hybrids [5, 10]. One crucial consequence of such residual gene flow for vector control is that pesticide resistance genes can introgress between the two species, as recently described in Burkina Faso and Mali [16–19]. Another consequence is that genetic vector control programmes aiming to spread genes of refractoriness to *Plasmodium* across populations could potentially take advantage of this residual gene flow to impact several target populations simultaneously [8]. There are however exceptions to this pattern of limited local hybridization. Along the Western coast of Africa, several hybrid zones have been observed where gene flow is thought to be much higher, [20, 21] suggesting either a different mating behaviour or looser selection pressure against hybrids [22–24]. Whether these hybrid zones are a recent phenomenon due to environmental changes as suggested by some authors [3] or have been in place for much longer is currently unknown.

Divergent ecological adaptations between the sibling species have been shown for a variety of traits, including larval anti-predator responses, larval habitat segregation, and aestivation strategies [25–28]. However, the prediction that these differences should result in decreased fitness in F_1 hybrids (1st generation hybrids) and $F_{1,n}$ hybrids (F_2 backcrosses and recombinants from subsequent generation) is currently supported by population

genomic data rather than from direct field experimental evidence. Comparative genomic studies have shown that *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. populations are consistently genetically differentiated at pericentromeric regions of the X, 2 L and 3 L chromosomes [29, 30]. These so-called 'islands of speciation' are thought to be key to assortative mating as well as ecological divergence [6]. Whether genetically differentiated areas detected outside the islands in some studies are the result of population-level differential selection to specific habitats or reflect genome-wide patterns differentiation associated with a more advanced stage of speciation of the sibling species is still debated [5, 31, 32]. Crucially, the pericentromeric islands typical of each subtaxa were found to be consistently genetically associated amongst populations, even those undergoing hybridization, supporting the notion that $F_{1,n}$ hybrids at those loci are selected against in natural populations [23, 24, 30]. More recently, sympatric populations in Ghana, Burkina Faso and Mali have recently witnessed the introgression of the entire 2 L pericentric island of *An. gambiae* s.s. containing pesticide resistance loci, into *An. coluzzii* [19, 32]. Interestingly, following the initial genetic sweep, *An. coluzzii* populations have been observed to regain their original *An. coluzzii*-like pericentric 2 L region thereby further strengthening the hypothesis of selection against hybrids [19].

Comparative genomics analyses also suggest that introgression between *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. is asymmetrical and occurs more commonly from the former to the later [23]. In this regard, the recent adaptive introgression of the 2 L pericentric island from *An. gambiae* s.s. into *An. coluzzii* is proof that gene flow can sometimes occur in the opposite direction [19, 32]. Population genomic studies also hypothesized that *An. gambiae* s.s. females may be more prone to mating with heterospecific males than *An. coluzzii* females [5]. Male anophelines are hemizygous at the X chromosome inherited from their mother. In the first large study of the spatiotemporal dynamics of hybridization between the sibling species, 18 out of 19 F_1 hybrid males collected in Guinea Bissau possessed an *An. gambiae* s.s. maternal X chromosome [5]. Thus, barring the possibility of strong selection acting specifically against hybrid male progeny from *An. coluzzii* females, this suggests that *An. gambiae* s.s. females are more permissive to cross-mating [5].

At present very little is known of the ecological conditions that lead to the spatial and temporal patterns of gene flow reported in West Africa. One possible explanation would be that the extreme seasonal variation in abundance of the sibling species observed in many sites of the Soudanian and Sahelian areas could interfere with key processes of assortative mating. *Anopheles coluzzii* and *An. gambiae* s.s. populations in these ecological zones differ in their draught tolerance and aestivation strategies [28, 33, 34]. Whilst *An. coluzzii* populations

reduce their reproduction during the dry season and aestivate at low densities locally; *An. gambiae* s.s. populations crash towards the end of the wet season and disappear completely during the dry season [34]. It is unknown whether *An. gambiae* s.s. individuals aestivate in neighbouring, more clement regions where breeding might continue. However, studies have shown that in the subsequent wet season *An. gambiae* s.s. reappears in sympatric populations long after the resurgence of *An. coluzzii* [34, 35]. Depending on local environmental conditions such as ambient humidity and rainfall, *An. gambiae* s.s. may outcompete *An. coluzzii* and become the dominant species or remain the minor one.

The onset of the rainy season that sees *An. coluzzii* being extremely dominant in Soudanian and Sahelian malaria vector communities [34, 35] could be crucial to the incomplete and asymmetric reproductive isolation observed between these two species. Recent studies conducted on spatial swarm segregation between *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. in Western Burkina Faso give insight into how this might affect swarm dynamics. The analyses of a large number of swarms revealed a strong correlation between the number of males swarming and the number of mating pairs and unpaired females captured in swarms [36, 37]. When one species is very dominant leading to a high density of large swarms, males of the minor species may have difficulties in finding conspecific males and forming and maintaining monospecific swarms [36, 37]. This may explain the higher occurrence of mixed-species swarms reported in such environment [37, 38]. Furthermore, if females cannot find conspecific swarms easily due to their rarity or limited size and attractiveness, they may have to settle for more conspicuous interspecific swarms and mate disassortatively. If this hypothesis is true, other ecological conditions that result in strong dominance of one population over the other could potentially result in disruption of assortative mating. Intensive rice cultivation, for example, creates an abundance of larval breeding sites that better suit *An. coluzzii* larvae and promote its strong dominance throughout the year.

These ecological setting could also explain the apparent asymmetry in cross-mating permissiveness between the two species suggested by the genomic evidence as these studies stem from the Soudanian and Sahelian ecological zones. Field studies have examined evidence for interspecific mating amongst the two sibling species through the detection of mixed-species copula in swarms and/or detection of heterospecific males in their spermatheca are rare given the amount of time they require either for sampling pairs in copula from swarms and/or to conduct sperm analyses. In the first paper describing the strength of assortative mating between the two species in sympatric populations in Mali, 1 of 55 (1.82 %) *An. gambiae*

s.s. and 2 of 195 (1.03 %) of *An. coluzzii* females were cross-inseminated [10]. A recent study of swarms conducted in two villages of Burkina Faso, where mosquito communities were dominated either by *An. coluzzii* or *An. gambiae* s.s., identified 4 interspecific copulae out of a total of 143, 3 of which involved *An. gambiae* s.s. females [38]. Therefore, the data suggest that *An. gambiae* s.s. females might be more prone to cross-mating than those of *An. coluzzii*, but is currently too scant to statistically support this hypothesis.

In the following study, extensive swarm sampling was again conducted in Western Burkina Faso in the villages of Vallée du Kou (VK7) and Soumouso where one sibling species was each time much rarer than the other, as well as in the village of Bana where the two occurred in similar proportions. A large sampling and genotyping effort was undertaken to detect mixed-males swarms, females visiting heterospecific swarms, and intra and interspecific mating pairs. Finally, the sperm of females found in copula with heterospecific males was genetically analyzed using a DNA extraction protocol for small amounts of starting material. The resulting mixed-mating pairs rates were compared to hybridization rates measured from female larvae that were sexed molecularly and genotyped using a single multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) [39, 40]. They were also compared to hybridization rates calculated from indoor resting female catches. In addition to clarifying the putative role of extreme species dominance in asymmetric disruption of reproductive isolation, the comparison of hybridization rates at different life stages offer some insights on possible sources of selection pressure against hybrids. These findings are relevant to our understanding of gene flow patterns amongst population of African malaria vectors with important implications for their vector control.

Methods

Study sites

Vallée du Kou is a rice-growing area developed in the early 1970's in Western Burkina Faso, about 30 km North of Bobo-Dioulasso and situated between 4° 24' 42"W longitude and 11° 23' 14"N latitude. It contains seven villages totalling 4470 habitants. The survey was conducted in VK7, located on the boundary of the rice field and cotton cultivation area characterized by wooded savannah. The mean annual rainfall is about 1200 mm and the area is characterized by a rainy season from May to October and a dry season from November to April. The river Kou is a permanent source of irrigation and there are 2 rice crops per year (January-May and July-November). Because of the irrigation system, the rice fields form permanent mosquito breeding sites that are preferentially colonized by *An. coluzzii*. During the rainy season, additional rain-dependent breeding

sites are very often found in depressions and ponds, allowing the development of *An. gambiae* s.s..

Soumouso (11°00'46"N, 4°02'45"W) and Bana (12°36'00"N, 3°28'59"W) are villages located in the humid savannah of Western Burkina Faso. As in VK7 the rainy season occurs from May to October followed by a long dry season from November to April. The average annual rainfall ranges from 1000–1200 mm. In Soumouso, both incipient species coexist in sympatry and their highest density occurs in September. However, the relative frequencies of the two species change over time with *An. gambiae* s.s. being predominant from July to November, and *An. coluzzii* dominating from December to June. *Anopheles funestus*, *An. arabiensis* and *An. nili* are also found at lower densities. The village of Bana is characterized by comparable seasonality but has more balanced densities of *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s..

Swarm monitoring

An exhaustive survey of swarms was undertaken by trained observers in the three study sites: VK7, Soumouso and Bana from July to November 2011. Swarm locations were mapped using a global positioning system (GPS) GARMIN, series GPSMAP®62.2.3 with measurements of latitude and longitude accurate to within 3 m. Observations were made to identify swarm sites scattered throughout the entire villages that were used every evening. All swarms were then sampled 6 times every month from July to November using insect nets as described previously [13, 14, 41]. In VK7 and Soumouso, mating pairs were also collected in order to estimate the rate of intraspecific versus interspecific mating. To ensure equal sampling of all swarms, two capturees attended the known swarming sites and spent the first 15 min from the initiation of the mating swarm (first male arriving) capturing mating pairs before they collected the whole swarm. Mating pairs were collected as they formed and fell or flew out of swarms. Mosquitoes were aspirated into separate cups for each swarms, killed with ethyl ether, identified morphologically as *An. gambiae* s.l. [42] and kept in 70 % ethanol in 1.5 ml tubes. All sampled males, females from mating pairs, and unpaired females were then again checked morphologically before being genotyped to species level (see below).

Adult females and larvae sampling

During the same period as swarm monitoring, indoor resting females of *An. gambiae* s.l. were collected from houses or inhabited huts from the villages of Soumouso and VK7 using mouth aspirators. They were described morphologically as described above and stored in 70 % ethanol before being genotyped to species level (see below).

Anopheles gambiae s.l. larvae were collected from several pools of water spread throughout the villages of Soumouso and VK7 on the third week of each month

to ensure that larval and adult cohorts were collected at similar periods in each village. All collected mosquito larvae were examined carefully to separate anopheline and culicine larvae before classifying them from 1st to 4th instars and immediately preserving them in 70 % ethanol for subsequent DNA analysis. The larval site types including footprints, puddle, pond, and rice field were recorded.

Mosquito identification by Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA was extracted from males and females from swarms and indoor residual fauna that were identified morphologically as *An. gambiae* s.l. [42]. A single leg or other part of the carcass was used excluding female abdomens to avoid possible contamination with DNA from sperm in their spermathecae. Individual DNA extractions were genotyped to species level by PCR [40] and putative hybrids further confirmed by PCR followed by Restriction Fragment Length Polymorphism genotyping as described in [43].

Females caught in copula with a heterospecific male were dissected in order to confirm effective cross-insemination. Their spermatheca was isolated, broken open, and the sperm bundle transferred to a 1.5 ml centrifuge tube as described in previous studies [10, 44]. DNA extractions were done using the ChargeSwitch® gDNA Micro Tissue Kit (Life Technologies, USA) following the manufacturer's instructions. The sperm DNA was then analyzed using the diagnostic PCR-RFLP [43].

DNA was extracted from individual larvae using a standard protocol [38]. Because hybrid males have a single copy of the hemizygous X chromosome, they cannot be identified using classic molecular diagnostics based on polymorphisms in the rDNA region on that chromosome. Consequently, all larvae were sexed and genotyped to the species level using a single multiplex PCR that combined the Y-chromosome specific primers used for sperm detection [39] with primers targeting a specific insertion of a SINE (Short Interspersed Element) located in division 6 of the X-chromosome and commonly used for species identification [40]. The primers (S200X6-1 F 5'-TCGCCTT AGACCTTGCGTTA-3'; S200X6-1R 5'-CGCTTCAAGA ATTCGAGATAC-3' for the SINE diagnostic, and S23-F 5'-CAAAACGACAGCAGTTCC-3'; S23-R 5'-TAAACCA AGTCCGTCGCT-3') for Y-chromosome detection, were combined into a single reaction after checking for possible dimer problems using the tool available at <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/multipleprimer/>. A PCR mixture contained 2 µl template DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µl of 5x buffer, 0.2 mM of each dNTPs, 1.5 pmol of each S200X6.1 primers, 2 pmol of each S23 primers and 0.05 units of Taq polymerase for a total volume of 25 µl was used. The PCR reactions were performed on a Bio-Rad S1000™ thermocycler with an

initial denaturation at 94 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 54 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, followed by a final elongation step at 72 °C for 10 min. The PCR products were separated by gel electrophoresis to generate diagnostic sex and species-specific banding phenotypes (Fig. 1). Male samples from larval cohorts and their genotypes were not used in further analyses.

Statistical analyses

Differences in hybridization rates at the mating stage (rates of mixed-species to interspecific pairs), the female larval and adult stages (rates of hybrids to non-hybrid females) in the VK7 and Soumouso populations, as well as possible selection acting against hybrids from the mating to larval and to adult stage were analyzed using Logistic Regression modelling. The probabilities associated with main effects are Chi-square likelihood-ratio tests and pair-wise comparisons of different levels within effects (e.g. mating, adult and larval stage) are Chi-square likelihood-ratio tests conducted on the odd-ratios generated by the Logistic Regression. Critical pair-wise comparisons were further confirmed using Fisher-Irwin exact tests. Both maximum-likelihood and exact test approaches are typically more robust to low cell counts than the Pearson Chi-square tests [45]. All statistical analyses were carried out using JMP (SAS Institute inc.).

Results

Swarm sampling and analyses

A total of 109 swarms were sampled for mating pairs and collected from July to November 2011 in the 3 study sites.

In VK7, 2289 male mosquitoes sampled from 44 swarms were genotyped to species level. Of these, 41 swarms (93.18 %) were exclusively composed of *An. coluzzii*; the 3 remaining swarms (6.82 %) were a mix of

An. coluzzii and *An. gambiae* s.s. males with a large majority of *An. coluzzii* (98.08 %, 256/261). Monospecific *An. gambiae* s.s. could not be found in VK7 (Table 1). Thirty-one free flying unpaired females collected from different swarms were identified as *An. coluzzii*. A total of 138 pairs in copula were collected from 12 swarms. Of these, 133 (96.38 %) were *An. coluzzii* pairs. The 5 remaining pairs collected in 3 swarms were heterospecific (3.62 %); 4 *An. gambiae* s.s. females paired with *An. coluzzii* males and one *An. coluzzii* female paired with an *An. gambiae* s.s. male. Monospecific *An. gambiae* mating pairs were not observed (Table 1). Repeated PCR-RFLP analyses of the sperm DNA extracted from the spermathecae showed that these interspecific mating resulted in effective sperm transfer in all 5 cases (Fig. 2). Strikingly, the rate of interspecific mating for the rare *An. gambiae* s.s. was therefore 100 % (5/5) (95 % CIs: 56.6–100) whilst for the dominant *An. coluzzii* the cross-mating rate was much lower at 3.62 % (5/138) (95 % CIs: 1.56–8.20) (Fisher-Irwin test; $N = 143$, $df = 1$, $P < 0.001$).

No mixed swarms were detected in Soumouso and Bana (Table 1). In the former, 1014 (96.94 %) *An. gambiae* s.s. males were captured from 27 monospecific swarms and 32 (3.06 %) *An. coluzzii* males from a single monospecific swarm. Furthermore, 49 mating pairs and 2 unpaired females were collected in 13 swarms and were all identified as *An. gambiae* s.s. (Table 1). In Bana, a total of 352 males were collected from 37 monospecific swarms, with 120 (34.09 %) *An. coluzzii* males from 18 swarms and 232 (65.91 %) *An. gambiae* s.s. males from 19 swarms (Table 1).

