



HAL
open science

Etude de la diversité génétique des populations d'Anophèles darlingi, principal vecteur du paludisme en Guyane

Laetitia Ferraro

► **To cite this version:**

Laetitia Ferraro. Etude de la diversité génétique des populations d'Anophèles darlingi, principal vecteur du paludisme en Guyane. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Guyane, 2020. Français. NNT : 2020YANE0014 . tel-03616599

HAL Id: tel-03616599

<https://theses.hal.science/tel-03616599v1>

Submitted on 22 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Guyane

Discipline : *Sciences et Technologies*

Spécialité : *Physiologie et biologie des organismes-populations-interactions*

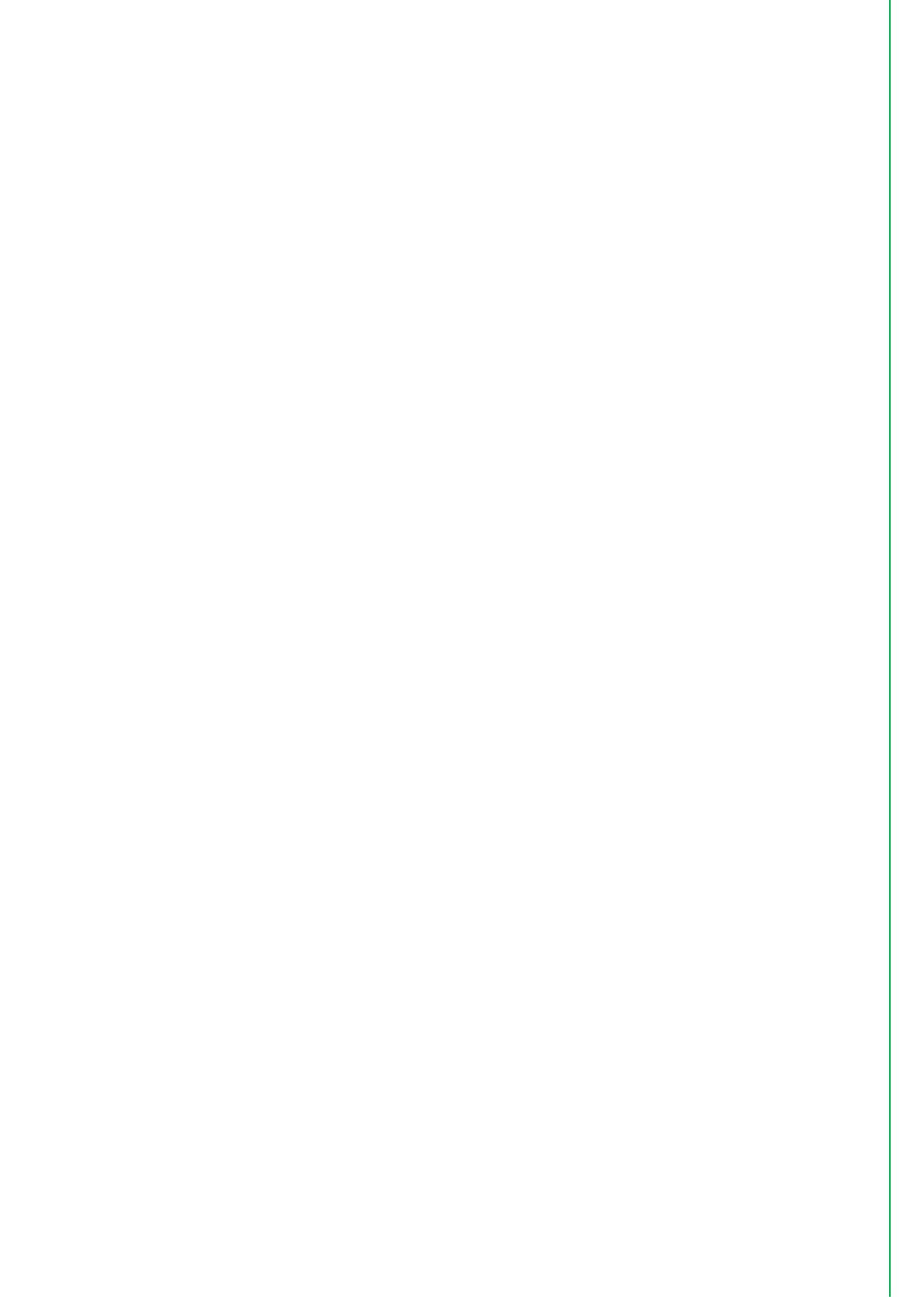
Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2020 par :

LAETITIA FERRARO

Etude de la diversité génétique des populations
d'*Anopheles darlingi*, principal vecteur du
paludisme en Guyane.

JURY

Magalie DEMAR	PU, MD, PhD, HDR	Président du Jury
Léonardo BASCO	MD, PhD, HDR	Rapporteur
Frédéric SIMARD	PhD, HDR	Rapporteur
Maylis DOUINE	MD, PhD, HDR	Examineur
Mathieu NACHER	MD, PhD, PU, HDR	Directeur de Thèse
Sébastien BRIOLANT	MD, PhD	Co-Directeur de Thèse
Hervé BOGREAUX	PHD	Co-Directeur de Thèse



A ARTHUR ET CLARA,

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le fruit d'un (très) long chemin grâce auquel j'ai pu échanger avec une multitude de gens passionnés et progresser. J'ai toujours trouvé quelqu'un sur ma route prêt à m'aider et me soutenir lors des difficultés. Je tiens ici à les remercier car elles ont toutes contribué à faire aboutir ce projet aujourd'hui.

Au docteur Mirdad Kazanji, directeur de l'Institut Pasteur de la Guyane,

Je souhaite vous remercier de m'avoir accueillie au sein de l'IPG où l'intégralité des manipulations a été réalisée mais aussi pour vos encouragements à chaque fois que nos chemins se sont croisés.

Au docteur Sébastien Briolant, Médecin en Chef du Service de Santé des Armées,

Merci Sébastien d'avoir, tout d'abord, pensé ce projet de thèse à ton arrivée en Guyane au moment même où je t'évoquais mon idée encore vague de me lancer dans un doctorat. Merci ensuite de m'avoir fait confiance pour ce projet tout en étant conscient des difficultés engendrées par mon statut de salariée à temps plein en parallèle. Mais cela ne t'a pas freiné. Merci d'avoir pris ce risque pour moi et de m'avoir soutenue pendant ces 7 années entrecoupées par des moments où j'avais moins de temps à y consacrer. Merci d'avoir toujours été présent et très réactif pour toute la logistique liée au projet mais aussi pour ta présence à mes côtés pour répondre à mes questions et m'encadrer.

Au docteur Hervé Bogreau,

Merci Hervé pour ton expertise qui permet de se sortir de n'importe quelle situation de laquelle on ne pense jamais sortir !! Tu as été un peu mon MacGyver de la thèse. Merci également pour ta bonne humeur et les petites blagues qui égayent une journée. Merci tout simplement pour ton amitié depuis 15 ans maintenant.

Au docteur Mathieu Nacher,

Merci Mathieu d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de t'être toujours rendu disponible quand j'ai eu besoin de ton aide. Merci également pour tes précieux conseils qui m'ont permis de progresser.

Aux docteurs Romain Girod et Isabelle Dusfour, anciens directeur et directrice adjointe de l'Unité d'Entomologie Médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane,

Merci à tous les deux pour votre accueil si chaleureux au sein de l'UEM où j'ai beaucoup appris sur l'organisation du laboratoire mais aussi lors des échanges en réunion de labo, d'une discussion autour d'un café ou lors des quelques missions que j'ai effectué à vos côtés. La mission capture de moustique à La Cesare restera gravée dans ma mémoire. Vous avez toujours été présents pour m'aider. J'ai adoré passer ces années à l'UEM. Merci de m'avoir intégrée à l'équipe.

Aux docteurs Jean Bernard Duchemin, directeur de l'Unité d'Entomologie Médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane et Mathilde Gendrin qui dirige le groupe G5 "Microbiote des insectes vecteurs",

Merci à tous les deux pour l'accueil et la bonne humeur au laboratoire d'entomologie. Merci pour les réunions de labo et les réunions scientifiques qui m'ont permis d'aiguiser ma curiosité et faire progresser mes connaissances.

Au docteur Lise Musset, directrice du laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane,

Merci Lise de m'avoir accueillie avec plaisir au sein du laboratoire de Parasitologie où j'ai effectué la quasi-totalité des manipulations les trois premières années.

A toute l'équipe du laboratoire d'entomologie de l'IPG : A Mathilde Gendrin, Jean Bernard Duchemin, Jean Isally, Romuald Carinci, Pascal Gaborit, Lanjiao Wang, Amandine Guidez, Yanouk Epelboin,

Merci à vous tous pour les bons moments passés à l'unité. J'ai toujours aimé venir au labo parce que vous étiez là et que travailler avec vous a été un réel plaisir pour moi. Vous avez toujours été présents pour m'aider quand j'en ai eu besoin. Merci à Jean, Romuald et Pascal pour leurs conseils d'experts sur les anophèles. Merci également pour les quelques promos d'élèves de terminale que je vous ai apporté et qui ont été émerveillés de leur visite et de vos explications sur les moustiques (des vocations ont peut-être été trouvées !). Merci à Lan et Amandine pour l'entraide entre doctorantes et les encouragements lorsque les forces faiblissaient. Merci à Yanouk pour les petites pauses café quand les neurones « chauffaient ». Merci également bien sûr pour les restaurants (au cosy 😊) et les gouters en votre compagnie. Je pense aux pains au chocolats, gâteaux maison, galettes... qui ont mis une si bonne ambiance au labo et c'est cette ambiance qui a rendu difficile mon départ.