Female larvae and adult indoor resting females

Larval sampling was conducted in VK7 and Soumouso from July to November 2011 for time periods matching



Fig. 1 Multiplex-PCR for simultaneous sexing and species-identification of *An. gambiae* s.l. larvae. The primers developed for 3 species-identification diagnostic [40] and for amplification of a male Y-chromosome specific sequence [39] were combined in a single optimized PCR reaction. The lanes were: DNA size ladder (SL, 1 and 21); negative control (C, 2); males (3–5) and females (6–8) *An. coluzzii* bands, hybrid female bands (9–11), males (12–14) and female *An. gambiae* s.s. (15–17) bands and *An. arabiensis* (18–20) female bands. Expected sizes are indicated in base-pairs (bp)

Table 1 Incomplete assortative mating between *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. in mating swarms collected in the villages of VK7, Soumoussou and Bana in Western Burkina Faso

Location ^a	Swarms		Unpaired males		Unpaired females		Intraspecific pairs ^b		Interspecific pairs ^b	
	Swarms	Species ^b	<i>coluzzii</i>	<i>gambiae</i>	<i>coluzzii</i>	<i>gambiae</i>	<i>coluzzii</i>	<i>gambiae</i>	<i>coluzzii</i>	<i>gambiae</i>
VK7	41	<i>An. coluzzii</i>	2028	0	29	0	97	0	0	3
VK7	0	<i>An. gambiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
VK7	3	mixed	256	5	2	0	36	0	1	1
Soumoussou	1	<i>An. coluzzii</i>	32	0	0	0	0	0	0	0
Soumoussou	27	<i>An. gambiae</i>	0	1014	0	2	0	49	0	0
Soumoussou	0	mixed	-	-	-	-	-	-	-	-
Bana	18	<i>An. coluzzii</i>	120	0	0	0	-	-	1	1
Bana	19	<i>An. gambiae</i>	0	232	0	0	-	-	-	-
Bana	0	mixed	-	-	-	-	-	-	-	-
All populations	60	<i>An. coluzzii</i>	2180	0	29	0	97	0	0	3
All populations	46	<i>An. gambiae</i>	-	1246	0	2	0	49	0	0
All populations	3	mixed	256	5	2	0	36	0	1	1
Grand Total	109		2436	1251	39	0	193	49	1	4

^aThe species of females caught in intraspecific or interspecific mating pairs (in copula) is indicated
^bSwarms are described in terms of their male species composition

those of swarm sampling. This resulted in sexing and genotyping of 1438 wild larvae captured in 12 larval breeding sites from VK7 (36.4 %) and 21 from Soumoussou (63.6 %). Among 779 larvae from Soumoussou, 407 (52.2 %) were identified as females and 372 (47.8 %) as males. In VK7, the 659 larvae identified were composed of 312 (47.3 %) females and 347 (52.7 %) males. Only females were used for comparisons of relative abundances of the sibling species and detection of hybrids (Table 2).

Predictably, the vast majority of the 312 1-4th instars larvae collected in VK7 were *An. coluzzii* (98.72 %). Only 3 *An. gambiae* s.s. (0.96 %) and one hybrid larva (0.32 %) were found. In Soumoussou, 82.56 % of the 407 larvae

were *An. gambiae* s.s., 16.95 % *An. coluzzii*, and 2 were hybrid larvae (0.49 %). The resulting hybridization rates at the larval stage were 0.32 and 25 % for *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. in VK7 and, respectively, 2.82 and 0.59 % in Soumoussou (Table 2).

A total of 733 adult indoor resting females, 329 (44.9 %) in VK7 and 404 (55.1 %) in Soumoussou were collected from houses and huts for comparable time periods as the larvae and swarms sampling. The relative abundance of females followed the same patterns observed at the larval stage. In VK7, 98.78 % of adult females were *An. coluzzii*, 2 (0.61 %) *An. gambiae* s.s. and 2 (0.61 %) were hybrids. In Soumoussou, 73.02 % were *An. gambiae* s.s. and 26.73 % *An. coluzzii*, whilst a single hybrid female (0.25 %) was detected. Thus, the resulting hybridization rates at the adult stage for *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. were 0.61 % and 50.00 % in VK7 and 0.92 % and 0.34 % in Soumoussou, respectively (Table 2).

Hybridization rates and selection against hybrids

Differences in hybridization rates at the mating stage (proportion mixed-species pairs), the female larval and adult stages (proportion hybrids) in the VK7 and Soumoussou populations, as well as possible selection acting against hybrids from the mating to larval and to adult stage were analyzed using Logistic Regression modelling (Table 3). Hybridization rates were significantly higher in *An. gambiae* s.s. and in VK7 than in Soumoussou and there was a strong interaction between species and population on hybridization rates (Fig. 3). In other words, *An. gambiae* s.s. hybridized at a very high rate when rare in VK7 but at comparable rates to *An. coluzzii* in Soumoussou (Table 3).

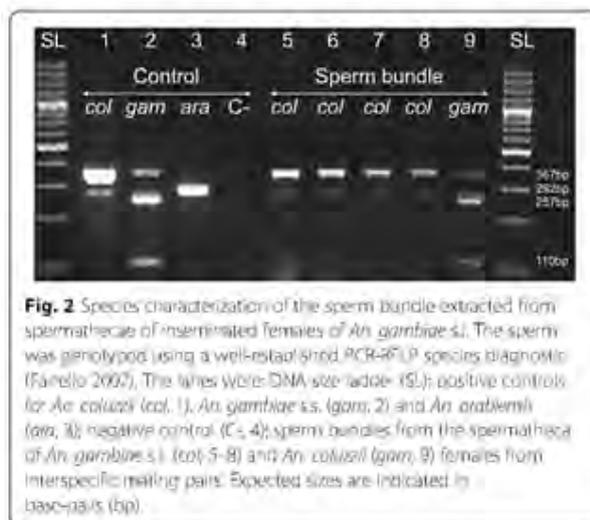


Fig. 2 Species characterization of the sperm bundle extracted from spermathecae of inseminated females of *An. gambiae* s.l. The sperm was genotyped using a well-established PCR-RFLP species diagnostic (Farelo 2007). The lanes were: DNA size ladder (SL); positive controls for *An. coluzzii* (col, 1), *An. gambiae* s.s. (gam, 2) and *An. arabiensis* (ara, 3); negative control (C-, 4); sperm bundles from the spermathecae of *An. gambiae* s.s. (col, 5-8) and *An. coluzzii* (gam, 9) females from interspecific mating pairs. Expected sizes are indicated in base-pairs (bp).

Table 2 Frequencies of female *An. coluzzii*, *An. gambiae* s.s. and hybrids at the larval and adult indoor resting stages in VK7 and Soumoussou during the rainy season

Locality	Life stage	Sample sizes (%)			Total	Percent hybridization (CIs)		
		<i>coluzzii</i>	<i>gambiae</i>	hybrids		<i>coluzzii</i>	<i>gambiae</i>	Both
VK7	larvae	308 (98.72)	3 (0.96)	1 (0.32)	312	0.32 (0.05-1.81)	25.0 (4.56-69.94)	0.32 (0.06-1.81)
VK7	adults	325 (98.78)	2 (0.61)	2 (0.61)	329	0.61 (0.16-2.22)	50.0 (15.00-84.99)	0.61 (0.17-2.22)
VK7	Total	633 (98.75)	5 (0.78)	3 (0.47)	641	0.47 (0.16-1.38)	37.5 (13.68-69.42)	0.47 (0.16-1.37)
Soumoussou	larvae	69 (16.95)	336 (82.56)	2 (0.49)	407	2.82 (0.78-9.70)	0.59 (0.16-2.13)	0.49 (0.13-1.78)
Soumoussou	adults	108 (26.73)	295 (73.02)	1 (0.25)	404	0.92 (0.16-8.01)	0.34 (0.06-1.89)	0.25 (0.04-1.14)
Soumoussou	Total	177 (21.82)	631 (77.81)	3 (0.37)	811	1.67 (0.57-4.78)	0.47 (0.16-1.38)	0.37 (0.13-1.08)
All	larvae	377 (52.43)	339 (47.15)	3 (0.42)	719	0.79 (0.27-2.30)	0.88 (0.30-2.25)	0.42 (0.14-1.22)
All	adults	433 (59.07)	297 (40.51)	3 (0.41)	733	0.69 (0.23-2.00)	1.00 (0.34-2.90)	0.41 (0.14-1.20)
All	Grand total	810 (55.78)	636 (43.80)	6 (0.41)	1452	0.74 (0.34-1.59)	0.94 (0.43-2.02)	0.41 (0.19-0.90)

Based on the same statistical model, there was no evidence that hybrids survived less than homozygous individuals from either sibling species from the larval to the adult stage (Likelihood-ratio test on odds ratios: $P=0.851$). However, there was a stark decrease in hybridization rates from the mating stage to the larval or adult stages (Likelihood-ratio tests on odds ratios: $P<0.003$ in both cases) suggesting the presence of post-mating selection pressures acting shortly after cross-mating or at the early larval stages. The same results were obtained across populations when conducting separate Logistic Regressions for the rare *An. gambiae* s.s. (Likelihood-ratio tests on odds ratios: $P<0.002$ in both cases) and the more abundant *An. coluzzii* (Likelihood-ratio tests on odds ratios: $P<0.0323$ in all cases). Overall pair-wise differences in hybridization rates between the mating stage and larval or adult stage were also tested using Fisher-Irwin exact tests, which confirmed the results obtained by maximum likelihood ($P<0.034$ in all cases).

Discussion

The results of this study confirm the importance of spatial swarm segregation as a strong reproductive isolation mechanism between *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. that drastically decrease the likelihood of natural hybridization the sibling species in different locations in the Soudanian and Sahelian ecological zones [14, 37, 38]. However, this study offers new insights on the environmental conditions

that promote residual hybridization and potential introgression between the cryptic taxa in their natural communities. During the rainy season of 2011, mixed swarms were only detected in the village of VK7 where *An. coluzzii* was over-abundant and *An. gambiae* s.s. extremely rare. Furthermore, no *An. gambiae* s.s. swarms were detected despite the fact that the distribution of swarms in VK7 has been extensively studied in the past decade by highly skilled swarm observers [37, 46]. Here, the few *An. gambiae* s.s. adults captured in VK7 were 'lost' in heterospecific swarms suggesting that they may have been unable to find conspecific mates in a habitat saturated by *An. coluzzii* swarms. The asymmetry in dominance was less pronounced in Soumoussou, where no mixed swarms were detected despite the fact that rare mixed swarms were

Table 3 Logistic regression of the effects of location (VK7 and Soumoussou), sibling species, and life stage on hybridization rates between *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s.

Source	Nparm	DF	F	P-value
Location	1	1	9.04	0.0026
Species	1	1	16.94	<0.001
Life stage	2	2	10.78	0.005
Species*Location	1	1	27.46	<0.001

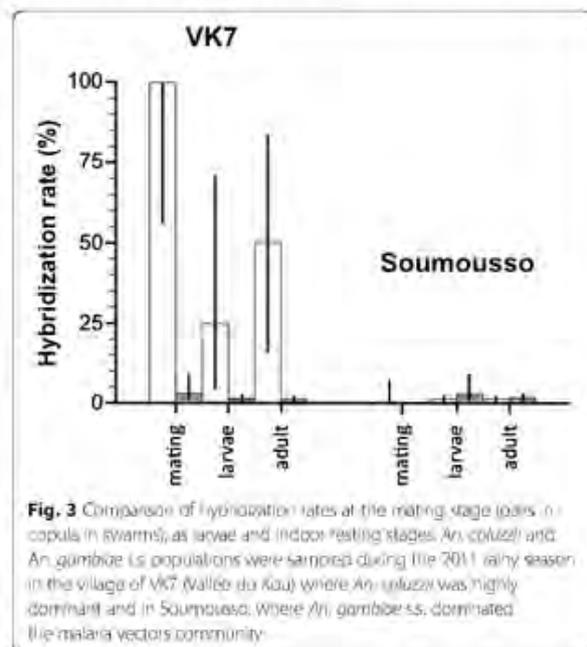


Fig. 3 Comparison of hybridization rates at the mating stage (pairs in copula in swarms), as larvae and indoor resting stages. *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. populations were sampled during the 2011 rainy season in the village of VK7 (Vallée du Kou) where *An. coluzzii* was highly dominant and in Soumoussou, where *An. gambiae* s.s. dominated the malaria vectors community

sometimes detected in previous years in that locality [13, 37, 38]. Finally in Bana, where the sibling species were found to co-exist in comparable frequencies no mixed swarms were detected either.

Crucially, the presence of rare *An. gambiae* s.s. individuals in *An. coluzzii* swarms resulted in mixed-species pairs in copula and cross-insemination as described in a previous field study in Mali [10]. At present, we do not know why cross-insemination was not confirmed in interspecific pairs captured in copula at the same Burkinabe locations in a previous study [38]. However, the technique used here allowed for re-running the PCR diagnostic several times. In addition, contamination of sperm bundles or PCR reactions by rare heterospecific DNA is less likely than contamination from maternal DNA [44], giving us confidence in the results.

Interestingly, 4 out of 5 interspecific mating involved *An. gambiae* s.s. females. This data therefore adds support to previous observations from sperm analyses [10] and inferences made from genetic analyses of adult male hybrid specimens [5], suggesting that *An. gambiae* s.s. females are more likely to cross-mate than *An. coluzzii* ones. However, because all the data suggesting higher permissiveness in *An. gambiae* s.s. females comes from rice-field areas and/or seasonal populations in which *An. gambiae* s.s. is more likely to be the rare species, understanding whether intrinsic behavioural differences between species could contribute to asymmetrical permissiveness is currently not possible.

Despite the small sample sizes, the data reported in this study suggest that females are more likely to successfully mate than males when conspecific mates are unavailable, reinforcing the idea that females drive sexual selection in anopheline swarms [8]. It is noteworthy that the adaptive value of this best-of-a-bad-job cross-mating strategy depends on the fitness costs associated with hybridization, which are thought to occur in the form of selection against F_1 and F_{1+n} progeny resulting from these cross-inseminations. The possibility that cross-mating events occur simply as maladaptive errors, resulting in no fitness benefits, goes against increasing evidence that F_1 and F_{1+n} individuals can be found in many populations provided adequate sampling and genotyping efforts are made [5].

Assortative mating and extrinsic barriers to reproduction in the form of selection against hybrids between *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. are key to a process of incipient speciation that most assume will eventually result in intrinsic post-mating reproduction similar to those observed amongst the more diverged sibling species of the complex [6, 47, 48]. Albeit there is evidence of divergent ecological adaptations in larval habitat preferences [11, 49, 50], predation avoidance [25, 51], and adult aestivation strategy [28], decreased hybrid fitness has currently only been inferred

indirectly from population genomic data [5, 19, 24, 32]. Here through extensive sampling, we show a strong correlation between hybridization rates inferred from cross-insemination rates at the mating stage and those estimated from collections of female larvae and indoor resting females performed in the same villages and spanning the same time period. Hybridization rates, strongly depended on the location considered, being very high in *An. gambiae* s.s. in VK7 where *An. coluzzii* was extremely dominant, but much lower in Soumousso where *An. gambiae* dominated. Contrary to the conclusions of a previous study [38], these data suggest that cross-mating does translate into hybrid progeny thereby creating opportunities for effective introgression between the sibling species. Hybridization rates were higher for *An. gambiae* s.s. than in *An. coluzzii* in VK7 due to its rarity, but not across both habitats. Crucially, hybridization rates significantly decreased from the mating stage to the larval stage, but not from the larval to adult stages.

This was true for both species suggesting that selection against hybridization could occur perhaps via remating behaviour as suggested by patterns of cross and multiple inseminations in a previous study [52], and/or at the egg or young larval stage as suggested by evidence of divergent adaptation at the larval stage (see above).

Conclusion

At present we do not know whether flares of hybridization, comparable to the one described here for VK7 in 2011, do take place every year in similar habitats. Previous studies at this location have repeatedly reported mixed swarms at low frequencies, suggesting that hybridization could be more common than previously thought [37, 38]. It is noteworthy that the design of the study did not allow for the detection of selection against males nor of other possible sources of selection against hybrids acting later in their life time, such as the adult mating stage or during aestivation, that could further reduce introgression. However, short of tracking the survival of individual F_1 and F_{1+n} hybrids in the field directly, this data provides the first evidence for selection against hybrids based on field collections at different life-stages, thus supporting the idea that it plays an important role in enabling genetic divergence of the sibling species despite residual gene flow.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AN & AD planned the experiments. AN, PSE, SPS & HM conducted the experiments. AN & FT analyzed the data. AN & FT wrote the manuscript with inputs from AD, UK and RKD. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded by a joint UK Medical Research Council (MRC) and the UK Department for International Development (DFID) Africa Research Leaders

grant to AD and FT (#97014). We are grateful to the communities of Soumouso, VK7 and Bana, who have been very helpful in allowing for regular collections of mosquitoes in their villages. We also thank the many colleagues who have generously contributed ideas suggestions for this work, with a special thank to Nahia Alhfez for her help with sperm DNA extractions. We thank the research team working on the Vector-Based Control of Transmission Discovery Research (VCTR) program grant funded through the Foundation of the National Institutes of Health (FNIH) and Grand Challenges in Global Health initiative whose cooperation made the mosquito collections in Bana possible.

Author details

¹Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. ²Centre for Applied Entomology and Parasitology, School of Life Sciences, Keele University, Staffordshire, UK. ³Laboratoire d'Écologie Vectorielle et Parasitaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal.

Received: 8 September 2015 Accepted: 31 October 2015

Published online: 11 November 2015

References

- White BJ, Collins FH, Besansky NJ. Evolution of *Anopheles gambiae* in relation to humans and malaria. *Annu Rev Ecol Syst*. 2011;42:111–32.
- Lanzaro GC, Lee Y. Speciation in *Anopheles gambiae* — The distribution of genetic polymorphism and patterns of reproductive isolation among natural populations. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. InTech; 2013. DOI: 10.5772/56232
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*. 2013;3619:246–74.
- Della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, et al. Speciation within *Anopheles gambiae* - the glass is half full. *Science*. 2002;298:115–7.
- Lee Y, Marsden CD, Norris LC, Collier TC, Main BJ, Fofana A, et al. Spatiotemporal dynamics of gene flow and hybrid fitness between the M and S forms of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:19854–9.
- Aboagye-Antwi F, Alhfez N, Weedall GD, Brothwood J, Kandola S, Paton D, et al. Experimental swap of *Anopheles gambiae*'s assortative mating preferences demonstrates key role of X-chromosome divergence island in incipient sympatric speciation. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005141.
- Lanzaro GC, Tripet F. Gene flow among populations of *Anopheles gambiae*: A critical review. In: Takken W, Scott TW, editors. *Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes*. Dordrecht: Kluwer Academic Press; 2003. p. 109–32.
- Diabate A, Tripet F. Targeting male mosquito mating behaviour for malaria control. *Parasites Vectors*. 2015;8:347.
- Diabate A, Dabire RK, Millogo N, Lehmann T. Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2007;44:60–4.
- Tripet F, Toure YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G, Lanzaro GC. DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol*. 2001;10:1725–32.
- Lehmann T, Diabate A. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: A phenotypic perspective. *Infect Genet Evol*. 2008;8:737–46.
- Marchand RP. Field observations on swarming and mating in *Anopheles gambiae* mosquitoes in Tanzania. *Neth J Zool*. 1984;34:367–87.
- Diabate A, Dabire RK, Kengne P, Brengues C, Baldet T, Ouari A, et al. Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol*. 2006;43:480–3.
- Diabate A, Dao A, Yaro AS, Adamou A, Gonzalez R, Manoukis NC, et al. Spatial swam segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proc Biol Sci*. 2009;276:4215–22.
- Pennerier C, Warren B, Dabire RK, Russell JJ, Gibson G. "Singing on the Wing" as a mechanism for species recognition in the malarial mosquito *Anopheles gambiae*. *Curr Biol*. 2010;20:131–6.
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde RT, Brengues C, Guillet P, et al. First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parasitologia*. 2002;44:157–8.
- Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire RK, Hougang JM, Akogbeto M, et al. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health*. 2004;9:1267–73.
- Dabire RK, Diabate A, Narnountougou M, Toe KH, Ouari A, Kengne P, et al. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:1113–20.
- Norris LC, Main BJ, Lee Y, Collier TC, Fofana A, Cornel AJ, et al. Adaptive introgression in an African malaria mosquito coincident with the increased usage of insecticide-treated bed nets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:815–20.
- Caputo B, Nwakanma D, Jawara M, Adiamoh M, Dia I, Konate I, et al. *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* ss. *Malar J*. 2008;7:182.
- Oliveira E, Salgueiro P, Palsson K, Vicente JL, Arez AP, Jaenson TG, et al. High Levels of hybridization between molecular forms of *Anopheles gambiae* from Guinea Bissau. *J Med Entomol*. 2008;45:1057–63.
- Caputo B, Santolamazza F, Vicente JL, Nwakanma DC, Jawara M, Palsson K, et al. The "Far-West" of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Plos One*. 2011;6:e16415.
- Marsden CD, Lee Y, Nieman CC, Sanford MR, Dinis J, Martins C, et al. Asymmetric introgression between the M and S forms of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, maintains divergence despite extensive hybridization. *Mol Ecol*. 2011;20:4983–94.
- Weetman D, Wilding CS, Steen K, Pinto J, Donnelly MJ. Gene flow-dependent genomic divergence between *Anopheles gambiae* M and S forms. *Mol Biol Evol*. 2012;29:279–91.
- Diabate A, Dabire R, Heidenberger K, Crawford J, Lamp W, Culler L, et al. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evol Biol*. 2008;8:5.
- Girmonneau G, Pombi M, Dabire RK, Diabate A, Morand S, Simard F. Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasites Vectors*. 2012;5:65.
- Girmonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabire RK, Simard F. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol*. 2012;26:9–17.
- Dao A, Yaro AS, Diallo M, Timbiné S, Huestis DL, Kassogue Y, et al. Signatures of aestivation and migration in Sahelian malaria mosquito populations. *Nature*. 2014;516:387–90.
- Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol*. 2005;3:1572–8.
- White BJ, Cheng CD, Simard F, Costantini C, Besansky NJ. Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol*. 2010;19:925–39.
- Reidenbach KR, Neafsey DE, Costantini C, Sagnon N, Simard F, Ragland GJ, et al. Patterns of genomic differentiation between ecologically differentiated M and S forms of *Anopheles gambiae* in West and Central Africa. *Genome Biol Evol*. 2012;4:1202–12.
- Clarkson CS, Weetman D, Essandoh J, Yawson AE, Maslen G, Manske M, et al. Adaptive introgression between *Anopheles* sibling species eliminates a major genomic island but not reproductive isolation. *Nat Commun*. 2014;5:4248.
- Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare SF, et al. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parasitologia*. 1998;40:477–511.
- Yaro AS, Traore AI, Huestis DL, Adamou A, Timbine S, Kassogue Y, et al. Dry season reproductive depression of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *J Insect Physiol*. 2012;58:1050–9.
- Adamou A, Dao A, Timbine S, Kassogue Y, Yaro AS, Diallo M, et al. The contribution of aestivating mosquitoes to the persistence of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *Malaria J*. 2011;10:151.
- Diabate A, Yaro AS, Dao A, Diallo M, Huestis DL, Lehmann T. Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evol Biol*. 2011;11:184.
- Sawadogo PS, Narnountougou M, Toe KH, Rouamba J, Maiga H, Ouedraogo KR, et al. Swarming behaviour in natural populations of *Anopheles gambiae* and *An. coluzzii*: Review of 4 years survey in rural areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop*. 2014;132:542–52.

38. Dabire KR, Sawadogo S, Diabate A, Toe KH, Kengne F, Ouati A, et al. Assortative mating in mixed swarms of the mosquito *Anopheles gambiae* s.s. M and S molecular forms, in Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol*. 2013;27:298–312.
39. Ng'habi K, Horton A, Knols BGJ, Lanzaro GC. A new robust diagnostic polymerase chain reaction for determining the mating status of female *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:485–7.
40. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi YM, Tu ZJ, Della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria J*. 2008;7:163.
41. Sawadogo SP, Diabate A, Toe HK, Sanon A, Lefevre T, Baldet T, et al. Effects of age and size on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *J Med Entomol*. 2013;50:285–93.
42. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. South African Institute Med Res. 1968;54:1–343.
43. 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.
44. Tripet F, Thiemann T, Lanzaro GC. Effect of seminal fluids in mating between M and S forms of *Anopheles gambiae*. *J Med Entomol*. 2005;42:596–603.
45. Sokal R, Rohlf F. *Biometry F. the principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H. Freeman and company; 1995.
46. Diabate A, Baldet T, Brengues C, Kengne F, Dabire KR, Simard F, et al. Natural swarming behavior of the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:713–6.
47. Fontaine MC, Pease JB, Steele A, Waterhouse RM, Neafsey DE, Sharakhov IV, et al. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science*. 2015;347:1258524.
48. Neafsey DE, Waterhouse RM, Abai MR, Aganezov SS, Alekseyev MA, Allen JE, et al. Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. *Science*. 2015;347:1258522.
49. Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouana J, Ose K, et al. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol*. 2009;9:17.
50. Kamdem C, Fossog BT, Simard F, Etouana J, Ndo C, Kengne F, et al. Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One*. 2012;7:e39453.
51. Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A, Simard F. A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol*. 2010;21:1067–92.
52. Tripet F, Toure YT, Dolo G, Lanzaro GC. Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* females revealed by DNA analysis of transferred sperm. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:1–5.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Assessment of the ecologically-dependent post-zygotic isolation between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*

Niang Abdoulaye^{1,4}, Nignan Charles¹, Maïga Hamidou¹, Sawadogo Simon P¹, Tovi Lehmann², Konaté Lassana³, Faye Ousmane³, Dabiré K Roch¹, Tripet Frederic⁴ and Diabaté Abdoulaye¹

¹ Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

² Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, USA

³ Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

⁴ Centre for Applied Entomology and Parasitology, School of Life Sciences, Keele University, Staffordshire, United Kingdom

Abstract:

Populations in different environments or exploiting different resources experience contrasting natural selection pressures on traits that bring about the evolution of reproductive isolation. The environmental factors driving this selection are numerous and various, and identifying them is a prerequisite toward a better understanding of natural selection process. Within the *Anopheles gambiae* complex, the sibling species *An. coluzzii* and *An. gambiae* are undergoing sympatric speciation. These two species are characterized by a rarity of hybrids in most of their range distribution. Assortative mating mediated by spatial swarm segregation has been shown but no intrinsic post-zygotic barriers have been found in laboratory conditions. To elucidate the cause of hybrid rarity transplant experiment are therefore needed to establish the significance of post-zygotic barriers in nature. Ecologically-dependent post-zygotic isolation arises when hybrid fitness is reduced because of an ecological mismatch between hybrid phenotypes and their parent environments. Previous studies indicated that predation is one of the major forces driving ecological divergence between *An. gambiae* and *An. coluzzii*. Here we extended this study to their hybrids. Parental species and their reciprocal hybrids were generated by forced mating technique as follow: Female *An. coluzzii* X Male *An. coluzzii*; Female *An. coluzzii* X Male *An. gambiae*; Female *An. gambiae* X Male *An. coluzzii* and Female *An. gambiae* X Male *An. gambiae*. First instar larvae of each group from the crossing (here after *An. coluzzii*, Hybrid col/gam, Hybrid gam/col and *An. gambiae*, respectively) were transplanted in a field experiment with predation effect. Developmental success, larval development time and wing size of the newly emerging adults were measured as fitness components and then compared between parental species and hybrids in absence and in presence of predators. Our findings confirm that *An. coluzzii* was more efficient than *An. gambiae* in presence of predators versus in absence of predators. The hybrid col/gam looked more like to *An. coluzzii* while the hybrid gam/col looked more like to *An. gambiae*, suggesting undoubtedly a maternal effect.

Keywords: Ecologically-dependent, post-zygotic, reproductive isolation, *An.coluzzii*, *An. gambiae*

Background:

Speciation involves the evolution of barriers to genes exchange between diverging populations. Understanding speciation thus implies two major tasks: determining which reproductive barriers are involved in the reduction in gene flow between populations, and understanding which evolutionary forces produce them. Natural selection is known to be one of the most important biological processes in the formation of new species. Natural selection acts on individuals to let only the mostly fit offspring survive and reproduce to their full potential. Disruptive selection is a specific type of natural selection that actively selects against the intermediate phenotypes within populations when heterozygotes have a lower mean fitness than either homozygote (Gavrilets, 2006, Wilson & Turelli, 1986) and lead to sympatric speciation. Several ecological studies of speciation evidenced that divergent selection can then maintain incomplete ecologically-dependent reproductive isolation (Rice & Hostert, 1993; Schluter, 2001; Via, 2001; Rundle & Nosil, 2005). Divergent species thought to have resulted from this process are reproductively isolated primarily by habitat choice, mate choice or extrinsic selection against hybrids (Schluter, 2001; Via, 2001), although post-zygotic genetic incompatibilities can be found in some cases (Ramsey *et al.*, 2003). Indeed, populations in different environments, or exploiting different resources, experience contrasting natural selection pressures on traits that directly or indirectly brings about the evolution of reproductive isolation (Schluter, 2000). Selection against hybrids as ecologically-dependent post-zygotic reproductive isolation occurs when intermediate phenotypes are less efficient at exploiting the dominant parental environment and an intermediate environment is lacking (Coyne & Orr 2004). As a result, the hybrids which suffer reduced fitness would not well adapt to either parental environment fall between niches and thus would wipe out by selection. During the early phase of sympatric divergence, species may have been incomplete reproductively isolated populations, suggesting that ecotypes are excellent models for studying ecological speciation.

Within the *Anopheles gambiae* complex responsible for the vast majority of malaria transmission in sub-Saharan Africa (White *et al.*, 2011; Lanzaro & Lee, 2013), two sibling species *Anopheles coluzzii* and *gambiae*, formerly known as M and S molecular forms, respectively (Coetzee *et al.*, 2013) are thought to be undergoing a process of speciation with gene flow (White *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Aboagye-Antwi *et al.*, 2015). They are characterized by an extreme rarity of their hybrids in most of their range (Tripet *et al.*, 2001; della Torre *et al.*, 2005). Understanding the mechanisms of their pre-mating and post-zygotic

reproductive isolation has important implications for vector control (Lanzaro & Tripet, 2003; Diabaté & Tripet, 2015). Assortative mating mediated by spatial swarm segregation between *An. coluzzii* and *An. gambiae* has been widely described as pre-mating isolation barriers (Diabaté *et al.*, 2009; 2011; Dabiré *et al.*, 2013; Sawadogo *et al.*, 2013; 2014; Niang *et al.*, submitted). While no intrinsic post-zygotic barriers have been found in laboratory conditions (Diabaté *et al.*, 2007), studies have supported that *An. coluzzii* and *An. gambiae* larvae are different in their ability to exploit larval habitats (Diabaté *et al.*, 2005, 2008). *An. coluzzii* is better adapted to more permanent larval habitats mainly resulting from human activities, whereas *An. gambiae* grows up in temporary larval habitats mostly rainy-dependent (Lehmann & Diabaté, 2008; Diabaté *et al.*, 2008; Simard *et al.*, 2009; Gimonneau *et al.*, 2012). These different cues are associated to different composition and abundance of mosquito predators (Diabaté *et al.*, 2008), which are believed to drive divergent selection response of natural populations of the two sibling species, leading to their ecological segregation (Diabaté *et al.*, 2008; Gimonneau *et al.*, 2010; 2012; Roux *et al.*, 2013). Then, studies have well established ecological niche partitioning of *An. coluzzii* and *An. gambiae* (Simard *et al.*, 2009; Costantini *et al.*, 2009; Kamdem *et al.*, 2012). Unfortunately, until now, the information about how the parental environments of the two species affect directly the survival or the fitness of the hybrids in the wild is lacking. Moreover, an unexpected high rate of hybridization is observed along the Western coast of Africa (Caputo *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008, Nwakanma *et al.*, 2013) suggesting either a different mating behavior or a loose selection pressure on hybrids in this part of Africa. Recent studies have also demonstrated asymmetric introgression (Marsden *et al.*, 2011) by-product of hybridization promoted by asymmetric over-dominance in seasonal populations of the two sibling species (Niang *et al.*, 2015). So far most of the genomic data cumulated today suggest that hybrids are selected against in most of the range distribution of the two species (White *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Niang *et al.*, 2015), but no empirical study has specifically looked at it. To elucidate the cause of hybrid rarity transplant experiments are therefore needed to complement laboratory-based data to establish the significance of ecologically-dependent post-zygotic barriers between *An. coluzzii* and *An. gambiae*.

In the present study we tested a prediction of the ecological outcome concerning the survival and the fitness of hybrids between *An. coluzzii* and *An. gambiae* as part of the extrinsic post-zygotic isolating mechanisms. By means of transplant experiment, we examined the growth potential of the parental species *An. coluzzii* and *An. gambiae* comparing to their reciprocal

hybrids. The either hybrids are so-called here col/gam or gam/col according to they being of the cross mating of *An. coluzzii* females by *An. gambiae* males or *An. gambiae* females by *An. coluzzii* males, respectively. Because of anopheles body size is highly sensitive to environmental conditions during larval development (Aboagye-Antwi & Tripet, 2010; Manoukis *et al.*, 2006), biotic processes affecting larvae are directly correlated to the final adult size (Lyimo *et al.*, 1992) and there is a direct relationship between body size and wing size (Briegel, 1990) the measurement of the latter was also performed and compared between the parental species and the hybrids as an index of body size which thought to be a primary component of fitness. Our results are of significant importance and lead to better understanding of the ongoing ecological speciation in this major malaria vector.

Material and methods

Mosquito collection and laboratory rearing

Indoor resting half gravid and gravid females belonging to *Anopheles* genus were collected using mouth aspirators during the rainy season from July to September 2012 in VK5 (4° 25' 00''W, 11° 24' N) and Soumousso (4° 02'45'' W; 11° 00' 46'' N), in western Burkina Faso. Mosquitoes were transported to the insectary at the "Institut de Recherche en Sciences de la Santé" (IRSS) in Bobo-Dioulasso, maintained under standard insectary conditions (28 ± 1°C, 80 ± 10% RH and 12-12 L:D). Thereafter, they were provided with 5% glucose solution for two nights. On the third day after collection, each female was placed in individual cup for egg-laying. The females that laid eggs were killed and placed individually in tubes for identification using the morphological key described by Gillies & De Meillon (1968) and the Polymerase Chain Reaction (PCR) technics (Santolamazza *et al.*, 2008). Newly hatched larvae were first pooled accordingly to their mothers are identified as *An. coluzzii* or *An. gambiae* before reared in similar conditions. Pupae were removed, sexed and placed in sex-specific adult cages. Emergent adults were kept for three days with 5% glucose solution.