A Madame Nora Machuré, Provisseure de l'Ecole Nationale de Chimie et Physique et Biotechnologie (ENCPB) de Paris,

Merci, Madame, de m'avoir manifesté votre soutien lors de ma demande de congé de formation et avoir rendu possible que j'y consacre tout mon temps les 4 derniers mois avant ma soutenance.

A Maxime,

Merci Maxime pour m'avoir soutenue en répétant toujours qu'il ne faut jamais abandonner malgré les moments de difficultés. Merci de m'avoir parfois aidé scientifiquement, d'avoir aimé me poser les questions qui me faisaient évoluer dans mon raisonnement, d'avoir toujours été prêt à m'aider et chercher des solutions. Merci également pour l'aide logistique et les sacrifices en temps que cette thèse a demandé. J'espère que ces sacrifices pourront être maintenant mis à profit pour nos futurs projets 😊.

A ma famille et mes amis,

Merci ma sœur Adé et merci mes parents de votre soutien sans faille dans tous les projets que j'entreprends y compris pour celui-ci mais aussi pour les prochains !! Merci à Sarah et son amitié, pour les parties de rigolades qui permettent de surmonter toutes les difficultés. Allez, je te laisse, « faut que j' fasse ma thèse ».

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Abréviations.....	8
Table des illustrations	10
Avant-propos	11
Partie bibliographique	12
1. Le paludisme en Guyane	12
1.1. La Guyane, un département français sur le continent Sud-Américain	12
1.2. Le paludisme, un problème de santé publique en Guyane	13
1.3. Lutte contre le paludisme	15
2. <i>Anopheles darlingi</i> , principal vecteur du paludisme en Guyane	17
2.1. Classification et phylogénie du genre <i>Anopheles</i>	17
2.2. Répartition géographique des espèces d'anophèles vectrices du paludisme en Amérique du Sud et particulièrement en Guyane.....	19
2.3. Bio-écologie d' <i>Anopheles darlingi</i>	20
2.3.1. Morphologie et méthodes d'identification des espèces	20
2.3.2. Cycle de développement des anophèles.....	22
2.3.3. Comportements trophiques et saisonnalité d' <i>Anopheles darlingi</i>	23
2.4. Méthodes de collecte des anophèles adultes	25
2.5. La résistance aux insecticides	27
3. La génétique des populations au service de la lutte antivectorielle.....	29
3.1. Structure génétique des populations : concepts de base.....	29
3.1.1. Calcul des fréquences alléliques d'un échantillon	30
3.1.2. Etude théorique d'un cas idéal.....	30
3.1.3. Influence du régime de reproduction : abandon de la panmixie	30
3.1.4. Influence des pressions évolutives.....	31
3.1.5. Effet Wahlund	32

3.1.6. Mesures de l'écart à la structure de HW : « Statistiques F » de Wright (« F-Statistics »)	32
3.1.7. Déséquilibre de liaison.....	34
3.2. Utilisation des marqueurs microsatellites comme outil pour étudier la structure génétique des populations d' <i>Anopheles darlingi</i>	34
3.3. Tests statistiques utilisés en génétique des populations.....	37
3.3.1. Le principe des permutations	37
3.3.2. Tester la panmixie locale en testant le F_{IS}	38
3.3.3. Tester la structuration en testant le F_{ST}	39
3.3.4. Tester la panmixie globale en testant le F_{IT}	39
3.3.5. Tester les déséquilibres de liaison	39
3.3.6. Correction de Bonferroni.....	40
3.3.7. Cas des allèles nuls.....	40
3.4. Etude de la structure génétique des populations d' <i>Anopheles darlingi</i> en Guyane.....	41
Partie expérimentale	43
1. Structure génétique d' <i>Anopheles darlingi</i> en fonction du mode de piégeage et de l'horaire de capture	43
2. Structure génétique des populations d' <i>Anopheles darlingi</i> en Guyane.....	73
3. Discussion générale	100
Conclusion et perspectives	104
Annexes.....	1066
ANNEXE 1 : Marqueurs microsatellites génotypés.....	1066
ANNEXE 2 : Short Communication in preparation for submission to American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.....	1144
Bibliographie.....	1233

ABREVIATIONS

α : Erreur de type I (ou risque de première espèce)

BG : Biogents

BTP : Bâtiment et Travaux Publics

CA : Carbamate

CAPES : Certificat d'Aptitude au Professorat de l'Enseignement du Second degré

CAPET : Certificat d'Aptitude au Professorat de l'Enseignement Technique

CDC : Centers for Disease Control (Atlanta, Georgia, USA)

CDPS : Centres Délocalisés de Prévention des Soins

CHAR : Centre Hospitalier André Rosemon (Cayenne)

CNR : Centre National de Référence

CNRCP : Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme

CTG : Collectivité Territoriale de Guyane

DAPC : « Discriminant Analysis of Principal Components » = Analyse discriminante en composantes principales

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DL : Déséquilibres de Liaison

DSDS : Direction de la Santé et du Développement Social

EFB : Spécialité Enseignement et Formation en Biotechnologies (Master 2 à finalité Professionnelle)

ELIMALAR : Elimination du paludisme en Guyane

FIS : Indice de fixation (F) des individus (I) dans les sous-populations (S)

FIT : Indice de fixation (F) des individus (S) dans la population totale (T)

FST : Indice de fixation (F) des sous-populations (S) dans la population totale (T)

FAG : Forces Armées de Guyane

FEDER : Fonds européens de développement régional

He : Hétérozygotie espérée

Ho : Hétérozygotie observée

H₀ : Hypothèse nulle (correspond à l'absence d'association statistique entre loci)

H_T : Hétérozygotie espérée (attendue) si on a une panmixie totale

H_s : Hétérozygotie moyenne attendue si on a une panmixie locale

HW : (Equilibre de) Hardy- Weinberg

IPG : Institut Pasteur de la Guyane

IRBA : Institut de Recherche Biomédicale des Armées

ITS2 : « Second internal transcribed spacer »

L1 : larves de stade I

L2 : Larves de stades II

L3 : Larves de stades III

L4 : Larves de stades IV

LBM : Laboratoires de Biologie Médicale

MALDI-TOF MS : « Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry »

MBVB : Mention Microbiologie, biologie végétale et biotechnologie (Master 2 à finalité Professionnelle)

ND4 : NADH déshydrogénase, sous-unité 4

OC : Organochlorés

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONNV : O'Nyong Nyong

OP : Organophosphorés

P-value : « probability value »

Pmax : pourcentage de F_{IS} obtenus supérieurs au F_{IS} observé

Pmin : pourcentage de F_{IS} obtenus inférieurs au F_{IS} observé

PCR : « Polymerase Chain Reaction » = Réaction de polymérisation en chaîne

PIB : Produit Intérieur Brut

PY : Pyréthriinoïdes

RADSeq : « Restriction-site Associated DNA Sequencing »

SDD : Service Départemental de Démoustication

SNP : « Single Nucleotide Polymorphisms »

SSA : Service de Santé des Armées

SSR : « Simple Sequence Repeat »

STL : Sciences et Technologies de Laboratoire

STS : Section de Technicien Supérieur

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Etat actuel des infrastructures de transport en Guyane.

Figure 2. Classification du genre *Anopheles* d'après Harbach, 2016.

Figure 3. Classification de la sous famille *Anophelinae* d'après Foster, 2017.

Figure 4. Répartition des espèces d'anophèles vectrices (du paludisme) dominantes en Amérique du Sud d'après Sinka, 2013.

Figure 5. *Anopheles darlingi* se gorgeant de sang (photographie).

Figure 6. Cycle biologique des anophèles.

Figure 7. Exemple illustrant le phénomène d'homoplasie dû à une variation dans les séquences flanquantes.

Figure 8. Assignation des populations d'*An. darlingi* par site selon les analyses d'inférence bayésienne réalisées avec le logiciel STRUCTURE.

Figure 9. Assignation des populations d'*An. darlingi* par site selon l'analyse discriminante en composantes principales (« Discriminant Analysis of Principal Component » [DAPC]).

AVANT-PROPOS

Pour la partie bibliographique de ce manuscrit, j'ai souhaité tout d'abord faire une brève présentation de la Guyane, lieu de l'étude puis du paludisme puisque c'est cette maladie qui nous a amené à étudier son vecteur, l'anophèle et plus particulièrement *Anopheles darlingi*. Dans une seconde partie, la morphologie et la biologie d'*An. darlingi* seront également présentées. Enfin, j'ai choisi de développer quelques notions de génétiques des populations, c'est-à-dire seulement les notions indispensables à la compréhension des études effectuées dans le cadre de ce travail.

La partie expérimentale présentera ensuite les matériels et méthodes, les résultats et les conclusions des études menées. Deux axes ont été développés et vont donner lieu chacun à une publication.

Un premier axe repose sur une étude méthodologique permettant de déterminer si la méthode de capture (capture sur homme ou MosquitoMagnet® utilisant l'octénol ou le Lurex™ comme attractant) ou l'heure de capture influence la structure des populations d'*An. darlingi*. Cela a permis de préciser si la capture pouvait entraîner un biais d'échantillonnage. En effet, si on capture des populations différentes d'*An. darlingi* lors de l'utilisation de pièges différents ou lorsqu'on capture à des horaires différents, il devient impossible de faire des études de structure génétique excepté avec des moustiques capturés avec le même type de piégeage et à la même heure. De même, il devient impossible de comparer plusieurs études entre elles si elles n'ont pas utilisé le même mode de capture ou le même créneau horaire.

Un second axe est dédié à l'étude, chez *An. darlingi*, de la diversité génétique des populations à l'échelle de la Guyane. L'échantillonnage a été effectué sur 14 sites en Guyane et un site au Suriname répartis selon deux différents faciès écologiques : le littoral et la forêt. Le génotypage a été obtenu pour un total de 1881 individus à l'aide de 8 marqueurs microsatellites. Cette étude permet d'évaluer la structure des populations d'anophèles en Guyane. L'intérêt est de mieux connaître les populations de vecteurs du paludisme sur le territoire et donc de mieux les contrôler dans le cadre de la lutte antivectorielle.

Une étude de génétique des populations sur *An. darlingi* se justifie parce que c'est un vecteur important du paludisme en Amérique du Sud et particulièrement en Guyane. Nous avons besoin de mieux connaître le vecteur afin d'espérer agir sur la transmission des plasmodies.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le paludisme en Guyane

1.1. La Guyane, un département français sur le continent Sud-Américain

La Guyane est un Département français d'Outre-Mer de 83846 km² localisé au Nord-Est de l'Amérique du Sud (sur la côte Atlantique). Quatre-vingt-dix-huit pourcent (98%) du territoire est recouvert de forêt équatoriale (FAO 2010). Elle fait partie du plateau des Guyanes, avec à l'Ouest, le Suriname (ex-Guyane néerlandaise) et le Guyana (ex-Guyane britannique), et à l'Est, l'État de l'Amapá au Brésil. Elle est séparée du Suriname par le fleuve Maroni, et du Brésil par le fleuve Oyapock, ainsi que par les monts Tumuc-Humac au Sud. La Guyane possède un climat équatorial humide. La température moyenne est de 25,5°C. Les températures varient peu au cours de l'année. Les précipitations sont abondantes. On distingue quatre saisons : la grande saison des pluies d'avril à juin, la grande saison sèche de juillet à mi-novembre, la petite saison des pluies de fin novembre à fin février et la petite saison sèche en mars (Meteo France Site Web). Au dernier recensement de 2015, la population comportait 259 865 habitants (Insee 2015) dont 90% vivent sur le littoral. La population est multiethnique : Amérindiens, Créoles (Guyanais et Antillais), Métropolitains, Noirs Marrons, Hmongs (originaires du Laos, arrivés à la fin des années 1970), Chinois et populations issues de migrations de pays d'Amérique et des Caraïbes : Haïti, Brésil, Antilles non francophones. L'activité économique est fortement dépendante de la France métropolitaine. Elle est basée sur le secteur tertiaire principalement (les administrations sont les plus grands pourvoyeurs d'emploi en Guyane) (Insee 2020). Le secteur secondaire est aussi important : le Centre Spatial Guyanais représente 15% du Produit Intérieur Brut (PIB) de la Guyane (Charrier et al. 2017) et le secteur du Bâtiment et Travaux Publics (BTP) profite de la croissance économique du département. Enfin, l'extraction aurifère légale et illégale participe à l'économie locale. L'orpaillage illégal s'accompagne d'insécurité et immigration clandestine. L'Opération Harpie est une opération interministérielle française réalisée en Guyane depuis le mois de février 2008, menée conjointement par les forces de gendarmerie et les Forces Armées en Guyane pour lutter contre l'orpaillage illégal en Guyane. Près d'un millier de militaires participent à cette mission. Le soutien sanitaire est assuré par le Service de Santé des Armées (SSA). Une partie des anophèles utilisés dans le cadre de ce travail a été collectée sur les sites d'orpaillage par le SSA.

La Guyane possède un réseau de transport particulier à cause de l'enclavement des communes éloignées de Cayenne, chef-lieu du département et de la région de Guyane. Le réseau routier relie les villes du littoral entre Saint-Laurent-du-Maroni à la frontière Ouest avec le Suriname et Saint-Georges, à la frontière Est avec le Brésil. Les autres communes sont accessibles par bateau, avion ou hélicoptère (DEAL Guyane 2013) (**Figure 1**).



Figure 1 : Etat actuel des infrastructures de transport en Guyane

Site internet de la DEAL (Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) Guyane
<http://www.guyane.developpement-durable.gouv.fr/le-reseau-routier-national-de-la-guyane>.

Par sa localisation géographique particulière en zone équatoriale et la difficulté d'accès aux soins par une grande partie de la population (Duplan et al. 2014), la Guyane présente un vaste éventail de pathologies infectieuses. De nombreuses pathologies tropicales sont présentes sur un mode endémique et/ou épidémique : leishmaniose, maladie de Chagas, histoplasmosse, dengue, chikungunya, Zika mais aussi paludisme (Epelboin et al. 2015).

1.2. Le paludisme, un problème de santé publique en Guyane

Le paludisme est un problème de santé publique majeur dont l'agent responsable est un protozoaire du genre *Plasmodium*. Les statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estiment qu'environ 228 millions de personnes ont été affectées par le paludisme en 2018 dans le monde et environ 405 000 en sont décédées (WHO 2019). La Guyane est un département français où le paludisme reste endémique (Mosnier et al. 2020). Il existe actuellement 6 espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'Homme : *P. ovale* et *P. knowlesi* qui ne sont pas présents sur le territoire guyanais (Petit-Sinturel et al. 2016), *P. simium*, de découverte récente, après un cas

confirmé au Brésil (zoonose transmise à l'homme après piqûre accidentelle) (Brasil et al. 2017), *P. malariae* qui a toujours été présent en minorité en Guyane. *P. malariae* représentait 1,5% des résultats positifs en 1954 (recherche d'hématozoaires) (Floch 1954) et a été identifié sur un cas autochtone pour la dernière fois en 2011 (Petit-Sinturel et al. 2016). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux 2 espèces présentes principalement en Guyane : *P. falciparum* et *P. vivax*. Entre 1942 et 1949, l'indice plasmodique, défini comme le pourcentage de porteurs de *Plasmodium* dans la population examinée, était important : environ 26,1%. Quatre-vingt pourcent (80%) des recherches d'hématozoaires étaient positives à *P. falciparum* et 20% à *P. vivax* et le niveau de mortalité se maintenait au-dessus de 600 décès/an (Floch 1954; Juminer et al. 1981). En 1952, suite aux premières pulvérisations de DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT) de 1949, l'indice plasmodique était tombé à 0,8% (Floch 1954; Juminer et al. 1981). Dans les années 70 (de 1970 à 1979), l'indice plasmodique était de 2,7% avec une prévalence de 84% de *P. falciparum* (Juminer et al. 1981). Les années 80 ont vu les cas de paludisme augmenter pour diverses raisons, par exemple, refus des aspersion intradomiciliaires d'insecticides par la moitié des habitants et efficacité limitée des traitements larvicides (Mouchet et al. 1989), pour atteindre une incidence de 37,6 cas/1000 en 1987 avec une prévalence de 100% de *P. falciparum* sur le Maroni et de 70% sur l'Oyapock (où 30% des affections étaient dues à *P. vivax*) (Lepelletier et al. 1989). Cette augmentation du nombre de cas répertoriés de paludisme plaça la Guyane dans les années 90 dans le trio de tête avec le Guyana et le Suriname des pays impaludés d'Amérique avec des taux d'incidence annuelle supérieurs à 100 cas/1000 (Pan American Health Organization 1996). Le nombre moyen d'accès palustres notifiés a été pour la période 2000 - 2007 de 3 810 cas/an avec une répartition équilibrée entre *P. vivax* et *P. falciparum* (Carme et al. 2009). Ensuite, le nombre de cas de paludisme à *P. vivax* a dépassé celui dû à *P. falciparum* pour devenir en 2012, responsable de 70% des cas de paludisme en Guyane (Musset et al. 2014). Aujourd'hui, la plupart des cas surviennent chez les clandestins immigrés travaillant sur les sites d'orpaillage illégal ou chez les militaires intervenant sur ces sites dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage (Opération Harpie) (Pommier de Santi et al. 2016a; Pommier de Santi et al. 2016b).