Forced mating procedure:

Females were blood fed on a rabbit and force mated on the fourth day. Females were briefly anesthetized with ether and laid on white filter paper, ventral side up. Males were fixed on insect pins by the thorax. The legs and heads of males were removed before they were presented to the females. Males were stimulated by gentle stroking of the genitalia with the female genitalia to induce copulation. Copulated females were kept for two days with 5%

glucose solution and blood fed again on rabbit. Thereafter, they were placed in individual cups for oviposition. To generate parental species and their reciprocal hybrids forced mating was done as follow: Female *An. coluzzii* X Male *An. coluzzii*; Female *An. coluzzii* X Male *An. gambiae*; Female *An. gambiae* X Male *An. coluzzii* and Female *An. gambiae* X Male *An. gambiae*. The progeny from the cross mating are called hereafter *An. coluzzii*, Hybrid col/gam, Hybrid gam/col and *An. gambiae*, respectively.

Transplant experiment

Parental species *An. coluzzii* and *An. gambiae* and, their reciprocal hybrids col/gam and gam/col were transplanted in permanent larvae habitats of rice fields with or without predation effect. First-instar larvae (L1) were randomly chosen on the day of hatch and used for establishing experimental cohorts of 150 larvae each. On one side fifty larvae from each of the three lineages *An. coluzzii*, Hybrid col/gam and *An. gambiae* were pooled and the other side the same number of larvae from each of the three flowing lineages *An. coluzzii*, Hybrid gam/col and *An. gambiae* were also pooled for the assessment of the density dependent selection that could be varied according to the type of hybrids. Due that to variation in predation effect can drive population differentiation in traits that confer survival advantages, both cohorts of larvae were reared in the absence and presence of two individuals of back-swimming (*Notonecta* sp.). This species is one of the most common predators of anophele larvae widely spread throughout the rice field area for estimating the predation effect. Emerging adults from each cage were collected daily counted and placed in tubes contained 70% alcohol for identifying them by PCR diagnostic and measuring wing size. Wing size of newly emergent adults was measured in length and in width as described by [Sandford *et al.* \(2011\)](#), including a randomly number of mosquitoes for which both wings are intact. DNA extraction from a single leg was used for identifying females into species level by PCR ([Santolamazza *et al.*, 2008](#)). Because hybrid males have single copy of the hemizygous X chromosome, they cannot be identified using classic molecular diagnostics based on polymorphisms in the rDNA region on that chromosome. Consequently, only the females were used for analysis.

Result

Overall emerging rate:

A total of 5,400 first instar larvae were transplanted in 36 cages in rice field with or without predators. The larvae were composed of *An. gambiae*, *An. coluzzii* and their reciprocal hybrids and we evaluated their performances measured as adult emergence success, their developmental time and wing size. Overall 1,987 specimens were collected (36.8%) and a significant difference in the sex ratio was found, males 908 (45.7%) and females 1079 (54.3%) ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 23.01$). Rather than being a difference in the developmental success of males and females, this difference probably reflects the sex ratio of the larvae that were introduced in the transplantation cages at the beginning of the experiment. Species identification was successfully performed on 1070 female specimens as nine individuals failed to amplify.

Comparative developmental success:

Overall the developmental success is 2,5 fold higher in predator present cages than in predator free cages (Figure 1a) and the parental species developed 2 time better in predator absence than in predator presence. Similarly the hybrids developmental success is 1.5 time higher in predator free cages (Figure 1b). The comparative developmental success of the different species and their reciprocal hybrids is shown in the contingency tables (Table 1). In the first series of data *An. gambiae* performed better than *An. coluzzii* and the hybrid col/gam in absence of predators, but both outcompeted the former one in presence of predator (Table 1a $\chi^2 = 12.8$; $P = 0.0003$, Table 1c $\chi^2 = 12.2$; $P = 0.0005$). No significant difference in the developmental success of *An. coluzzii* and that of the hybrid col/gam was found. They performed equally well in absence or presence of predators (Table 1b $\chi^2 = 0.005$; $P = 0.94$) suggesting that hybrid whose mothers are of *An. coluzzii* survived better the predator attacks. In the second series of data, *An. gambiae* and the hybrid gam/col exhibited a higher developmental success than *An. coluzzii* in absence of predators, but in presence of predators they were both poor competitors (Table 1d $\chi^2 = 6.5$; $P = 0.01$, Table 1e $\chi^2 = 15$; $P = 0.0001$). No significant difference was found between *An. gambiae* and the hybrid gam/col once again suggesting a maternal effect (Table 1f $\chi^2 = 2.44$; $P = 0.11$). Consistent with the contingency table analyses, a logistic regression analysis showed that predation has a significant impact on the developmental success of the different species ($t = -4.76$, $P < 0.00005$).

Developmental time:

The developmental time of both females and males in predator present cages was significantly shorter than that of predator free cages probably reflecting a loose competition for food and space due to predation in the former cages ($P < 0.0001$, $t = 10.83$; $P < 0.0001$, $t = 9.35$ respectively Figure 2). Due to the fact that predation did not affect equally the different species and their reciprocal hybrids, predator present cages were dropped in the subsequent developmental time analysis. Overall males developed faster than females ($P = 0.0001$, $t = 3.88$ Figure 2). The specific comparison of the developmental time between parental species and the reciprocal hybrids could be done only on females as male hybrids could not be accurately genotyped. Overall the developmental time spread from 6 to 14 days across species with a mean developmental time of 7 days (Figure 3). Multiple comparisons using the honest Tukey's significant difference is shown in Figure 3. Comparisons having intervals that do not overlap the vertical dashed line are significantly different. The vertical dashed line indicates no difference between the mean values for the species-level comparisons indicated on the y axis. Thus, we can say that *An. gambiae* has a significantly shorter developmental time than both *An. coluzzii* and the different hybrids. No difference was found between *An. coluzzii* and the hybrids (Figure 3).

Wing size measurement:

Variations in wing size between *An. coluzzii*, *An. gambiae* parental species and their reciprocal hybrids col/gam and gam/col were estimated using length and width measurement of the right wing. Though no significant difference could be found between predator free cages and predator present cages nor in the wing length ($P = 0.262$, $t = 0.63$, $df = 133$) or in the wing size ($P = 0.225$, $t = 1.21$, $df = 133$ Figure 4), we dropped predator present cages in the subsequent analysis to be consistent with the developmental success analysis. Analysis of variance of the wing size did not show any significant difference nor in the wing length ($P = 0.104$, $F = 2.12$) nor in the wing width ($P = 0.252$, $F = 1.39$) between the parental species and their reciprocal hybrids (Figure 5).

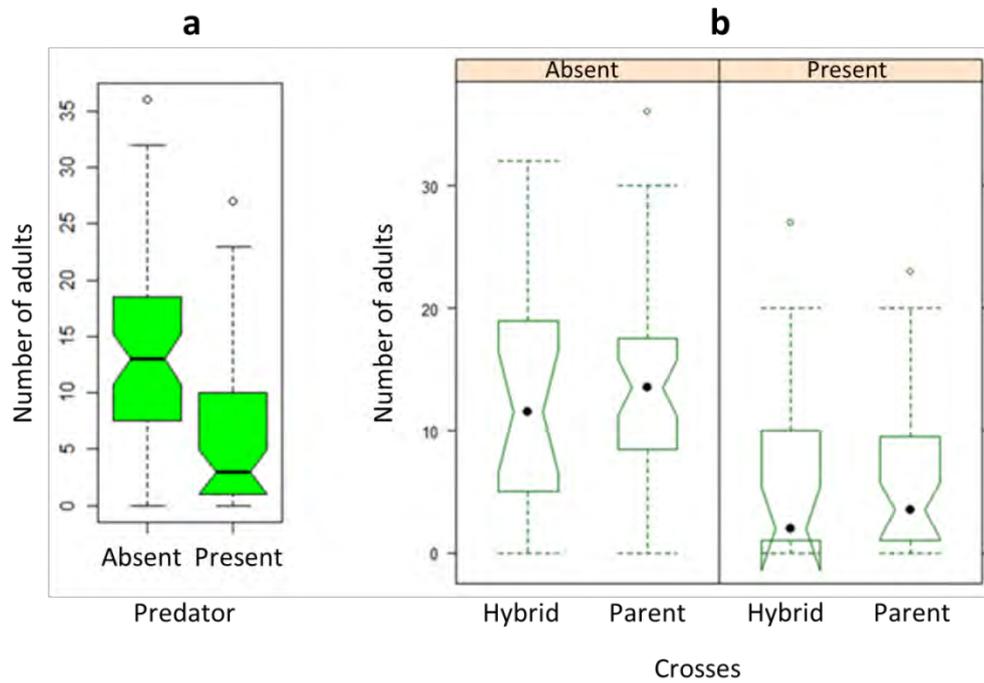


Figure 1: Number of emerging adults: (a) Comparison of emergence rates of adults in presence and absence of predators. (b) Comparison of emergence rates in females of parental species and reciprocal hybrids

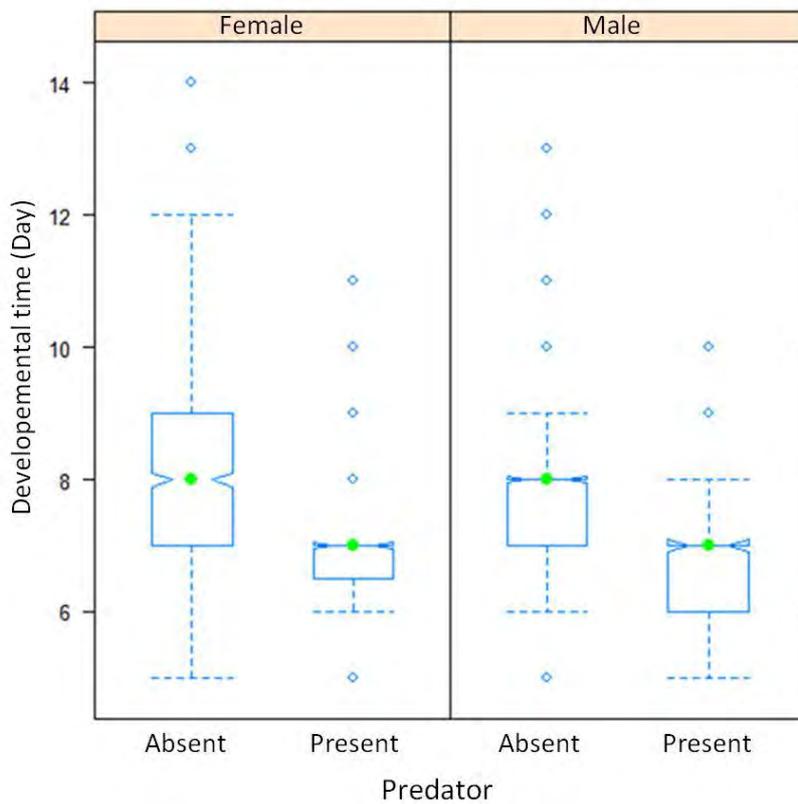


Figure 2: Comparison of the developmental time of males and females in presence and in absence of predators

Table 1 : Comparative contingency table in developmental success of *An. coluzzii*, *An. gambiae* and their reciprocal hybrids in absence and in presence of predators

Tableau 1a			Tableau 1b			Tableau 1c		
	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>		<i>An. coluzzii</i>	Hybrid col/gam		<i>An. gambiae</i>	Hybride col/gam
Absent	30.1	40.2	Absent	30.1	29.6	Absent	40.2	29.6
Present	39.4	22.5	Present	39.4	38.1	Present	22.5	38.1
$\chi^2=12.8 ; P=0.0003$			$\chi^2=0.005 ; P=0.94$			$\chi^2=12.2 ; P=0.0005$		
Tableau 1d			Tableau 1e			Tableau 1f		
	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>		<i>An. coluzzii</i>	Hybrid gam/col		<i>An. gambiae</i>	Hybride gam/col
Absent	24.3	39.7	Absent	24.3	35.9	Absent	39.7	35.9
Present	40.1	36.9	Present	40.1	22.9	Present	36.9	22.9
$\chi^2=6.5 ; P=0.01$			$\chi^2=15 ; P=0.0001$			$\chi^2=2.44 ; P=0.11$		

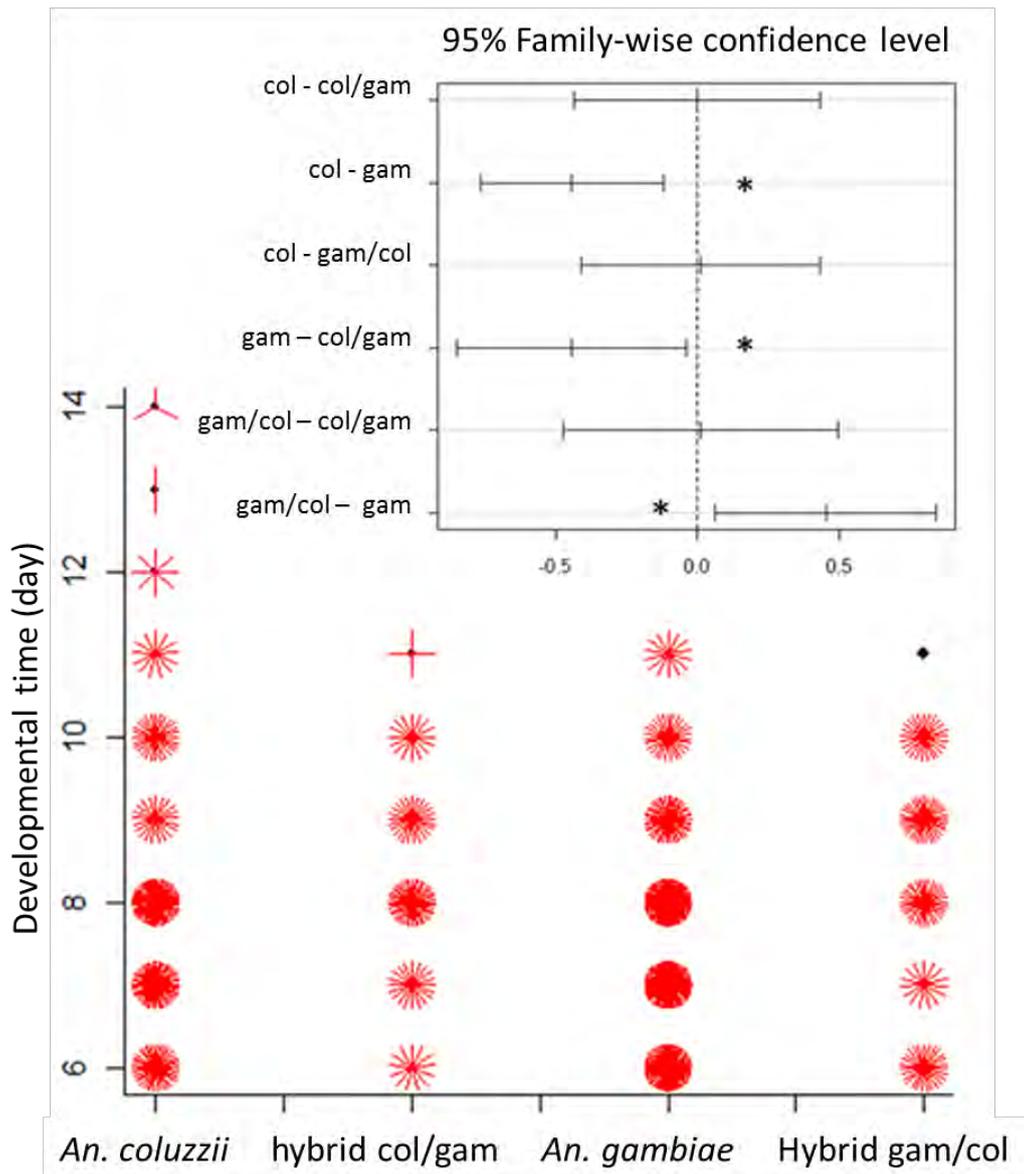


Figure 3: Developmental time of the parental species and their reciprocal hybrids

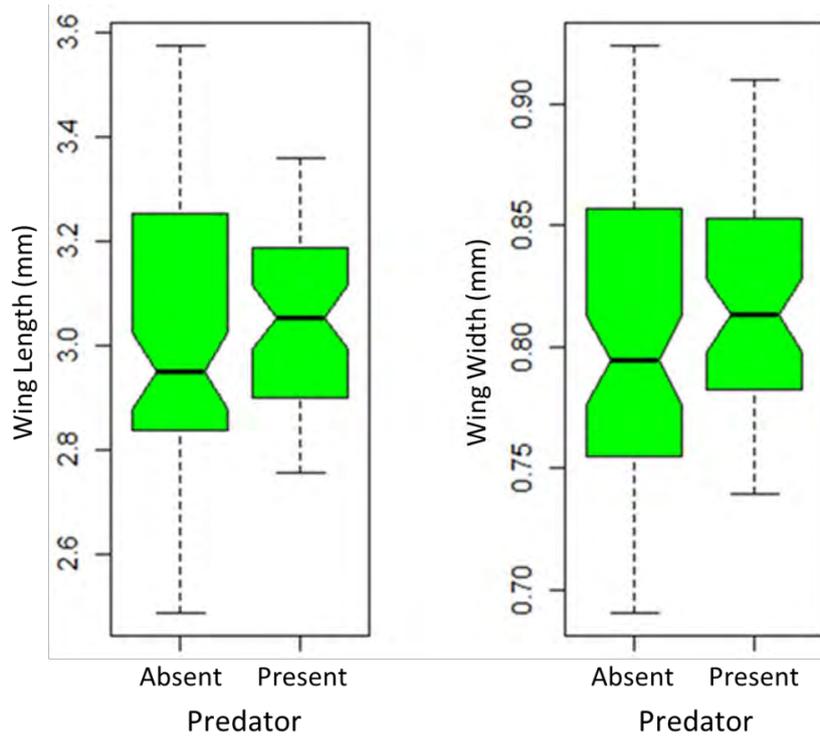


Figure 4: Wing size of the emerging adults in presence and in absence of predators

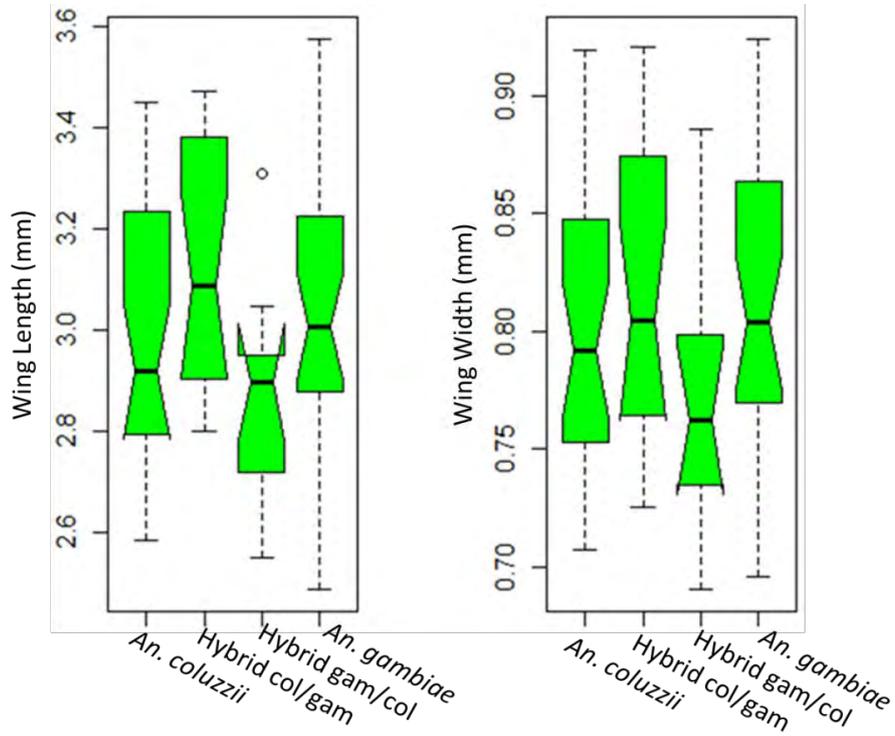


Figure 5: Wing size of the parental species and their reciprocal hybrids

Discussion:

Under the hypothesis of ecological speciation, reproductive isolation arises as a consequence of divergent natural selection between environments (Schluter, 1996; 2000). Here we have focused on the ecologically-dependent post-zygotic isolation, one of the predictions of the ecological speciation between *An. coluzzii* and *An. gambiae*, a young sympatric species pair within the *An. gambiae* complex. In previous empirical studies Diabate *et al.* (2005; 2008) have investigated specific adaptive differences between the sibling species. They evidenced the role of larval predators in mediating divergent selection and explained the shape habitat segregation exhibited by the two species with respect to their environments. Indeed they found significant difference in the ability of the species to exploit the different larval sites conditioned by the presence of predators. In absence of predation, the sibling species were outcompeted each other in their natural habitats. However, the developmental success of *An. coluzzii* was higher than that of *An. gambiae* in both habitats under predator pressure, suggesting that predation shapes the pattern of habitat segregation exhibited by the species. *An. gambiae* outcompeting *An. coluzzii* in temporary low predation larval sites, while *An. coluzzii* being better in permanent larval sites with high predation. The implications of these results extend beyond the environmental segregation between the two sibling species into the processes involved in their divergence. This study emphasized the role of larval predation (Diabaté *et al.*, 2008) as one of the mechanisms contributing to their ecological divergence as reported in several studies (Simard *et al.*, 2009; Gimonneau *et al.*, 2010; 2012a; 2012b; Roux *et al.*, 2013).

The prediction that ecological differences might result in reduced fitness in hybrids of *An. coluzzii* and *An. gambiae* is currently supported by population genomic data (White *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013) rather than from direct field experimental evidence. Because of the selection pressures against hybrid in the wild (Niang *et al.*, 2015) may be responsible for the divergence of the species themselves studies have stressed the need to evaluate the influence of larval predation on hybrids in their parental environment. Here we extended the study of *An. coluzzii* and *An. gambiae* larval transplantation (Diabaté *et al.*, 2005; 2008) to their reciprocal hybrids col/gam and gam/col in presence or in absence of predation. L1 larval stages of the four groups generated by forced mating technic were then randomly transplanted in rice field area. In order, we examine the potential developmental success between larval sub-populations in absence and in presence of predators to detect the likelihood interactions of parental species and their reciprocal hybrids for surviving and growing up. Our results

showed a highly significant predation effect on the proportion of emerging adults and are consistent with the previous studies which revealed that *An. coluzzii* was more efficient than *An. gambiae* in presence of predators (Diabaté *et al.*, 2008) probably due to its better behavioral predation avoidance (Gimonneau *et al.*, 2010). Interestingly, in terms of survival and developmental success the hybrid col/gam looked more like to *An. coluzzii* while the hybrid gam/col looked more like to *An. gambiae*, suggesting undoubtedly the potential for maternal effects to provide a larval anti-predation response. Although no statistical difference was found between groups in adult wing size, the development time varied significantly. As a result, the two hybrids col/gam and gam/col seem to take advantage to their maternal parent for survival in predation pressure.

Maternal effects occur when the phenotype of the mothers or the environment they experience influences the phenotype of their offspring over the direct effect of transmitted genes. Maternal effects have been studied widely by evolutionary ecologists who recognize them as one of the most important influences on offspring phenotype (Bernardo, 1996a, Mousseau & Fox 1998; Wade, 1998). A number of studies have shown that mothers can match the phenotype of their offspring to changes in the local environment and that maternal effects can be an effective means of buffering offspring from environmental stressors (Mousseau & Dingle, 1991; Galloway 1995). The evolutionary role of maternal effects has been shown in a range of traits in a variety of animal and plant taxa. Diverse traits are presumably influenced by maternal effects, for example, seed size in plants (Byers *et al.*, 1997), diapause induction in insects (Mousseau & Dingle, 1991), body size in lemmings (Boonstra & Hochachka, 1997), and ovariole number in *Drosophila* (Starmer *et al.*, 1998). Regarding many other traits, differences between reciprocal crosses are often attributed to maternal effects. Using literature data on reciprocal crosses to examine the relative influence of maternal effects on phenotypic differences between species populations, Reinhold, (2002) has shown a significant contribution of maternal effects on behavioral and morphological traits in mammals. In line with this issue, mammal offspring size and growth are often influenced by mother age, size, and environmental conditions (Ellis *et al.*, 2000). Pakkasma *et al.* (2003) have investigated the relative importance of genetic and maternal effects as determinants of phenotypic variation in viability related traits in the common frog *Rana temporaria*. Apart from the significant genetic effects was the role of maternal effects as determinants of variation in all estimated traits. Maternal effects were also found as the most important source of variation accounting for 70% of the variance in the probability of survival. Acting on body size and shape,

maternal effects were more strongly mediated through egg size effects. In both cases, results indicated an environmental dependency. In insects maternal effects can have a large influence on offspring traits (Fox & Savalli, 1998; Gil *et al.*, 1999; Hockham *et al.*, 2001; Kerver & Rotman, 1987; Royle *et al.*, 2001). As Orr (1989a) has pointed out, maternal effects on post-zygotic isolation are a common feature within the genus *Drosophila* in which significant maternal effects have been found for ethanol tolerance (Kerver & Rotman, 1987). In *Drosophila pseudoobscura*, the difference between the F₁ generations of the reciprocal crosses has demonstrated to be controlled by a maternal effect and not by a plasmatic inheritance (Dobzensky, 1933). The genetic causes of hybrid inviability in *D. melanogaster* species complex clearly include interactions between zygotic and mother genotypes and may be interpreted as maternal effects due to that hybrids are viable if the mother is *D. melanogaster* but die as embryos if she is the sibling species *D. simulans* (Watanabe *et al.*, 1977; Hutter *et al.*, 1990). In comparison of three geographically distant populations of the mosquito *Aedes atropalpus*, Beach (1978) found little maternal effect on temperature diapause. In a lizard, maternal behavior may also even without provisioning of offspring cause maternal effects; maternal basking was shown to have a large influence on offspring phenotype and growth (Wapstra, 2000). Maternal effects have also been shown to occur in fish, where fry size but not adult size of offspring is largely determined by maternal effects (Heath *et al.*, 1999). Development time, the period from the hatching of a larva to the adult stage, can be of considerable importance to an insect. The duration of the juvenile stage has an important bearing on population growth parameters because of its relation to age at first reproduction (Dingle, 1990), and it can also influence body size and hence, indirectly, fecundity (Roff, 1986). Our results have shown significant variations of development time but not the wing size. Maternal effects influencing development time are known in *D. melanogaster* (Millis & Hartmann-Goldstein, 1985). Progeny of the flies reared in a short-day environment displayed shorter development times than progeny of long-day flies (Giesel, 1988).

This topic deserves further investigation because of post-zygotic isolation can also result from genetic incompatibilities between genomes that are expressed when they are brought together in hybrids (Rice & Hostert 1993; Rundle & Whitlock 2001; Coyne & Orr 2004) or when they reduce the fitness of hybrids. Nevertheless, the effects of reduced fitness of hybrids may be greater in more harsh environments (Rundle & Whitlock 2001). Then, the process could evolve with respect to the parental environments and, result in reinforcement of mate recognition (Howard, 1993) one of the main forces that drive sympatric speciation in natural

populations. Ecological differences may reduce mating rates between diverging taxa (Fry, 2003) or if assortative mating is based on ecologically functional traits like fitness (Burger *et al.*, 2006). If ecologically divergent individuals are unlikely to mate from the outset and selection reduces the frequency of intermediate ecotypes, the remaining parental phenotypes mate largely within themselves. Consequently, post-zygotic mechanism can directly affect pre-mating patterns if traits used in mating are also directly relevant to ecological performance or genetically correlated with ecological traits.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions: AN and AD planned the experiments. AN, CN conducted the experiments. AN and AD analysed the data. AN and AD wrote the manuscript with inputs from HM, SPS, LT, LK, OF, FT and RKD. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: This work was funded by a joint UK Medical Research Council (MRC) and the UK Department for International Development (DFID) Africa Research Leader grant to AD and FT (#97014). We are grateful to the communities of Soumouso and VK5, who have been very helpful in allowing for regular collections of mosquitoes in their villages. We also thank the many colleagues who have generously contributed ideas suggestions for this work, with a special thank to Millogo for his help with larval transplantation and emerging adult collection.

References:

- Aboagye-Antwi F, Alhaféz N, Weedall GD, Brothwood J, Kandola S, Paton D, Fofana A, Olohan L, Betancourth MP, Ekechukwu NE: Experimental Swap of *Anopheles gambiae*: Assortative Mating Preferences Demonstrates Key Role of X-Chromosome Divergence Island in Incipient Sympatric Speciation. *In PLoS Genet* 2015, 11.
- Aboagye-Antwi F, Tripet F: Effects of larval growth condition and water availability on desiccation resistance and its physiological basis in adult *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Malar J* 2010, 9:225.
- Beach R., 1978. The required day number and timely induction of diapause in geographic strains of mosquito *Aedes atropalpus*. *J. Insect Physiol.* 24: 449-55
- Beeman RW, K.S Friesen and RE Denell, 1992. Maternal effect selfish genes in flour beetles. *Science* 256: 89-92.
- Bernardo, J. 1996a. Maternal effects in animal ecology. *Am. Zool.* 36: 83-105.
- Bernardo, J. 1996b. The particular maternal effect of propagule size, especially egg size: patterns models, quality of evidence and interpretations. *Am. Zool.* 36: 216-236.
- Boonstra R and Hochachka WM, 1997. Maternal effects and additive genetic inheritance in the collard lemming *Dicrostonyx groenlandicus*. *Evol Ecol* 11: 169-182.
- Briegel H: Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *J Med Entomol* 1990, 27(5):839-850.
- Byers DL, Platenkamp GAJ, and Shaw RG, 1997. Variation in seed characters in *Nemophila menziesii*: evidence of a genetic basis for maternal effect. *Evolution* 51:1445-1456.

- Caputo B, Nwakanma D, Jawara M, Adiamoh M, Dia I, Konate L, Petrarca V, Conway DJ, della Torre A: Anopheles gambiae complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of An. gambiae s.s. *Malar J* 2008, 7:182.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ: Anopheles coluzzii and Anopheles amharicus, new members of the Anopheles gambiae complex. *Zootaxa* 2013, 3619:246-274.
- Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, Ose K, Fotsing JM, Sagnon N, Fontenille D *et al*: Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in Anopheles gambiae. *BMC Ecol* 2009, 9:16.
- Coyne JA and Orr AR, 1989. Two rules of speciation. Pp. 180-207 in D. Otte and J. A. Endler, eds. Speciation and its consequences. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Coyne JA, Orr HA: Speciation; 2004.
- Dabire KR, Sawadogo S, Diabate A, Toe KH, Kengne P, Ouari A, Costantini C, Gouagna C, Simard F, Baldet T *et al*: Assortative mating in mixed swarms of the mosquito Anopheles gambiae s.s. M and S molecular forms, in Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol* 2013, 27(3):298-312.
- della Torre A, Tu Z, Petrarca V: On the distribution and genetic differentiation of Anopheles gambiae s.s. molecular forms. *Insect Biochem Mol Biol* 2005, 35(7):755-769.
- Diabate A, Baldet T, Brengues C, Kengne P, Dabire KR, Simard F, Chandre F, Hougard JM, Hemingway J, Ouedraogo JB *et al*: Natural swarming behaviour of the molecular M form of Anopheles gambiae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003, 97(6):713-716.
- Diabate A, Dabire RK, Heidenberger K, Crawford J, Lamp WO, Culler LE, Lehmann T: Evidence for divergent selection between the molecular forms of Anopheles gambiae: role of predation. *BMC Evol Biol* 2008, 8:5.
- Diabate A, Dabire RK, Kengne P, Brengues C, Baldet T, Ouari A, Simard F, Lehmann T: Mixed swarms of the molecular M and S forms of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol* 2006, 43(3):480-483.
- Diabate A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, Millogo N, Baldet T, Simard F, Gimnig JE, Hawley WA, Lehmann T: Larval development of the molecular forms of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol* 2005, 42(4):548-553.
- Diabate A, Dabire RK, Millogo N, Lehmann T: Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of Anopheles gambiae (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 2007, 44:60-64.
- Diabate A, Dabire RK, Millogo N, Lehmann T: Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2007, 44(1):60-64.
- Diabate A, Dao A, Yaro AS, Adamou A, Gonzalez R, Manoukis NC, Traore SF, Gwadz RW, Lehmann T: Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of Anopheles gambiae. *Proc Biol Sci* 2009, 276(1676):4215-4222.
- Diabate A, Triplet F: Targeting male mosquito mating behaviour for malaria control. *Parasites & Vectors* 2015, 8(347).
- Diabate A, Yaro AS, Dao A, Diallo M, Huestis DL, Lehmann T: Spatial distribution and male mating success of Anopheles gambiae swarms. *BMC Evol Biol* 2011, 11:184.
- Dingle H, 1990. The evolution of life histories. In Population Biology, ed. K. Woehrmann, S. Jain, pp. 267-89 Berlin: Springer
- Dobzhansky, Th., "Role of the Autosomes in the Drosophila pseudoobscura Hybrids," Proc. Nat. Acad. Sci., 19, 950-953 (1933).
- Ellis SL, Bowen WD, Boness DJ, and Iverson SJ, 2000. Maternal effects on offspring mass and stage of development at birth in the harbour seal, Phoca vitulina. *J Mamm Evol* 81:1143-1156.
- Falconer, DS, 1989. Introduction to Quantitative Genetics. New York: Longman 3rd ed.
- Fry JD, 2003. Multilocus Models Of Sympatric Speciation: Bush Versus Rice Versus Felsenstein. *Evolution*, 57(8), 1735-1746
- Galloway, L. F. 1995. Response to natural environmental heterogeneity: maternal effects and selection on lifehistory characters and plasticities in Mimulus guttatus. *Evolution* 49: 1095-1107.
- Gavrilets S: The Maynard Smith model of sympatric speciation. *J Theor Biol* 2006, 239(2):172-182.
- Giesel JT, 1988. Effects of parental photoperiod on development time and density sensitivity of progeny of Drosophila melanogaster. *Evolution* 42: 1348-50.
- Gilles M, Meillon B: The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). *Publ South Afr Inst Med Res* 1968, 54:343 p.
- Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A, Simard F: A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito Anopheles gambiae. *Behav Ecol* 2010, 21(5):1087-1092.
- Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabire RK, Simard F: Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito Anopheles gambiae in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol* 2012, 26(1):9-17.