En 2018, la situation s'est nettement améliorée : 546 cas de paludisme ont été recensés dont 10% dus à *P. falciparum* (Rousseau 2019). La situation au sein du département est hétérogène, avec des lieux présumés de contamination identifiés en 2018 localisés sur les communes de Kourou, Maripasoula, St Georges, Régina, Roura, Saül et Macouria (Rousseau 2019). En Guyane, le paludisme est donc une maladie prioritaire pour laquelle un dispositif de surveillance spécifique est fonctionnel toute l'année impliquant l'Institut Pasteur de la Guyane (IPG) dont le laboratoire de parasitologie est le Centre National de Référence (CNR) du paludisme, le Centre Hospitalier André Rosemon (CHAR Cayenne), le Centre Hospitalier Ouest Guyanais (Saint-Laurent-Du-Maroni), les Postes et Centres Délocalisés de Prévention des Soins (CDPS) (Maripa Soula, Régina, Saint Georges, Camopi), certains Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) et le Service de Santé des Forces Armées de Guyane (FAG). Le projet Elimination du paludisme en Guyane (ELIMALAR) a également été lancé en 2017. Il est financé par les fonds européens de développement régional (FEDER), l'Agence Régionale de Santé (ARS) Guyane, l'IPG et le CHAR en lien avec l'OMS. ELIMALAR a pour but d'évaluer la pertinence des approches et des outils mis en place pour mieux lutter contre le paludisme.

1.3. Lutte contre le paludisme

La lutte contre le paludisme peut se faire à plusieurs niveaux y compris au niveau du vecteur. C'est ce point qui nous intéresse particulièrement car la lutte antivectorielle peut influencer les populations d'anophèles.

- Chimio prophylaxie en zone d'endémie : atovaquone-proguanil (Malarone®) ou doxycycline (Doxypalu®) (ARS 2015).
- Traitement des malades : pour le traitement des cas de paludisme à *P. falciparum* en Guyane, il est recommandé d'utiliser une combinaison d'artéméter/luméfantrine (Riamet® en France [donc en Guyane], Coartem® dans le reste de l'Amérique du Sud) précédé d'artésunate (Malacef®) en intraveineux pour les cas graves. Le traitement à la chloroquine (Nivaquine®) suivie de primaquine est recommandé pour le traitement des cas à *P. vivax* (HCSP 2017).
- Prévention individuelle des piqûres de moustiques (utilisation de répulsifs cutanés, vêtements larges et couvrants).
- **Lutte antivectorielle collective** : pulvérisation intradomiciliaire de pyréthrinoïdes (insecticide) par le Service Départemental de Démoustication (SDD) de la Collectivité Territoriale de Guyane (CTG), distribution de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes dans les zones endémiques par la Direction de la Santé et du Développement Social (DSDS) de la Guyane, lutte antilarvaire (utilisation de *Bacillus thuringiensis*) ou destruction des gîtes larvaires (élimination des collections d'eau, curages de canaux et fossés) (Musset et al. 2014). Il est important de prendre en compte la lutte antivectorielle dans notre étude puisqu'elle agit sur les populations de moustiques.
- **Surveillance entomologique** : elle est faite en Guyane par l'unité d'entomologie médicale de l'IPG qui réalise d'une part, des études visant à améliorer les connaissances sur les modalités de la transmission vectorielle du paludisme afin de proposer des outils pour la surveillance entomologique et la lutte antivectorielle et d'autre part des expertises permettant de documenter des situations épidémiologiques lors de la survenue de phénomènes épidémiques : identification des gîtes larvaires, des espèces, mesure des taux d'infection des anophèles, suivi des densités, de la saisonnalité, de la résistance aux insecticides (ARS 2015). Une partie des moustiques utilisés pour ce travail ont été récupérés dans le cadre de la surveillance entomologique réalisée par l'IPG.
- Surveillance parasitologique : elle est réalisée par le Laboratoire de parasitologie de l'IPG qui héberge le CNRCP (Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme). Il a pour rôle d'organiser la collecte d'échantillons depuis les centres et postes de santé présents sur le département, les hôpitaux et les laboratoires d'analyses médicales afin de suivre l'évolution des résistances de *P. falciparum* et *P. vivax* aux antipaludiques (ARS 2015). En effet, comme partout dans le monde, la sensibilité des *Plasmodium* aux médicaments évolue en Guyane en fonction des traitements utilisés et complique la lutte contre le paludisme.

Dans le cadre de cette lutte, la Guyane doit également prendre en compte une spécificité locale : les sites d'orpaillage illégal. En pleine forêt, l'activité aurifère clandestine attire de nombreux migrants étrangers (Brésiliens principalement). Sur ces sites d'orpaillage concourent le réservoir, le vecteur et les conditions socio-environnementales qui favorisent le maintien, l'intensification ou la réinstallation de la

transmission locale du paludisme. En effet, la mobilité des populations entretient l'endémie. S'ajoute à ce facteur l'absence d'accès à la prévention et aux soins, en particulier concernant le paludisme, l'automédication des orpailleurs et le non-respect des durées de traitement (favorisant eux-mêmes l'émergence de résistance aux antipaludiques) (Pommier de Santi et al. 2016a; Pommier de Santi et al. 2016b; Douine et al. 2017).

Pour conclure, le paludisme étant toujours aujourd'hui un problème de santé publique en Guyane, il paraît fondamental d'étudier son vecteur principal localement : *An. darlingi*.

2. *Anopheles darlingi*, principal vecteur du paludisme en Guyane

Les anophèles sont des vecteurs du paludisme mais ils hébergent également de nombreux virus, y compris ceux susceptibles de provoquer une maladie fébrile s'ils sont transmis à l'homme comme le virus O'Nyong Nyong (ONNV), le virus de la Fièvre de la vallée du Rift, le virus West Nile, le virus de l'encéphalite japonaise, le virus Tataguine (Nanfack Minkeu et Vernick 2018). Les anophèles peuvent aussi transmettre un ver parasite du genre filaire : *Wuchereria bancrofti* (filiaire de Bancroft) (Ullah et al. 2020). Cependant en Guyane, seuls des cas de paludisme ont été rapportés. Nous allons tout d'abord situer *An. darlingi* au sein de la phylogénie des anophèles.

2.1. Classification et phylogénie du genre *Anopheles*

La famille des Culicidae (moustiques) comprend un important groupe de 3546 espèces formellement reconnues et distribuées dans le monde dans des régions tempérées ou tropicales. Les espèces sont classées en 2 sous-familles, Anophelinae (485 espèces) et Culicinae (3061 espèces) (Harbach et Kitching 2016). La classification de la sous-famille des Anophelinae reste un sujet de controverses (Foster et al. 2017).

Par exemple, pour l'équipe de Harbach *et al.* cette sous-famille comprend 3 genres : *Anopheles* (cosmopolite, 472 espèces), *Bironella* (australasienne, 8 espèces) et *Chagasia* (néotropicale, 5 espèces). Le genre *Anopheles* comprend 8 sous-genres (définis morphologiquement à partir des adultes, des larves de quatrième stade et de la nymphe) : *Anopheles* sensu stricto (s.s.) (cosmopolite, 185 espèces), *Baimaia* (orientale, 1 espèce), *Cellia* (Ancien monde, 224 espèces), *Christya* (Afrique subsaharienne, 2 espèces), *Kerteszia* (néotropicale, 12 espèces), *Lophopodomyia* (néotropicale, 6 espèces), *Nyssorhynchus* (néotropicale, 39 espèces) et *Stethomyia* (néotropicale, 5 espèces) (Harbach et Kitching 2016; "http://mosquito-taxonomic-inventory.info") (**Figure 2**).

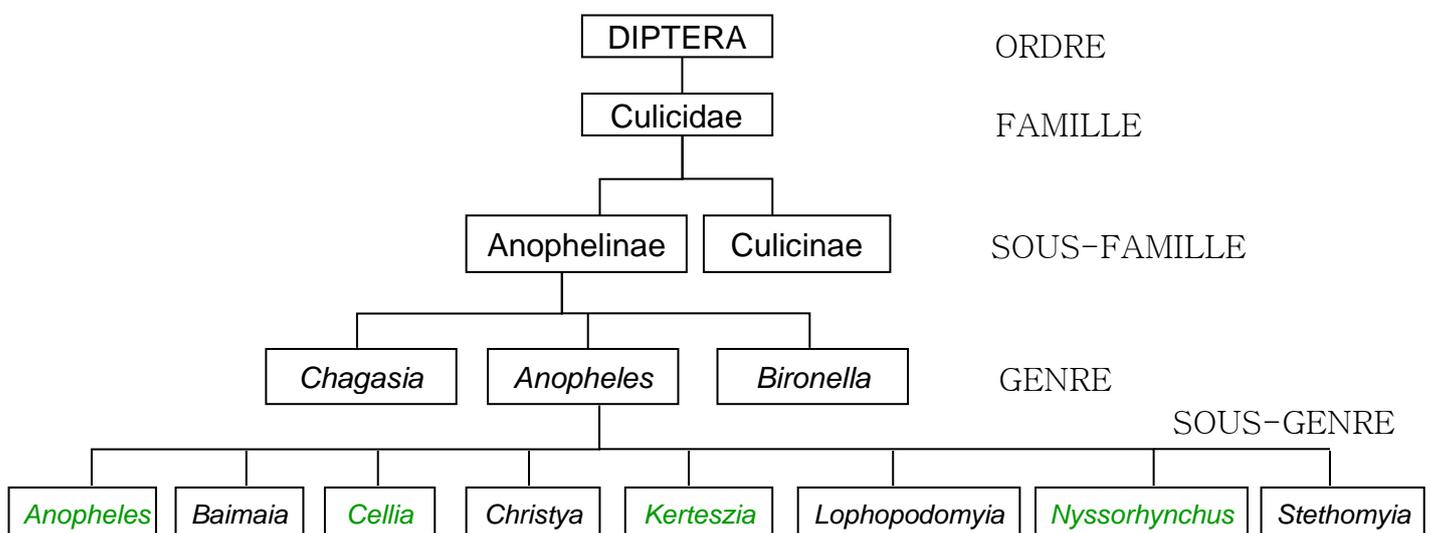


Figure 2 : Classification du genre *Anopheles* d'après Harbach, 2016.