- Jimoneau G, Pombi M, Dabire RK, Diabate A, Morand S, Simard F: Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasit Vectors* 2012, 5:65.
- Howard DJ, in *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*, R. G. Harrison, Ed. (Oxford Univ. Press, New York, 1993), pp.46-69.
- Ishikawa, M. & Mori, S. Mating success and male courtship behaviors in three populations of the threespine stickleback. *Behaviour* 137, 1065–1080 (2000).
- J MS: Sympatric speciation. *The American Naturalist* 1966, 100:637-650
- Kamdem C, Tene Fossog B, Simard F, Etouana J, Ndo C, Kengne P, Bousses P, Etoa FX, Awono-Ambene P, Fontenille D *et al*: Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 2012, 7(6):e39453.
- Lanzaro GC, Lee Y: Speciation in *Anopheles gambiae* — The Distribution of Genetic Polymorphism and Patterns of Reproductive Isolation Among Natural Populations. 2013.
- Lanzaro GC, Tripet F: Gene flow among populations of *Anopheles gambiae*: A critical review. *Wageningen Frontis Series* 2003:109-132.
- Lee Y, Collier TC, Sanford MR, Marsden CD, Fofana A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Chromosome inversions, genomic differentiation and speciation in the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 2013, 8(3):e57887.
- Lee Y, Marsden CD, Norris LC, Collier TC, Main BJ, Fofana A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Spatiotemporal dynamics of gene flow and hybrid fitness between the M and S forms of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(49):19854-19859.
- Lehmann T, Diabate A: The molecular forms of *Anopheles gambiae*: A phenotypic perspective. *Infection Genetics and Evolution* 2008, 8:737-746.
- Lehmann T, Diabate A: The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective. *Infect Genet Evol* 2008, 8(5):737-746.
- Lyimo EO, Takken W & Koella JC, 1992. Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. *Entomol. exp. appl.* 63: 265-271
- Manoukis NC, Toure MB, Sissoko I, Doumbia S, Traore SF, Diuk-wasser MA and Taylor CE, 2006. Is Vector Body Size the Key to Reduced Malaria Transmission in the Irrigated Region of Niono, Mali? *J. Med. Entomol.* 43 (5): 820-827 (2006).
- Marsden CD, Lee Y, Nieman CC, Sanford MR, Dinis J, Martins C, Rodrigues A, Cornel AJ, Lanzaro GC: Asymmetric introgression between the M and S forms of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, maintains divergence despite extensive hybridization. *Mol Ecol* 2011, 20(23):4983-4994.
- Millis A, Hartmann-Goldstein I, 1985. Maternal age, development time, and position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Sel. Evol.* 17: 171-78.
- Mousseau TA and Dingle H, 1991. Maternal effects in insect life histories. *Ann Rev Entomol* 36:511–534.
- Mousseau TA and Fox CW, 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends Evol Ecol* 13:403–406.
- Mousseau, T. A. and Dingle, H. 1991. Maternal effects in insect life histories. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 511 534.
- Mousseau, T. A. and Fox, C. W. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecol. Evol.* 13: 403 407.
- Nagel, L. & Schluter, D. Body size, natural selection, and speciation in sticklebacks. *Evolution* 52, 209–218 (1998).
- Nwakanma DC, Neafsey DE, Jawara M, Adiamoh M, Lund E, Rodrigues A, Loua KM, Konate L, Sy N, Dia I *et al*: Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Genetics* 2013, 193(4):1221-1231.
- Oliveira E, Salgueiro P, Palsson K, Vicente JL, Arez AP, Jaenson TG, Caccone A, Pinto J: High levels of hybridization between molecular forms of *Anopheles gambiae* from Guinea Bissau. *J Med Entomol* 2008, 45(6):1057-1063.
- Orr HA, 1987. Genetics of male and female sterility in hybrids of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 116: 555-563.
- Orr HA, 1989. Genetics of sterility in hybrids between two sub-species of *Drosophila*. *Evolution* 43: 180-189.
- Orr, H. A., and J. A. Coyne. 1989. The genetics of postzygotic isolation in the *Drosophila virilis* group. *Genetics* 121: 527-537.
- Pakkasmaa S, J Merila and RB O'Hara, 2003. Genetic and maternal effect influences on viability of common frog tadpoles under different environmental conditions. *Heredity* 91, 117–124
- Pierre Hutter, John Rootet and Michael Ashburner (1990). A Genetic Basis for the Inviability of Hybrids Between Sibling Species of *Drosophila*. *Genetics* 124: 909-920
- Ramsey J, Bradshaw HD, Jr., Schemske DW: Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution; international journal of organic evolution* 2003, 57(7):1520-1534.
- Reinhold K., 2002. Maternal Effects and the Evolution of Behavioral and Morphological Characters: A Literature Review Indicates the Importance of Extended Maternal Care. *The American Genetic Association* 93:400–405

- Rice WR, Hostert EE: Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years. *Evolution* 1993, 47:1637-1653.
- Roff DA, 1986. Predicting body size with life history models. *Bioscience* 36: 316-23.
- Roux O, Diabaté A, Simard F: Larvae of cryptic species of *Anopheles gambiae* respond differently to cues of predation risk. *Freshwater Biology* 2013, 58:1178–1189.
- Rundle HD, Nosil P: Ecological speciation. *Ecological Letter* 2005, 8:336-352.
- Rundle, H.D. & Whitlock, M., 2001. A genetic interpretation of ecologically dependent isolation. *Evolution*, 55, 198–201.
- Sanford MR, Demirci B, Marsden CD, Lee Y, Cornel AJ, Lanzaro GC: Morphological differentiation may mediate mate-choice between incipient species of *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS One* 2011, 6 (11):e27920.
- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A: Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J* 2008, 7:163.
- Sawadogo PS, Namountougou M, Toe KH, Rouamba J, Maiga H, Ouedraogo KR, Baldet T, Gouagna LC, Kengne P, Simard F *et al*: Swarming behaviour in natural populations of *Anopheles gambiae* and *An. coluzzii*: review of 4 years survey in rural areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop* 2014, 132 Suppl:S42-52.
- Sawadogo SP, Costantini C, Penetier C, Diabate A, Gibson G, Dabire RK: Differences in timing of mating swarms in sympatric populations of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. (formerly *An. gambiae* M and S molecular forms) in Burkina Faso, West Africa. *Parasit Vectors* 2013, 6:275.
- Schluter D: Ecology and the origin of species. *Trends Ecol Evol* 2001, 16(7):372-380.
- Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, Fotsing JM, Fontenille D, Besansky NJ, Costantini C: Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol* 2009, 9:17.
- Smith, J.M. (1966). Sympatric speciation. *The American Naturalist* 100 (916): 637–950. [doi:10.1086/282457](https://doi.org/10.1086/282457). [JSTOR 2459301](https://www.jstor.org/stable/2459301)
- Starmer WT, Polak M, Wolf LL, and Barker JSF, 1998. Reproductive characteristics of the flower breeding *Drosophila hibisci* Bock (*Drosophilidae*) in eastern Australia: genetic and environmental determinants of ovariole number. *Evolution* 52:806–815.
- Tripet F, Toure YT, Dolo G, Lanzaro GC: Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* females revealed by DNA analysis of transferred sperm. *Am J Trop Med Hyg* 2003, 68(1):1-5.
- Tripet F, Toure YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G, Lanzaro GC: DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology* 2001, 10:1725-1732.
- Tripet F, Toure YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G, Lanzaro GC: DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* 2001, 10(7):1725-1732.
- Via S: Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends Ecol Evol* 2001, 16(7):381-390.
- Watanabe TK, WH Lee, Y. Inoue and M. Kawanishi, 1977. Genetic variation of the hybrid crossability between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Jpn. J. Genet.* 52: 1-8.
- Weir BS, Cockerham CC: Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 1984, 19:1358-1370.
- White BJ, Cheng C, Simard F, Costantini C, Besansky NJ: Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* 2010, 19(5):925-939.
- White BJ, Lawniczak MK, Cheng C, Coulibaly MB, Wilson MD, Sagnon N, Costantini C, Simard F, Christophides GK, Besansky NJ: Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(1):244-249.
- Wilson DS, Turelli M: Stable underdominance and the evolutionary invasion of empty niches. *Am Nat* 1986, 127:835-850.
- Wu CI, 1992. A note on Haldane's rule: hybrid inviability versus hybrid sterility. *Evolution* 46: 923-931.



Role of nutritional reserves and body size in *Anopheles gambiae* males mating success



Hamidou Maïga^{a,*}, Abdoulaye Niang^a, Simon P. Sawadogo^a, Roch K. Dabiré^a,
Rosemary Susan Lees^b, Jeremie R.L. Gilles^b, Frédéric Tripet^c, Abdoulaye Diabaté^a

^a Institut de Recherche en Sciences de la Santé/Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

^b Insect Pest Control Laboratories, IEM/FMO Laboratories, Australia

^c Keele University, Staffordshire ST5 5BG, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2013

Received in revised form 26 August 2013

Accepted 31 August 2013

Available online 8 September 2013

Keywords:

Anopheles gambiae

Males

Molecular forms

Mating success

Energy

ABSTRACT

A better knowledge of the different parameters that account for male mating success in the wild is critical to the development of genetic control strategies. In this study, we measured energy budgets (total sugar and glycogen) as the daily energetic investment in swarming males of *An. gambiae* s.s. M and S molecular forms from two different field locations, VK7 and Soumoussa. We also looked at the difference between energetic reserves in mated males compared to unmated ones, and assessed wing length in both molecular forms to explore whether this phenotypic trait was involved in swarming behavior or mating success. The current study showed that the energetic cost of 25 min of swarming was around 50% of the male's sugar (M form: 48.5%, S form: 56.2%) and glycogen (M form: 53.1%, S form: 59%) reserves. However, no difference in carbohydrate content was observed between mated and unmated males. Mated males were found to be bigger than unmated ones, while intermediate size of males is advantageous in mating system, both in M and S molecular forms and when collected in two different locations. Regardless of the collection location, no difference in wing size was observed in swarming males collected early or late during a particular swarm. The results are discussed in the context sexual selection in different ecological locations.

Copyright © International Atomic Energy Agency 2013. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Current malaria control strategies have cut down the malaria burden in many endemic areas however the emergence and rapid spread of insecticide and drug resistance undermine such efforts. There is growing concern that malaria eradication will not be achieved without the introduction of novel control tools, hence research into alternatives to the use of insecticides against adult mosquito vectors has been increasing. New control approaches aim to render wild vector populations less able to transmit disease by releasing mosquitoes that are genetically modified (GM) to resist infection or to cause population suppression (Christophides, 2005; Ferguson et al., 2005). For example, one classic approach that may be effective is based on sterile male release (Knippling et al., 1968).

However, availability of these tools does not necessarily guarantee the success of vector control campaigns. The control strategy can work only if the engineered males can pass on their genes, so the ability of released males to successfully compete for females in the field is a critical aspect of its success (Knippling, 1955; Bargielowski et al., 2012). Past failures in releasing sterile males (Benedict and Robinson, 2003 and references therein) have led to repeated calls to further investigate the behavior and physiology of male mating (Ferguson et al., 2005; Takken, 2005). Careful selection of mating characteristics during colonization and rearing prior to release must be combined with intensive field trials to ensure phenotypic characters of released males are not antagonistic to longevity, dispersal, or mating competitiveness (Howell and Knols, 2009).

An. gambiae mating occurs in flight. Males gather at specific mating stations at sunset, waiting for females to copulate with, and females sporadically visit these aggregations and depart in copula with males. How females choose between swarms and how they select or accept males within swarms is not known. However given that only 7% of males mate in any single night (Diabaté et al., 2011), competition for females is certainly very high. The mating system of *An. gambiae* is considered lek-like with scramble mating competition characteristics (Diabaté et al., 2011). As in many

* Corresponding author at: IRSS/Centre Muraz, BP 300 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Tel.: +226 71 23 71 77; fax: +226 20 97 04 57.

E-mail addresses: malgamid@yahoo.fr (H. Maïga), oband79@yahoo.fr (A. Niang), sawimp2005@yahoo.fr (S.P. Sawadogo), dabine.jrcv@hotmail.com (R.K. Dabiré), rosemarysusanlees@gmail.com (R.S. Lees), j.gilles@iaea.org (J.R.L. Gilles), tripet@biol.keele.ac.uk (F. Tripet), a.diabate@normali.com (A. Diabaté).

lek-based mating, a highly skewed rate of male mating success is observed (Mackenzie et al., 1995). Possible factors accounting for this mating bias are male body size (Yuval et al., 1993; Voordouw and Koella, 2007; Huho et al., 2007; Maïga et al., 2012), age (Chambers and Klowden, 2001; Huho et al., 2006, 2007; Sawadogo et al., 2013), genetics (Voordouw and Koella, 2007), sperm length (Voordouw and Koella, 2007) and energetic reserves (Yuval et al., 1994; Huho et al., 2007; Gilles et al., 2011; Damiens et al., 2012).

Nutritional reserves accumulated during larval development and from sugar-feeding as adults are critical determinants of adult survival and mating success (Foster, 1995); and flight is a requirement for mosquito mating and this activity is fueled by sugars and glycogen (Yuval et al., 1994; Bargielowski et al., 2012). Hence, a comprehensive study of energy level variation in mosquitoes at different physiological states and collected at different times of day (early morning (between 06:00 and 07:00 am), late afternoon (between 05:00 and 06:00 pm) and after sunset (around 06:30 pm)) would enable an estimation of the energy allocated to essential activities such as swarming and mating. Our recent study demonstrated variation in energy reserves between indoor resting males of the M form of *An. gambiae* and those caught in swarms (Maïga et al., 2012). Here we extend this study to both M and S forms of *An. gambiae*. We measured the energy budgets (total sugar and glycogen) in swarming males of the M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s. from two different field locations, VK7 and Soumouso, Burkina Faso. We also looked at the energetic reserves in mated males compared to unmated ones to test whether or not energetic reserves of mated M form males was higher than that of their counterparts in natural swarms. Finally, wing length was assessed in both molecular forms to explore whether this phenotypic trait was involved in mating success or in swarming behavior of wild populations.

2. Materials and methods

2.1. Study areas

The survey was conducted in two villages, Vallée du Kou 7 (4°25'W, 11°24'N) and Soumouso (11°00'N, 4°02'W), both situated near Bobo Dioulasso in Burkina Faso, West Africa. Vallée du Kou 7 (VK7) is one of the 7 districts of the rice growing area of Bama, in the North-West of Burkina Faso. The rainy season extends from June to October and the dry season from November to May. The Kou River is a permanent source of irrigation water and there are two rice crops per year, grown from July to November and from January to May. An irrigation system covering 1200 ha was also installed in the 1970s allowing Bama to support a population of 4470 inhabitants. The VK7 district is located at the periphery of the rice fields and is home to about 600 inhabitants, mainly farmers. Livestock mainly comprises sheep, goats, pigs, and cows, and cotton and maize fields surround the village. The irrigation system and rice fields provide year-round mosquito larval sites. Additional larval sites are created by rain water accumulating in ponds and depressions in the ground (Baldet et al., 2003; Diabaté et al., 2005). The two molecular forms of *An. gambiae* occur in sympatry, though the M form is dominant (Diabaté et al., 2003).

Soumouso is a typical village in the savannah area, situated ~55 km Northeast of Bobo-Dioulasso, where both M and S forms of *An. gambiae* coexist. *An. funestus* Giles and *An. nili* Theobald also are found there and contribute to malaria transmission (Dabiré et al., 2009). There are two distinct seasons, with the heaviest rainfall from May to October (annual average 1000–1200 mm). The highest density of *An. gambiae* occurs in September, but the relative frequencies of the two molecular forms change over time, with the M form being predominant from December to June and the S

form dominating from July to November. The two molecular forms changes over time are due to the evolution of larval habitats over time. The S molecular form is better adapted to temporary larval habitats that are widespread during the rainy season across the study site (July to November), while the M is mostly found in semi-permanent and permanent larval sites. The latest larval habitats are mostly found during the dry season (December to June). *An. arabiensis* Paton is also occasionally reported to be present at low frequencies (Dabiré et al., 2009). 'Mixed-swarms' consisting of both M and S molecular forms were observed in 2004 (Diabaté et al., 2006).

2.2. Mosquitoes

Male mosquitoes were collected from swarms in July, August, September and November 2011. Sweep nets were used to sample males from swarms at regular intervals around sunset: early swarms (5 min after the initiation of the swarm), in the middle of the swarm (10 min after the first collection) and late swarms (10 min after the second collection). In each collection between 1 and 100 males were collected, always leaving some males remaining in the swarm so that the swarm continued and could be resampled. Early morning and late afternoon adult collections were conducted in resting places indoors using a mouth aspirator, and newly emerged males were collected from breeding sites using emergence traps. All samples were anesthetized, transported in a liquid nitrogen box, and stored at -80°C . Total energy reserves were assessed in individual specimens. Each individual male was briefly crushed in methanol and used for analysis of sugar and glycogen content. A 1:2 mixture of chloroform and methanol was added to one half of the samples; these were then centrifuged at 14000 rpm for 15 min and half of the supernatant used for sugar analysis. The precipitate was kept for glycogen analysis. A colorimetric test was used to quantify the different metabolites following a modified spectrophotometric protocol of Rivero and Ferguson (2003).

Standard curves for converting absorbency readings into quantities of total sugars and glycogen were produced by measuring the absorbency of samples of known concentration. Sugar and glycogen concentrations were determined from a standard curve based on glucose (Sigma-Aldrich). Lipid and protein content were not assessed, as they are not used by male mosquitoes to fuel flight (Yuval et al., 1994; Maïga et al., 2012).

2.3. Wing length

Wings from field collected mosquitoes were dissected, mounted dry on microscope slides, and photographed using a Leica EZ4 D (Leica Microsystems, Suisse) microscope. The length was then measured using the software Image J1.41.0 (Wayne Rasband National Institute of Health, USA). Wing lengths (left and right) were measured as described previously (Huestis et al., 2011) from the annular notch to the end of the radius vein excluding fringe scales.

2.4. Statistical analysis

The energy content in Joules of metabolites (J/mm^3) was obtained by multiplying the corresponding metabolite amount obtained from calibration curves by 16.74 J per mg for sugars and glycogen (Clements, 1992). These energy values were then divided by the cube of the size of the wing (WL^3 in mm^3) to take into account the size of the specimen and so standardize the measurements (Briegleb, 1990). Analysis of the different metabolites indicated that they did not follow a normal distribution, hence the non-parametric Mann-Whitney test was used to assess differences in energetic reserves between samples. Differences in wing size, as a proxy of

body size, between males caught in copula and free flying males in swarms were tested using the Student *t* test. The Pearson correlation analysis was also used to test for association between size of females and size of males in copula. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 and R2.15.2 software.

3. Results

3.1. Energy budgets of swarming M and S *An. gambiae* molecular forms

Total sugar content of early swarming males was higher than that of late swarming males in each of the two molecular forms (Fig. 1, Mann Whitney test M form: $U=758$, $P=0.0004$ (A) and S form: $U=105$, $P=0.0497$ (B)). Similarly, glycogen content was higher in the early swarming males than in the late swarming ones (Fig. 1, Mann Whitney test M form: $U=837$, $P=0.0220$ (C) and S form: $U=83$, $P=0.0234$ (D)). These results suggested that swarming involves about 50–60% of the male's sugar (M form collected in VK7: 48.5%, S form collected in Soumouso: 56.2%) and glycogen (M form: 53.1%, S form: 59%) content. In all, when the carbohydrate reserves (total sugar and glycogen) were combined, the energy cost of swarming in M and S molecular forms was 52.4% and 58.1% of initial reserves, respectively.

A significant difference in total sugar contents was observed between males swarming in Soumouso (S molecular form) and those collected in VK7 (M molecular form) (Mann Whitney test $U=2718$, $P<0.0001$) but not in glycogen contents (Mann Whitney test $U=4782$, $P=0.6542$). However further comparisons of energetic reserves between forms from indoor resting collections at the same site (Soumouso) did not show any difference suggesting that ecological differences between sites account for most of the energy variations (Mann Whitney test, Sugar content: $U=231$, $P=0.7137$, Glycogen content: $U=216$, $P=0.5063$). In contrast to swarming males, glycogen content (but not total sugar content) of newly emerged S molecular form males (from Soumouso) was significantly higher than that of the M molecular form from VK7 (Mann Whitney test $U=58$, $P=0.0115$).

3.2. Energetic reserves of M form mated and unmated males in swarms

Glycogen (Mann Whitney test $U=8147$, $P=0.8641$) and total sugar (Mann Whitney test $U=7886$, $P=0.5432$) reserves were similar between mated ($N=110$) and unmated ($N=150$) M molecular form males collected during each of the three months (July, August and November) in VK7.

3.3. Wing length

Overall, mated males of both M and S molecular forms were significantly bigger (as measured by wing length) than free-flying unmated males (Fig. 2, M form: $t=2.09$, $df=348$, $P=0.036$ (A), S form: $t=2.97$, $df=56$, $P=0.0043$ (B)). Regardless of the collection location, no difference in wing size was observed in swarming males collected early or late during a particular swarm (Fig. 2, VK7: ANOVA $P=0.116$, $F=2.16$ (A), Soumouso: $P=0.1286$, $F=2.08$ (B)). We found that the distribution of wing sizes of mated males is mostly focused around an optimal intermediate size of males that successfully copulate with females in both molecular forms. We further tested for association between sizes of females and males in copula by plotting mated female wing length against that of males caught in copula (Fig. 3). A weak correlation was observed between male and female size within pairs, suggesting that size did not drive assortative mating.

4. Discussion

As the number of projects involving release of genetically engineered or sterile male mosquitoes increases, a better knowledge of the different parameters related to mating is urgently required to help to determine the factors that account for male mating success in *An. gambiae* s.s.

4.1. Energy budgets of swarming *An. gambiae* M and S molecular forms

Our results demonstrate that swarming is highly costly in *An. gambiae* s.s.; the total sugar content of late swarming males was half that of the males caught early in swarms in each molecular form of *An. gambiae*. This finding suggests that sugar is the main fuel used in flight, as previously described by several authors (Nayar and Van Handel, 1971; Briegel et al., 2001; Yuval et al., 1994; Huho et al., 2007). Also in support of this conclusion, in a recent study we found that a male mosquito used up 59% of its sugar reserves while resting indoors from morning to evening and only 15.9% for swarming activities (Maiga et al., 2012), though in this study more than 50% of the total carbohydrate reserves seemed to be burned during swarming. These discrepancies could be related to variation in field collected samples and fluctuations in nutritional resource availability, and reveal that there are gaps in our knowledge about these physiological processes in the field. It may also reflect the complexity of swarming and mating cost assessment due to the different activities and costs involved. Oliva et al. (2012) reported that the energy budget for male mating behavior *Ae. albopictus* was hard to estimate as it comprises the costs due to copulation itself, courtship, semen transfer, and male–male competition, while Papadopoulos et al. (2010) showed that courtship is more costly than mating (Bargielowski et al., 2011) and reduces longevity in male medflies. However, the current findings confirm the requirement of sugar for males and the need to replenish their reserves for daily survival and for reproductive activities, consistent with the observation of Yuval et al. (1994) that sugar-feeding in *An. freeborni* takes place after swarming activities and before males enter resting sites. Accordingly they found a significant variation in sugar and glycogen contents between male *An. freeborni* collected in the early morning and those collected in swarms at sunset. The carbohydrates acquired serve to sustain the daily activities but are mostly invested in swarming (Yuval, 1992; Yuval et al., 1994). The authors estimated that 50% of the total energy reserves available to *An. freeborni* males were used to fuel swarming activities.

While each molecular form burned around half of its initial carbohydrate reserves in swarming, the S form (from Soumouso) invested around 6% more than the M form (from VK7), when the total sugar and glycogen contents were combined. This dissimilarity seems to be related to environmental effects and their consequences on body size and energetic reserves of males collected from two different locations. While body size is partially inherited, the quality of larval habitat accounts for most of the variation in this phenotypic trait (Lehmann et al., 2006; Ng'habi et al., 2008). Foster (1995) has also pointed out the importance of male sugar feeding which varies substantially between species, populations and habitats. Further comparisons between the energetic reserves of the two molecular forms collected while resting in houses in Soumouso (a sympatric area) did not show any difference between forms. The carbohydrate (total sugar and glycogen) reserves of newly emerged S molecular form males from Soumouso were significantly higher than those of the M molecular form from VK7. These discrepancies confirm that differentiation in energetic reserves between molecular forms from different locations is driven by ecological variation.

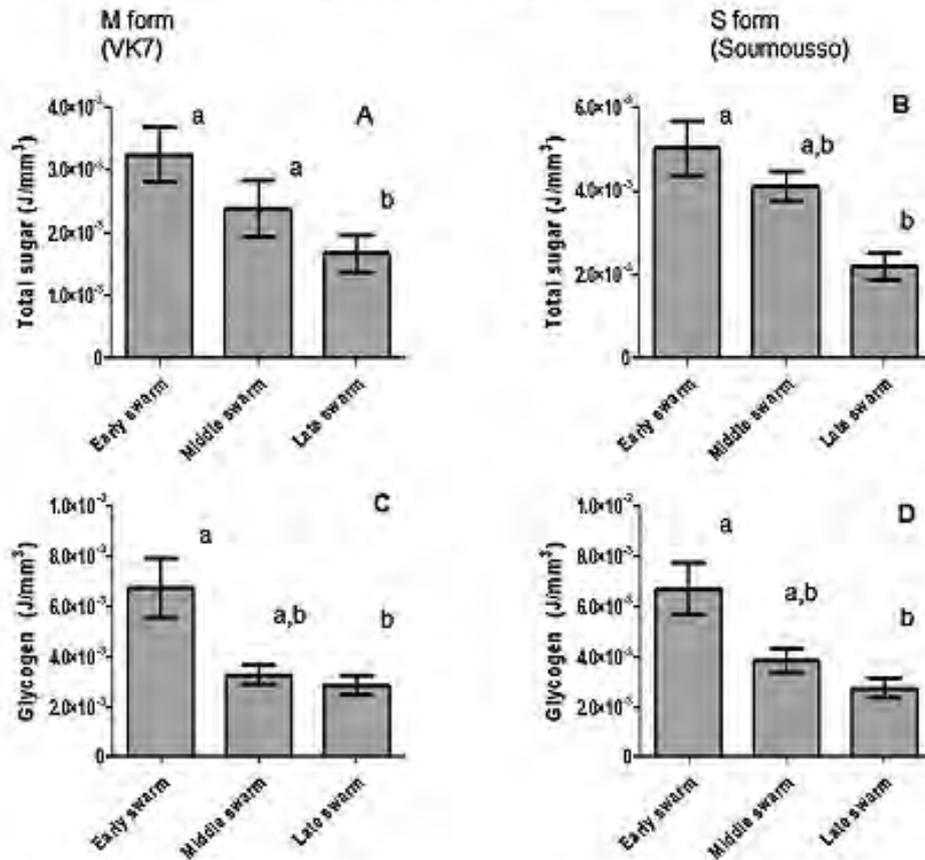


Fig. 1. Energy budgets (total sugar (A and B) and glycogen (C and D)) in swarming *An. gambiae s.s.* M (A and C) and S molecular form (B and D) males collected from early, middle and late swarms from two different field locations, VK7 and Soumouosso, Burkina Faso. Males from swarms were collected at regular intervals around sunset: early swarms (5 min after the initiation of the swarm), in the middle of the swarm (10 min after the first collection) and late swarms (10 min after the second collection). Graph followed by the same letter within the same group did not differ significantly ($P > 0.05$).

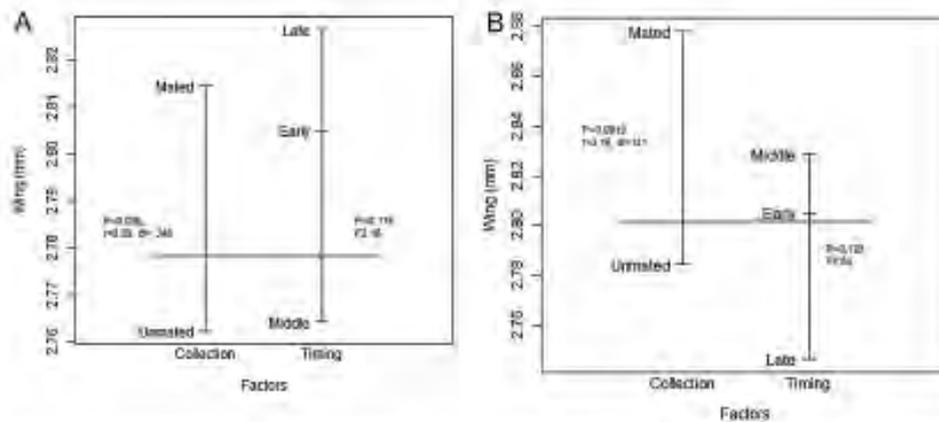


Fig. 2. Comparison of wing size of unmated and mated males and males collected at different time points (early, middle and late) from swarms *An. gambiae s.s.* M form collected in VK7 (A) and S form collected in Soumouosso (B). Males from swarms were collected at regular intervals around sunset: early swarms (5 min after the initiation of the swarm), in the middle of the swarm (10 min after the first collection) and late swarms (10 min after the second collection).

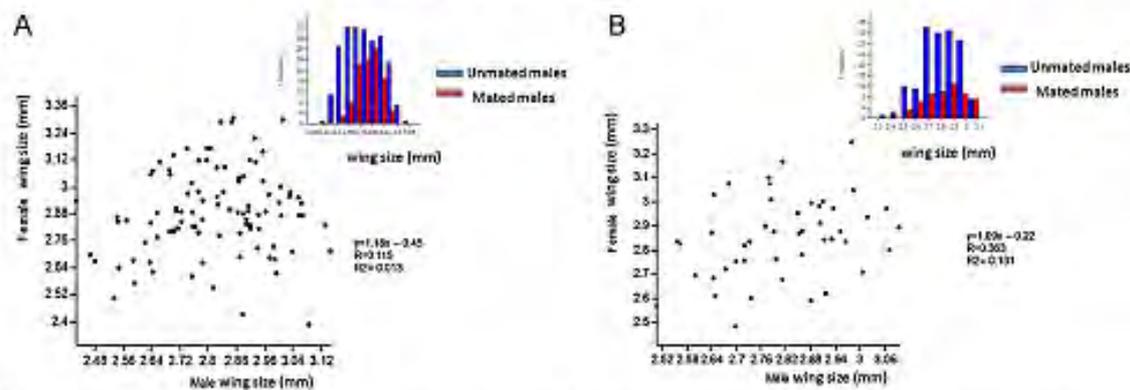


Fig. 3. Relationship between male and female body size in *An. gambiae* s.s. from NK7 (A, the M molecular form) and from Soumoussa (B, the S molecular form) caught in pairs. Inset (top right) is the frequency distribution of the wing size of free flying males and that of males caught in copula.

4.2. Energetic reserves in swarms of mated vs. unmated M form males

Contrary to expectation, energetic reserves were not higher in mated than unmated males. This suggests that energetic reserves may not be the most important factor involved in female choosiness or male mating success more generally, though it is well documented that stored sugars and glycogen are important for swarming (Yuval et al., 1994; Briegel et al., 2001; Maiga et al., 2012). It is also known that the energetic reserves conserved from the larval period are rarely enough to fuel reproductive activities; males need to forage much for resources, and their success at food gathering may be significantly linked to their ability to engage in reproductive activities (Yuval et al., 1994). Other authors have found that in harsh natural conditions, individuals surviving to emergence are those with a high level of competitiveness at the larval stage (Huho et al., 2007 and references therein), and all swarming males could be potentially among those best competitors. As we describe above, swarming is highly costly and some nutritional prerequisite is needed: each swarming male must reach a threshold amount of reserves which determines when it could join a swarm, how long it could remain (Yuval et al., 1994), and hence its likelihood of finding a mate. Unfortunately, we did not collect data on S form mated vs. unmated males for energetic reserve analysis, and cannot say from the current study whether or not this trend would be the same as in the M form.

4.3. Wing length

Body size is another trait associated with male mating success (Maiga et al., 2012). Several studies have tried to investigate the role of body size in sexual selection and showed that male mate selection, and a preference for larger females, has an influence on the genetic quality of offspring (Okanda et al., 2002). Accordingly in conditions where large numbers of males must compete for a smaller number of females, the largest females are more likely to become inseminated, to successfully oviposit and to produce large egg batches (Okanda et al., 2002). While the benefit of large body size is clear in females, it is not clear how variation in size can influence *An. gambiae* males mating success. Mating systems characterized by male territoriality lead to males fighting over territory to have the control of incoming females (Diabaté et al., 2011 and references therein). Males with a large body size are advantaged in such a mating system, however it is not clear whether or not males of *An. gambiae* fight over territory. In the current study, regardless of the location, no difference in wing size was observed in

swarming males collected at different times within swarms suggesting that body size does not play a significant role in swarm participation; no difference in male size was observed between early arrivers to the swarm and late swarmer. However, mated males of both M and S forms were significantly bigger on average than unmated males. Yuval et al. (1998) found that male *An. freeborni* that attended swarms were bigger than the non-swarming ones, whereas Charlwood et al. (2002) could not find any difference in body size between mated and unmated *An. gambiae*. N'ghabi et al. (2008) showed that intermediate sized males of the same species were more successful mated than larger or smaller males, and Pecharsky et al. (2002) showed that intermediate sized male mayflies (*Boetis bicaudatus*) may be optimal during mating because of their flight agility. The wing size distribution in mated males of each molecular form in the current study was mostly focused around an optimal intermediate size suggesting that flight agility might also play an important role in male mating success in *An. gambiae*. We did not find any significant correlation between the wing size of males and that of females caught in copula though a weak but significant correlation was observed in a previous study (Maiga et al., 2012). Current results suggest that size assortative mating in *An. gambiae* may not play an important role in mate choice. The apparent contradiction of the two studies is probably due to the methods of couple collection; while in the first study couples flying up to the sky after leaving the swarm were the main focus of capture and investigation, the current study was more exhaustive in capturing couples including those that dropped to the floor after the pair had formed.