En vert : sous-genres contenant des espèces vectrices du paludisme humain

L'année suivante, l'équipe de Foster *et al.* propose de modifier la classification après analyse de la séquence de 13 protéines codées par le génome mitochondrial. Pour cette équipe :

- *Bironella* doit être placé à l'intérieur du genre *Anopheles*,
- Les sous-genres *Kerteszia*, *Lophopodomyia*, *Nyssorhynchus* et *Stethomyia* doivent être élevés au niveau de genre,
- Le genre *Anopheles* garde les 4 sous genres *Anopheles*, *Baimaia*, *Cellia* et *Christya*,
- Le genre *Nyssorhynchus* inclut 2 sous genres : *Myzorhynchella* et *Nyssorhynchus*.

La classification suivante est proposée (Foster *et al.* 2017) (**Figure 3**) :

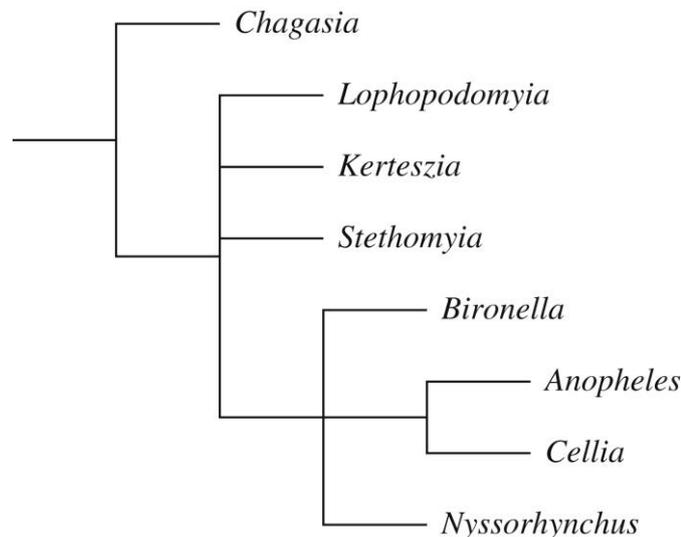


Figure 3 : Classification de la sous famille Anophelinae d'après Foster, 2017.

Sur les 472 espèces que comporte le genre *Anopheles*, environ 41 sont des vecteurs efficaces du paludisme humain (Foster *et al.* 2017). Elles appartiennent toutes à 4 sous-genres du genre *Anopheles* : *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* et *Nyssorhynchus* (Harbach 2013) (**Figure 2**). *Anopheles darlingi* appartient au sous-genre *Nyssorhynchus*. *Anopheles darlingi* a été décrit pour la première fois par Root sur des critères morphologiques des œufs, de la larve de stade 4, de la nymphe et des adultes mâles et femelles (Root 1926). *Anopheles darlingi* a toujours été considéré comme une espèce monophylétique jusqu'à Emerson *et al.* qui ont trouvé 3 clusters génétiquement différents au Brésil et ont proposé l'hypothèse qu'il s'agit de trois espèces putatives qui se sont créées suite à l'émergence des barrières géographiques que représentent les Andes, les fleuves Amazone/Solimões et les montagnes côtières de l'est du Brésil qui ont créé des zones biogéographiques différentes (Emerson *et al.* 2015).

Afin d'étudier les échanges et flux de gènes entre les populations d'*An. darlingi*, la distribution de cette espèce sur le continent Sud-Américain est à considérer.

2.2. Répartition géographique des espèces d'anophèles vectrices du paludisme en Amérique du Sud et particulièrement en Guyane

En Amérique du Sud, il y a 9 espèces vectrices dominantes : *An. albimanus*, *An. albitarsis* sensu lato (s.l.), *An. aquasalis*, *An. darlingi*, *An. freeborni*, *An. marajoara*, *An. nuneztovari* s.l., *An. pseudopunctipennis* et *An. quadrimaculatus* s.l. (Sinka et al. 2012). *Anopheles darlingi* est réparti sur une largeur allant du Venezuela au 2/3 du Brésil, comme indiqué en rouge sur la **Figure 4**.

Cependant, au sein de ce « bandeau rouge », les études les plus récentes sur la répartition d'*An. darlingi* en Amérique du Sud montrent :

- Dans l'état de Rio de Janeiro au Brésil (municipalité de Cachoeiras de Macacu) : une prédominance d'*An. albitarsis* (49,1%) mais aucun *An. darlingi* (Jules et al. 2019).
- Dans l'état de Maranhão au Nord-Est du Brésil : une prédominance d'*An. argyritarsis* et moins de 1% d'*An. darlingi* (Silva et al. 2019).

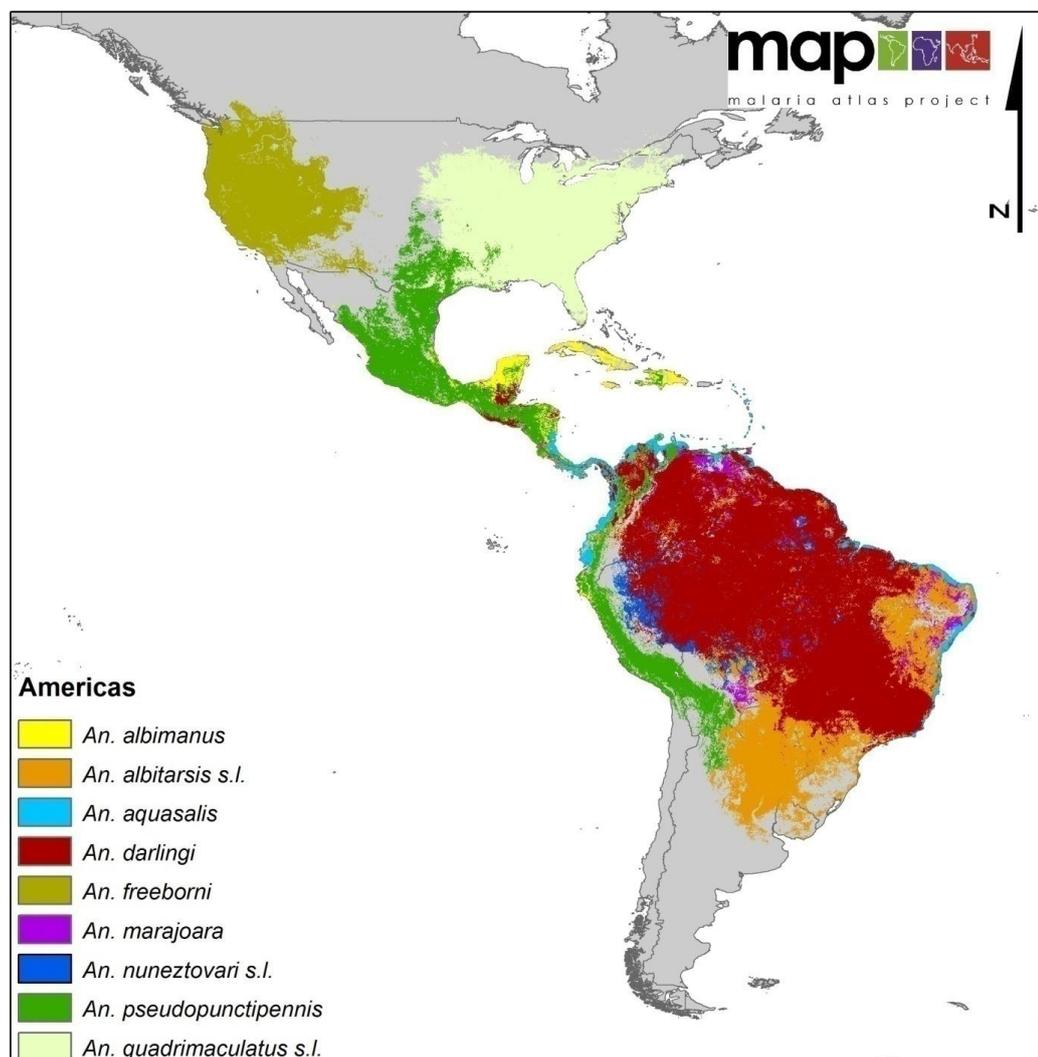


Figure 4 : Répartition des espèces d'anophèles vectrices (du paludisme) dominantes en Amérique du Sud d'après Sinka, 2013 (Sinka 2013).