The current study shows that of the use of a significant proportion of a male's energy reserves is associated with *An. gambiae* s.s. swarming and mating activities. Though we could not find any significant difference in energy content between mated and free-flying unmated males, the question needs further investigation and a better sampling protocol that could identify successful males even before they are paired. Total sugar and glycogen that fuel swarming and mating are derived from nectar foraged from flowering plants, which is variable in constituent nutrients, hence investigations into the quality of sugar meals in shaping the mating competitiveness of males is required. Mated males were found to be bigger than unmated ones, both in M and S molecular forms and when collected in two different locations. Further wing size of successful males was focused around a central value suggesting that body size may play an important role in mating competitiveness. Whether or not males of *An. gambiae* fight over territory needs to be investigated and the flight agility of males of different sizes deserves to be tested.

Acknowledgements

We would like to thank Iboudo Seni and Guel Hyacinthe for the technical assistance. We thank the reviewers for their useful comments and suggestions. Many thanks to mosquito collectors and the villagers who allowed us to collect mosquitoes in their houses. This investigation was funded by the MRC/DfID African Research Leadership Award (Grant ID 97014), and supported by the IAEA for the project/preparation of the manuscript.

References

- Baldet T, Diabaté A, Cougoumè RT. 2003. La transmission du paludisme dans la zone pluviale de la vallée du Kou (Bama) (Burkina Faso). *Cahiers Santé* 13, 55–60.
- Bargielowski I, Aphaey L, Koella JC. 2011. Cost of mating and insemination capacity of a genetically modified mosquito *Aedes aegypti* OX513A compared to its wild-type counterpart. *PLoS ONE* 6 (10): e26086. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026086>
- Bargielowski I, Kaufmann C, Aphaey L, Reiter P, Koella J. 2012. Flight performance and general energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 12, 1053–1055.
- Benedict MQ, Robinson AS. 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology* 18, 349–355.
- Briegleb H. 1990. Fecundity, metabolism and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae) vectors of malaria. *Journal of Medical Entomology* 27, 859–850.
- Briegleb H, Knusel I, Timmermann SE. 2001. *Aedes aegypti* size, reserves, survival, and flight potential. *Journal of Vector Ecology* 26, 21–31.
- Chambers GM, Kilowen MJ. 2001. Age of *Anopheles gambiae* Giles male mosquitoes at time of mating influences female oviposition. *Journal of Vector Ecology* 25, 196–201.
- Charnwood JD, Pinto J, Sousa CA, Ferreira C, Do Rosario VE. 2002. Male size does not affect mating success of *Anopheles gambiae* in São Tomé. *Medical and Veterinary Entomology* 16, 109–113.
- Christophides GK. 2005. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cellular Microbiology* 3, 325–333.
- Clements AN. 1992. *The Biology of Mosquitoes Development Nutrition and Reproduction*. Chapman and Hall, New York.
- Dabiré KR, Diabaté A, Namounougou M, Toé KH, Ouari A, Kengne P, Bass C, Baldet T. 2009. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F Idr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 1113–1120.
- Damant D, Benedict MQ, Wille M, Gilles JR. 2012. An inappetitive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): eat like a horse, a bird, or a fish? *Journal of Medical Entomology* 49, 1001–1011.
- Diabaté A, Baldet T, Brengues C, Kengne P, Simard F, Chandre F, Hougaard JM, Hemingway J, Ouedraogo JB, Fontenille D. 2003. Natural swarm log behaviour of the molecular form of *Anopheles gambiae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97, 713–715.
- Diabaté A, Dabiré KR, Kengne P, Brengues C, Ouari A, Simard F, Lehmann T. 2006. Mixed swarm of the molecular form M and S form of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *Journal of Medical Entomology* 43, 480–483.
- Diabaté A, Dabiré KR, Eun HK, Dalton R, Milogo N, Baldet T, Simard F, Gimngi EJ, Hawley AW, Lehmann T. 2005. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *Journal of Medical Entomology* 42, 548–553.
- Diabaté A, Yaro AS, Dao A, Diallo M, Huestis DL, Lehmann T. 2011. Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evolutionary Biology* 11, 184. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-11-184>.
- Ferguson HM, John B, Ng'habi K, Knols BGJ. 2005. Redressing the sex imbalance in knowledge of vector biology. *Trends in Biology and Evolution* 20, 202–209.
- Foster WA. 1995. Mosquito sugar feeding and reproductive energetic. *Annual Review of Entomology* 40, 443–474.
- Gilles JR, Lees RS, Soliban SM, Benedict MQ. 2011. Density-dependent effects in experimental larval populations of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) can be negative, neutral, or overcompensatory depending on density and diet levels. *Journal of Medical Entomology* 48, 295–304.
- Howell PI, Knols BGJ. 2009. Male mating biology. *Malaria Journal* 8 (Suppl. 2): S8–S10.
- Huestis DL, Yaro AS, Traoré AI, Adamou A, Kassougé Y, Diallo M, Timbiné S, Dao A, Lehmann T. 2011. Variation in metabolic rate of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in a Sahelian village. *Journal of Experimental Biology* 214, 2345–2353.
- Huho BJ, Ng'habi K, Killeen GF, Ninwengilla G, Knols BGJ, Ferguson HM. 2006. A reliable morphological method to assess the age of male *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal* 5, 26.
- Huho BJ, Ng'habi KR, Killeen GF, Ninwengilla G, Knols BGJ, Ferguson HM. 2007. Nature beats nurture: a case study of the physiological fitness of free-living and laboratory-reared male *Anopheles gambiae* s.l. *Journal of Experimental Biology* 210, 2939–2947.
- Knippling EF. 1955. Feasibility of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology* 48, 459–462.
- Knippling EF, Laven H, Craig GB, Pal R, Kitzmiller JB, Smith CN, Brown AW. 1968. Genetic control of insects of public health importance. *Bulletin of the World Health Organization* 38 (3): 411–438.
- Lehmann T, Dalton R, Kim EH, Dahl E, Diabaté A, Dabiré R, Dujardin JP. 2006. Genetic contribution to variation in larval development time, adult size and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*. *Infection, Genetics and Evolution* 6 (5): 410–416.
- Mackenzie A, Reynolds JD, Brown VJ, Sutherland WJ. 1995. Variation in male mating success at lek. *American Naturalist* 145, 693–692.
- Maïga H, Dabiré KR, Lehmann T, Tripet F, Diabaté A. 2012. Variation in energy reserves and role of body size in the mating system of *Anopheles gambiae*. *Journal of Vector Ecology* 37, 259–267.
- Nayar JK, Van Handel E. 1971. The fuel for sustained mosquito flight. *Journal of Insect Physiology* 17, 471–481.
- Ng'habi KR, Huho BJ, Ninwengilla G, Killeen GF, Knols BGJ, Ferguson HM. 2008. Sexual selection in mosquito swarms: may the best man lose? *Animal Behavior* 76, 105–112.
- Orlando F, Dao A, Njira B, Arja J, Akilo H, Touré Y, Oduja A, Boler J, Otiuro J, Yan G, Gouagna LC, Knols BGJ, Killeen GF. 2002. Behavioural determinants of gene flow in malaria vector populations: *Anopheles gambiae* males select large females as mates. *Malaria Journal* 1, 10.
- Oliva C, Maier M, Gilles J, Jacquier M, Lemperiere C, Quilici S, Vreysen M, Schoonebaer F, Chadee D, Boyer S. 2012. Effects of irradiation, presence of females, and sugar supply on the longevity of sterile males *Anopheles albopictus* (Skuse) under semi-field conditions on Reunion Island. *Acta Tropica* 125, 287–293.
- Papadopoulos NT, Uiedo P, Muller HG, Wang J-L, Mollenman E, Carey JR. 2010. Cost of reproduction in male medflies: the privacy of sexual courtship in extreme longevity reduction. *Journal of Insect Physiology* 56, 283–287.
- Pecharsky BL, McIntosh AR, Caudill CC, Dahl J. 2002. Swarming and mating behavior of mayfly *Beetia bicoloratus* suggest stabilizing selection for male body size. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51, 50–537.
- Rivero A, Ferguson HM. 2003. The energetic budget of *Anopheles arabiensis* infected with *Plasmodium falciparum*: is energy depletion a mechanism for virulence? *Proceedings: Biological Sciences* 270, 1365–1371.
- Sawadogo SP, Diabaté A, Toé HK, Sanon A, Lefèvre T, Baldet T, Gilles J, Simard F, Gibson G, Simons S, Dabiré KR. 2013. Effects of age and size on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *Journal of Medical Entomology* 50 (2), 285–295.
- Taikin W. 2005. Chemical ecology of insect vectors: temporal, environmental and physiological aspects. *Trends in Parasitology* 21, 57.
- Veillon M, Koella JC. 2007. Genetic variation of male reproductive success in a laboratory population of *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal* 6, 90.
- Yuval B. 1992. The other half—sugar feeding by mosquitoes. *Bulletin of the Society for Vector Ecology* 17, 150–155.
- Yuval B, Holliday-Hanson M, Washino RK. 1994. Energy budget of swarming male mosquitoes. *Ecological Entomology* 19, 74–79.
- Yuval B, Kaspi R, Sholouh S, Warburg MS. 1998. Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecological Entomology* 23, 211–215.
- Yuval B, Welles JW, Washino RK. 1993. Effect of body size on swarming behavior and mating success of male *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Behavior* 5, 33–342.

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Entomologie

Nom et prénom du Candidat : NIANG Abdoulaye

Titre de la thèse: Etude du système de reproduction d'*Anopheles gambiae* s.l. : mécanismes d'isolement reproductif entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* et facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles.

Date et lieu de soutenance : 18 / 02 / 2016 à l'amphi 4 de la FST/UCAD, Dakar, Sénégal

Jury	Président	Pr Oumar GAYE	FMPOS/UCAD
	Rapporteurs	Pr Frederic TRIPET Pr Sékou F. TRAORE Pr Roch K. DABIRE	Keele University (UK) FMPOS/USTTB (Mali) IRSS (Burkina Faso)
	Examineurs	Pr Ousmane FAYE Dr Ibrahima DIA Dr Cheikh SOKHNA	FST/UCAD IPD (Sénégal) IRD (Sénégal)
	Directeur de thèse	Dr Abdoulaye DIABATE	IRSS (Burkina Faso)

Abstract: Vector control based on approaches of released sterile or transgenic males is conceivable in Africa. However, these approaches require a better understanding of the reproductive system of malaria vector species. Within the *Anopheles gambiae* complex, two sibling species *An. coluzzii* and *An. gambiae*, the main human malaria vectors in sub-Saharan Africa are thought to be undergoing a process of speciation with gene flow. At present, little is known about the genomic and ecological factors that determine hybridization and introgression between these cryptic taxa. In the body work of this thesis undertaken in western Burkina Faso, we investigated the pre-mating and post-zygotic mechanisms of reproductive isolation between *An. coluzzii* and *An. gambiae* and the fundamental factors determining the reproductive success of males in natural conditions. The population genomic results show that among the three islands of speciation, the X chromosome island was perfectly associated with the spatial swarm segregation observed between *An. coluzzii* and *An. gambiae*. The association between swarm type and the 3L chromosome island was significantly weaker than that with the X island. The association with the 2L island was broken down probably due to the recent adaptive introgression of pesticide resistance loci located within this genomic region. In ecological conditions characterized by extreme dominance of one species, *An. gambiae* females were found more permissive to the interspecific mating than those of *An. coluzzii*. The lower overall hybridization rates observed at the larval and adult indoor stages compared to cross-mating rates support the idea that post-mating selection processes acting against hybrids may occur mostly prior to and/or at the early larval stages. The current assessment of the post-zygotic reproductive isolation has evidenced, for the first time in experimental study, the existence of post-zygotic isolation as maternal effects in the anti-predation response of the *An. coluzzii*, *An. gambiae* parental species and their reciprocal hybrids. In terms of developmental success, the hybrid col/gam was similar to *An. coluzzii* while the hybrid gam/col was similar to *An. gambiae*. The current study showed that the energetic cost of swarming was higher values in male's sugar and glycogen reserves. However, no difference in carbohydrate content was observed between mated and unmated males. Males *in copula* were found to be bigger than uncoupled ones, while intermediate size of males is advantageous in mating system. Regardless of the collection location, no difference in wing size was observed in swarming males collected early or late during a particular swarm. These findings are important for our understanding of the genomic structures and ecological processes associated with the reproductive isolation between these important malaria vectors species. Our results generate practical information for further implementations of malaria vector elimination programs using genetic control tools as alternative to insecticides and integrated approaches.

Keywords: Malaria, vector control, *An. coluzzii*, *An. gambiae*, reproductive isolation, reproductive success, Burkina Faso

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Entomologie

Nom et prénom du Candidat : NIANG Abdoulaye

Titre de la thèse: Etude du système de reproduction d'*Anopheles gambiae* s.l. : mécanismes d'isolement reproductif entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* et facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles.

Date et lieu de soutenance : 18 / 02 / 2016 à l'amphi 4 de la FST/UCAD, Dakar, Sénégal

Jury	Président	Pr Oumar GAYE	FMPOS/UCAD
	Rapporteurs	Pr Frederic TRIPET Pr Sékou F. TRAORE	Keele University (UK) FMPOS/USTTB (Mali)
Examineurs		Pr Roch K. DABIRE	IRSS (Burkina Faso)
		Pr Ousmane FAYE	FST/UCAD
		Dr Ibrahima DIA	IPD (Sénégal)
		Dr Cheikh SOKHNA	IRD (Sénégal)
	Directeur de thèse	Dr Abdoulaye DIABATE	IRSS (Burkina Faso)

Résumé : La lutte antivectorielle basée sur le lâcher des mâles stériles ou transgéniques est envisagée en Afrique mais elle demande une bonne connaissance des systèmes de reproduction des vecteurs du paludisme. Au sein du complexe *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. gambiae*, vecteurs majeurs du paludisme en Afrique sub-saharienne, sont en cours de spéciation avec flux de gènes. A la date d'aujourd'hui les facteurs génomiques et écologiques qui déterminent l'hybridation et l'introgression entre ces deux taxa sont peu connus. Les travaux de cette thèse réalisés à l'Ouest du Burkina Faso consistaient à étudier les mécanismes d'isolement reproductif pré-copulatoire et post-zygotique entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* et à identifier les paramètres fondamentaux qui déterminent le succès reproducteur des mâles dans les conditions naturelles. Les résultats de génomique des populations ont montré une forte association de la ségrégation spatiale des essaims à l'île de spéciation du chromosome X d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*. Cette association était plus importante que celle observée avec les îles de spéciation des chromosomes 2L et 3L. L'association avec l'île de spéciation 2L a été interrompue probablement du fait d'une récente introgression des loci de la résistance aux pesticides dans cette région du génome. Dans les conditions écologiques caractérisées par une extrême dominance de l'une des deux espèces, les femelles *An. gambiae* ont été trouvées plus permissibles aux accouplements mixtes que celles d'*An. coluzzii*. La comparaison des taux d'hybridation à différents stades supporte l'idée d'une possible source de pression sélective contre les hybrides dans ces conditions écologiques. Nos résultats d'évaluation de l'isolement reproductif post-zygotique ont mis en évidence pour la première fois dans une étude expérimentale, l'existence d'une barrière post-zygotique sous forme d'effets maternels dans la réponse anti-prédation des larves d'*An. coluzzii*, *An. gambiae* et leurs hybrides réciproques. En termes de succès au développement, l'hybride *An. col/gam* était similaire à *An. coluzzii*. De même l'hybride *An. gam/col* était similaire à *An. gambiae*. L'activité d'essaimage des mâles *An. coluzzii* et *An. gambiae* requiert une proportion significative des réserves énergétiques principalement les sucres totaux et le glycogène. Cependant, la quantité des réserves énergétiques utilisée n'a pas varié entre les mâles accouplés et non accouplés. La taille des mâles accouplés chez les deux espèces était en moyenne significativement plus élevée que celle des mâles non accouplés. La taille des mâles accouplés se situait autour d'une valeur centrale intermédiaire, suggérant que l'agilité dans le vol pourrait également jouer un rôle important dans le succès reproducteur. Notre étude a permis d'élucider les facteurs génomiques et écologiques ayant un rôle clé dans l'isolement reproductif entre *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Les résultats obtenus contribuent à une meilleure compréhension de la spéciation entre les deux espèces et sont ainsi d'une importance significative pour les futurs programmes de lâchers de mâles stériles ou transgéniques pour combattre le paludisme.

Mots clés : Paludisme, lutte antivectorielle, *An. coluzzii*, *An. gambiae*, isolement reproductif, succès reproducteur, Burkina Faso.