En Guyane, 22 espèces du genre *Anopheles* sont présentes (vectrices ou non) (Talaga et al. 2015) mais *An. darlingi* est le vecteur principal du paludisme en Guyane depuis 60 ans à cause de sa large distribution, son comportement anthropophile, la densité de sa population et son taux d'inoculation entomologique (Floch 1954 ; Dusfour et al. 2013). Le fait qu'*An. darlingi* soit un bon vecteur du paludisme en Guyane a été illustré par Adde *et al.* qui ont montré, à Saint Georges (embouchure du fleuve Oyapock), qu'une augmentation de la densité des moustiques *An. darlingi* a été suivie par une augmentation des cas de paludisme deux mois plus tard (Adde et al. 2017). Des vecteurs secondaires sont également présents comme *An. marajoara*, de découverte plus récente sur le territoire guyanais, qui est impliqué dans la transmission du paludisme sur certains sites d'orpaillage clandestin en milieu forestier (Dusfour et al. 2012a). *Anopheles oswaldoi*, *An. intermedius* et *An. nuneztovari* ont été également retrouvés porteurs de *Plasmodium* et donc confirmés comme vecteurs du paludisme (Dusfour et al. 2012b) ainsi qu'*An. ininii* et *An. nuneztovari* sur des sites d'orpaillages avec des taux d'infections respectifs de 12,5% et 5% (taux les plus élevés jamais relevés en Guyane) (Pommier de Santi et al. 2016a).

Pour cette étude de la diversité génétique, le choix a donc été fait de se concentrer sur l'espèce *An. darlingi*, principal vecteur du paludisme en Guyane. Cependant, avant de débiter la partie sur la génétique des populations, il paraît opportun de présenter la bio-écologie de ce vecteur afin de mieux comprendre, par la suite, son comportement et d'avoir un support pour discuter des flux de gènes éventuellement observés.

2.3. Bio-écologie d'*Anopheles darlingi*

2.3.1. Morphologie et méthodes d'identification des espèces

Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète (insectes holométaboles) de sorte que l'adulte, la larve et la nymphe ont des morphologies très différentes. Les larves n'ont pas de pattes et un thorax relativement gros. Elles vont subir 3 mues et donc passer par 4 stades larvaires. La nymphe, mobile, est composée par une tête et un thorax qui forment un céphalothorax volumineux auquel fait suite un abdomen de 10 segments (dont 8 sont bien visibles), terminé par 2 palettes natatoires. L'adulte adopte généralement au repos une position oblique par rapport au support les différenciant facilement des autres *Culicinae* qui se positionnent parallèlement au support (**Figure 5**). L'adulte comporte trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen. Les mâles ont des antennes avec des soies longues et plumeuses. Les femelles ont des antennes avec des soies verticillées, courtes et moins fournies que celles des mâles, ce qui permet déjà de différencier mâle et femelle au premier coup d'œil (pour un œil averti !). Les mâles possèdent un appareil buccal de type suceur (qui se nourrissent de jus sucré, nectar de fleurs, sève, etc.) et les femelles en possèdent un de type vulnérant (permettant de se nourrir de jus sucré comme les mâles mais aussi de sang car elles sont hématophages). Le thorax porte 1 paire d'ailes et 3 paires de pattes chacune formée de 9 parties successives articulées. Les pattes

peuvent porter de nombreuses écailles dont l'ornementation est utilisée en systématique. Afin de distinguer les anophèles des autres culicidés, on regarde la longueur des palpes : aussi long que le proboscis (qui est l'appareil piqueur) pour les anophèles alors que les palpes sont plus courts que le proboscis chez tous les autres genres. L'abdomen comprend 10 segments dont au moins 7 sont bien visibles. Il porte également des écailles, en nombre variable, qui sont utilisées pour la détermination de l'espèce. C'est dans l'abdomen que sont situés l'intestin moyen (= estomac) et les deux ovaires qui vont fortement grossir au cours du cycle gonotrophique chez la femelle.

Il existe de nombreuses possibilités pour l'identification des anophèles : méthodes morphologiques, biométriques, écologiques, cytogénétiques, iso-enzymatiques ou moléculaires (réaction en chaîne par polymérase, soit « Polymerase Chain Reaction », [PCR] notamment) (Carnevale et Robert 2009). A l'IPG, les moustiques *An. darlingi* sont identifiés jusqu'à aujourd'hui morphologiquement par clé dichotomique (Floch et Abonnenc 1951; Forattini 1962; Faran et Linthicum 1981) mais peuvent l'être désormais aussi par spectrométrie de masse (« Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry » (MALDI-TOF MS)), nouvelle méthode qui permet de distinguer plusieurs espèces d'anophèles présentes en Guyane (Briolant et al. 2020).



Figure 5 : Anopheles darlingi se gorgeant de sang.

Auteur : R. Carinci, Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de la Guyane

2.3.2. Cycle de développement des anophèles

Le cycle biologique des anophèles est caractérisé par la succession de deux phases : la première est aquatique et recouvre la vie pré-imaginale, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe. La seconde est aérienne et concerne l'adulte, ou imago (**Figure 6**).

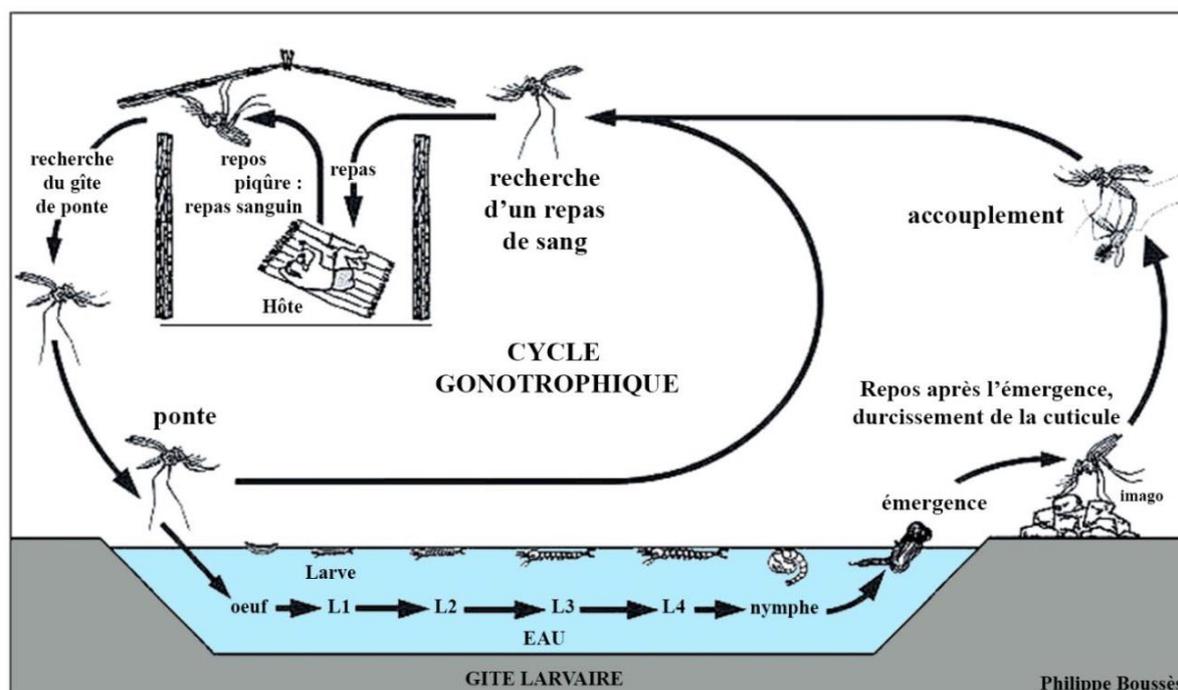


Figure 6 : Cycle biologique des anophèles.
D'après Carnevale et Robert (Carnevale et Robert 2009).

Les anophèles femelles pondent 50 à 300 œufs fécondés à la surface de l'eau. Ces œufs mesurent environ 0,5 mm. Ils sont pondus isolément, sont munis de flotteurs latéraux et restent donc en surface durant l'embryogénèse. Sous des conditions favorables de température, l'incubation des œufs dure deux à trois jours (Carnevale et Robert 2009). *Anopheles darlingi* se reproduit préférentiellement dans de grandes collections d'eau profonde et claire comme les lacs, les marécages ou les grandes rivières. Les conditions larvaires adéquates seraient une combinaison d'ombre et de lumière directe du soleil, avec une température de 20 à 28°C et un pH de 6,5 à 7,3 (Hiwat et Bretas 2011). Après éclosion, les œufs donnent naissance aux larves de stade I (L1) mesurant environ 1 mm qui vont évoluer par 3 mues successives pour donner des larves de stades II (L2), III (L3) et IV (L4), ces dernières mesurant de 12 à 15 mm. Les larves se nourrissent en filtrant les particules dans l'eau (levures, bactéries, microplancton, microalgues). La larve L4 subit ensuite la métamorphose complète pour donner une nymphe mobile qui ne s'alimente pas (nympheose) (Carnevale et Robert 2009). La durée de vie larvaire est variable selon les espèces et les conditions de température. A la température de 24 °C, la durée du développement larvaire est d'environ 18 jours pour *An. darlingi*. Cependant, elle diminue quand la température augmente et est allongée quand cette dernière diminue (Chu et al. 2019). La nymphe va être l'objet de remaniements internes importants pour se transformer en un adulte mâle ou femelle qui s'envolera rapidement dès que ses ailes auront séché. L'émergence a lieu à la surface du plan d'eau et ne dure que quelques minutes.

C'est au cours de la phase aérienne que s'effectue l'insémination de la femelle néonate (2ème ou 3ème jour). Au moment de l'accouplement, les mâles forment des essaims généralement au crépuscule. La copulation, de courte durée (quelques secondes), peut se dérouler entièrement en vol ou bien commencer en vol et se poursuivre au sol. En règle générale, les femelles d'anophèles ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur vie. Les spermatozoïdes sont stockés dans un réceptacle, la spermathèque, d'où ils sortent pour féconder les ovocytes au moment de la ponte. Ils conservent leur pouvoir fécondant pendant plusieurs semaines, jusqu'à la mort de la femelle. Mâles et femelles se nourrissent de jus sucré, plus souvent le nectar des plantes, afin de satisfaire leurs besoins énergétiques pour le vol et maintenir les processus métaboliques (Carnevale et Robert 2009).

Pour assurer la survie de l'espèce, les femelles ont besoin de prendre du sang car les protéines du sang sont une source d'acides aminés nécessaires au développement des œufs. De ce fait, seule la femelle est hématophage : un repas sanguin n'est pas indispensable à sa survie, mais il l'est à la maturation ovarienne. La succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez la femelle entre deux repas de sang successifs constitue le cycle gonotrophique. Il est composé de trois phases : 1) recherche de l'hôte et prise du repas de sang, 2) digestion du sang et maturation des follicules ovariens et 3) recherche du lieu de ponte par la femelle gravide et ponte sur l'eau (oviposition) (Carnevale et Robert 2009). La durée du cycle gonotrophique est d'environ 48h pour *An. darlingi* (Roberts et al. 1983). Cette espèce prend au moins deux repas de sang au cours de son premier cycle gonotrophique (De Oliveira et al. 2012). La longévité des anophèles femelles adultes est d'une vingtaine de jours, guère plus d'un mois dans les conditions habituelles. Elle est plus réduite pour le mâle. La durée de vie des adultes (ainsi que leur taille) diminue plus la température augmente (Chu et al. 2019). La dispersion moyenne des *An. darlingi* adultes en vol à partir des gîtes larvaires est de l'ordre de 1,5 à 2 km, pouvant atteindre 5 km (Hiwat et Bretas 2011). Cette dispersion active est utile à connaître pour faire des hypothèses sur les flux de gènes. Mais il existe aussi une dispersion passive (qui peut accroître la dispersion active) : c'est la dispersion liée aux facteurs environnementaux (comme le vent) et humains (comme les réseaux de transport routier et fluviaux) (Carnevale et Robert 2009). En Guyane, aucune étude de dispersion passive sur *An. darlingi* n'a été faite. Pour étudier les flux de gènes, nous pourrions cependant nous appuyer sur les connaissances du réseau local de transport existant (**Figure 1**).

2.3.3. Comportements trophiques et saisonnalité d'*Anopheles darlingi*

Cette espèce colonise facilement des habitats aux caractéristiques écologiques diverses (Laporta et al. 2015; Alimi et al. 2015). Elle possède une plasticité phénotypique (combinée à une variation génétique) qui lui permet une adaptation à une gamme étendue de conditions écologiques (Chu et al. 2019).

Anopheles darlingi présente une importante plasticité concernant le comportement de piqûre (heure et lieu des piqûres, choix de l'hôte) en réponse aux conditions environnementales locales (Conn et Ribolla 2016). En Guyane, le pic d'agressivité a lieu au crépuscule (18h à 22h) sur le littoral et le Maroni mais un peu plus tard sur l'Oyapock (21h30-3h30) avec, dans tous les cas, un second pic à l'aube (5 à 7h), les

femelles paires piquant davantage en fin de nuit (5 à 7h du matin) (Girod et al. 2008; Dusfour et al. 2013; Vezenegho et al. 2016). Cependant, des piqures peuvent aussi avoir lieu en journée (Pommier de Santi et al. 2017). Dans les zones tropicales, la croissance des anophèles est continue tout au long de l'année, avec des variations saisonnières de densité liées aux conditions climatiques (Hiwat et Bretas 2011). Concernant *An. darlingi* en Guyane, les fluctuations saisonnières de densité existent selon les zones géographiques. Sur le fleuve Maroni (frontière Ouest, avec le Suriname) à Twenké et Loka en 1998 et 1999, *An. darlingi* a présenté un comportement de piqûre très différent selon le site et selon l'année : les taux les plus importants de piqûres ont eu lieu toute l'année à Twenké avec une forte variation entre les deux années alors que le pic a eu lieu entre juin et août à Loka (Fouque et al. 2010). Cependant, entre 2000 et 2002 à Twenké, Taluen et Cayodé (3 villages sur le fleuve Maroni), le pic de densité était situé entre avril et juin (saison des pluies) (Girod et al. 2008) tout comme sur le fleuve Oyapock (à Camopi) (frontière Est, avec le Brésil) (Girod et al. 2011). Sur le littoral, à Macouria, le pic se situe en septembre (saison sèche) (Vezenegho et al. 2015) tout comme à Saint Georges (embouchure du fleuve Oyapock) où il se situe entre septembre et novembre (saison sèche) (Adde et al. 2017). Ces différences de densité saisonnière d'*An. darlingi* selon la zone géographique ont été relevées ailleurs en Amérique du Sud et plusieurs études ont essayé de l'expliquer :

- Giglioli et al. ont montré que les pluies augmentent la disponibilité des sites de reproduction (Giglioli 1938) et des pics d'abondance d'*An. darlingi* pendant la saison des pluies ont été signalés en Amérique du Sud ailleurs qu'en Guyane (Elliott 1968; Tineo et al. 2003; Leon et al. 2003). Ceci pourrait expliquer le pic de densité en saison des pluies sur le Maroni et à Camopi en Guyane.
- Forattini et al. (Forattini 1987) ont trouvé une plus grande densité d'*An. darlingi* pendant les mois chauds du Sud du Brésil. La survenue de fortes pluies pourrait inonder les lieux de reproduction et créer des courants de crue qui emportent les larves (le gîte larvaire est lessivé). Cela a également été constaté par Pajot et al. (Pajot et al. 1977) en Guyane qui ont découvert que de fortes pluies sont suivies d'une diminution et parfois d'une absence totale d'*An. darlingi*. Ce mécanisme peut provoquer une augmentation de la densité d'*An. darlingi* pendant la saison sèche ou pendant la période de transition entre la saison sèche et la saison des pluies (Forattini 1987; Charlwood 1980). Ceci pourrait expliquer le pic de densité en saison sèche à Macouria et Saint Georges en Guyane.
- Gil et al. (Gil et al. 2007) font une différence entre les zones fluviales et les zones sèches : Dans les zones sèches (comme à Macouria en Guyane), les rivières peuvent inonder les marges pendant la saison des pluies, mais le fort débit d'eau empêchera une reproduction réussie. Ce n'est qu'après la fin des pluies, lorsque les rivières ont retrouvé leur taille d'origine, que les sites de reproduction prennent naissance en tant que grandes collections d'eau stables laissées dans des zones auparavant inondées. Il en résulte des densités élevées de moustiques au début de la saison sèche. En revanche, dans les zones fluviales, les niveaux d'eau des principaux fleuves augmentent considérablement pendant la saison des pluies, en raison du drainage des affluents. Non seulement les bords de la rivière, mais des zones forestières complètes peuvent être inondées, créant des sols forestiers inondés avec un faible débit d'eau qui servent

d'excellents sites de reproduction pour *An. darlingi*. Les densités importantes de moustiques se trouveront pendant la saison des pluies, diminuant au début de la saison sèche, lorsque les sols forestiers inondés s'assèchent. C'est ce qu'il se passe sur le Maroni et à Camopi, zones fluviales. Cela n'explique cependant pas le cas de Saint Georges, zone fluviale (embouchure du fleuve Oyapock) où le pic de densité est en saison sèche.

Ces différences dans les paramètres écologiques permettent d'avoir des éléments de réflexion pour faire des hypothèses sur les deux modèles saisonniers différents relevés en Guyane.

Anopheles darlingi est décrite comme hautement anthropophile (Floch 1954). Cependant, des études ont montré que cette espèce se nourrit de sang humain mais aussi de Galliformes, de chiens, de porcs et de chèvres, et que 30% des moustiques se nourrissent de plus d'un type d'hôte (Moreno et al. 2017), l'homme restant l'hôte principal suivi des Galliformes et de la vache (Saavedra et al. 2019). Le comportement exophagique (pique à l'extérieur des maisons) ou endophagique (pique à l'intérieur des maisons) d'*An. darlingi* varie selon les comportements humains, les conditions environnementales et les méthodes de lutte antivectorielle (Prussing et al. 2018; Rosas-Aguirre et al. 2015; 2016; Prussing et al. 2018). Des études ont montré qu'*An. darlingi* préfère piquer à l'extérieur des maisons (comportement exophagique) (Gil et al. 2003; Vezenegho et al. 2016; Hiwat et al. 2011; Rozendaal 1989), bien qu'un comportement endophagique ait aussi été relevé (Roberts et al. 2002; Shannon 1933; Galvão et al. 1942; Deane et al. 1948). Quant au comportement endophile (la femelle reste à l'intérieur de la maison au repos après le repas de sang) ou exophile (au repos à l'extérieur des maisons), les études récentes ont relevé qu'*An. darlingi* est plutôt exophile (Deane et al. 1948; Charlwood 1996; Girod et al. 2008; Hiwat et Bretas 2011; Moutinho et al. 2011; Vezenegho et al. 2016), contrairement à ce qui avait été observé il y a plus de 50 ans (Floch 1954), peut-être en raison de l'utilisation d'insecticides intradomiciliaires (Akhavan et al. 1999) et de distribution de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes.

La surveillance entomologique permet de mieux connaître la bio-écologie du vecteur afin de mieux définir les stratégies de lutte antivectorielle. Pour cela, la première étape repose sur la collecte d'anophèles.

2.4. Méthodes de collecte des anophèles adultes

Nous nous intéresserons ici à la collecte d'anophèles adultes car seule la capture d'adultes a été réalisée pour ces travaux. Une collecte de larves d'anophèles est aussi possible mais ne sera pas développée ici.

Les méthodes de collectes d'anophèles adultes sont très nombreuses. Il est possible de capturer des femelles au repos (exophiles ou endophiles) ou des femelles agressives, c'est-à-dire à la recherche d'un repas de sang (première phase du cycle gonotrophique). Pour ce travail, nous n'avons réalisé que des captures de femelles agressives. La capture peut être directe, c'est la capture sur homme (« Human Landing Catch »), ou indirecte à l'aide de pièges.

La capture sur homme reste pour l'instant la méthode de référence pour évaluer à la fois le taux de piqûre et le taux d'infection des anophèles, paramètres indispensables à l'évaluation du taux d'inoculation entomologique (WHO 2013). Chaque captureur dispose d'une lampe torche et son habileté est requise pour attraper avec un tube ou avec un aspirateur à bouche tous les moustiques qui viennent se poser sur ses jambes dénudées (attractivité naturelle). Plus rarement, cette méthode utilise comme appât un animal. Il n'est pas nécessaire de laisser les moustiques piquer ; idéalement, le moustique tout juste posé est capturé avant la piqûre. Mais il y a des objections éthiques à ce type de capture à cause de la mise en contact des captureurs avec un moustique potentiellement infecté. Un autre problème se pose : les captureurs possèdent une attractivité propre. Ce type de capture ne permet pas une standardisation de la méthode car il entraîne une variabilité interindividuelle (Service 1977). Un moyen de s'affranchir de ce biais est d'effectuer les captures en carré latin avec différents captureurs pour tenir compte de l'hétérogénéité interindividuelle mais aussi spatiale. C'est pour cette raison qu'un carré latin a été mis en place lors de nos captures de moustiques à Saint Georges.

Les pièges « appâtés » utilisés pour la capture de moustiques vont utiliser des signaux naturels, synthétiques, physiques ou visuels. Par exemple, les doubles moustiquaires (avec un appât humain) ou les pièges lumineux CDC (Centers for Disease Control), les pièges BG sentinel[®] (Biogents) ou les pièges Mosquito Magnet[®] qui reproduisent des attractants humains en combinant des composés synthétiques, des attractifs physiques et visuels (molécules volatiles appelées kairomones, lumière, couleur, chaleur, émission de CO₂) pour capturer mécaniquement les insectes (Pereira Lima et al. 2014). Les moustiques obtenus par ce type de capture sont des moustiques agressifs. Les moustiques utilisés pour ces travaux ont été capturés par ce type de pièges ainsi que par capture sur homme.

Il existe également des pièges de sorties pour capturer les moustiques. Ces dispositifs autorisent le passage d'un moustique en vol dans un sens mais s'opposent au retour dans le sens inverse. Ces pièges sont disposés aux passages utilisés habituellement par les moustiques pour sortir des maisons : portes, fenêtres, vérandas. Ils n'ont pas été utilisés pour capturer les moustiques des travaux présentés ici.

La meilleure alternative à la capture sur homme reste continuellement recherchée et discutée (Briet et al. 2015; Gama et al. 2013; Vezenegho et al. 2014; Mwanga et al. 2019; Degefa et al. 2020; Tangena et al. 2015). Dans tous les cas, quelle que soit la méthode pratiquée, c'est seulement une fraction de la population anophélienne qui est échantillonnée (par exemple, uniquement les femelles ou la fraction au repos ou les moustiques exophiles ou les femelles en quête d'un repas sanguin). Ces méthodes doivent donc être choisies pour répondre à des questions précises, et sont complémentaires.

Outre la bio-écologie des anophèles, la collecte de moustiques adultes permet également de suivre la propagation des résistances aux insecticides afin d'adapter la lutte antivectorielle collective par pulvérisation.

2.5. La résistance aux insecticides

Les pulvérisations régulières d'insecticide exercent une pression de sélection et peuvent éventuellement modifier génétiquement les populations d'anophèles. Il est donc opportun de prendre en compte ce phénomène de résistance pour nos travaux.

Quatre grandes familles de composés insecticides sont utilisées dans le monde : les insecticides carbamate (CA), organochlorés (OC), organophosphorés (OP) et pyréthriinoïdes (PY). Les molécules insecticides appartenant à ces quatre familles ciblent différents canaux ioniques ou enzymes pour interrompre le bon fonctionnement du système nerveux de l'insecte (Liu 2015). Des mutations dans la séquence d'acides aminés du site de liaison de la cible de l'insecticide ainsi que des changements métaboliques conduisent à une résistance fréquente des populations de moustiques (Liu 2015).

Depuis mai 1949 en Guyane française, le programme d'éradication de la fièvre jaune et du paludisme proposait d'éliminer les vecteurs *Aedes aegypti* et *Anopheles* spp. L'utilisation de composés chimiques a été l'élément central de la lutte antivectorielle pendant cette période, grâce à la pulvérisation intradomiciliaire de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT). Cette campagne a démarré dans la ville de Cayenne et s'est étendue à l'ensemble des villes de Guyane dans les années suivantes (Epelboin et al. 2018). Les cas de paludisme ont alors diminué de manière significative à travers le territoire en même temps que la densité d'*An. darlingi*. En 1954, le paludisme avait diminué de 98,8%. Ce vecteur était cependant toujours signalé sur tout le territoire, indiquant une réintroduction continue d'*An. darlingi* des zones forestières aux environnements domestiques. De tels mouvements de populations de moustiques ont compromis l'effort d'éradication, même si *An. darlingi* était encore sensible à la pulvérisation résiduelle de DDT (Epelboin et al. 2018).

Entre 1959 et 1963, des souches d'*Ae. aegypti* résistantes au DDT ont été trouvées. La stratégie de lutte antivectorielle a donc été modifiée pour l'utilisation de la dieldrine. En 1963, des nouveaux tests de résistance ont révélé des souches d'*Ae. aegypti* résistantes au DDT et à la dieldrine. Cependant, l'utilisation d'organophosphorés, comme le malathion, le fenthion et le fénitrothion, était très controversée, en raison de leur menace pour la santé humaine, de la faible persistance des produits et de leur coût élevé. Concernant *An. darlingi*, la zone côtière a été déclarée exempte de cette espèce, la majorité des cas de paludisme se produisant le long des fleuves Oyapock et Maroni (Epelboin et al. 2018).

Entre 1963 et 1991, la lutte chimique s'est faite avec le DDT ou le malathion en pulvérisation intradomiciliaire semestriellement à l'intérieur des terres et au cas par cas sur la zone côtière mais les cas de paludisme ont réaugmenté. En 1990, la résistance d'*An. darlingi* au DDT est décrite en Colombie pour la première fois (Suarez et al. 1990). En 1991, l'interdiction internationale du DDT a été mise en œuvre dans au moins 26 pays du monde. Cette molécule a été remplacée en Guyane française par la deltaméthrine (25 mg/m²), un pyréthroïde, pour des applications de pulvérisations intradomiciliaires bimestrielles ou trimestrielles dans les zones endémiques et des pulvérisations focales autour des cas de paludisme confirmés le long des zones côtières. Pour compléter ces efforts, des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine ont été utilisées. La pulvérisation de malathion a été utilisée

également pour compléter les pulvérisations intradomiciliaires de deltaméthrine voire même remplacer celle-ci jusqu'à son interdiction par l'Union européenne en 2009 pour des raisons de sécurité environnementale et humaine. Alors une formulation à base de fénitrothion a été pulvérisée pendant 1 an. Cette molécule a ensuite été interdite et remplacée de nouveau par la deltaméthrine en 2010, qui était la seule molécule autorisée et formulée pour cet usage dans l'Union européenne et en France (Epelboin et al. 2018).

Aujourd'hui, la résistance aux quatre classes d'insecticides disponibles pour la lutte contre les moustiques est répandue chez les principaux vecteurs du paludisme à travers le monde. Une résistance aux pyréthrinoïdes chez au moins un vecteur du paludisme a été détectée dans 68% des sites dans le monde pour lesquels on dispose de données (WHO 2019).

En Amérique latine, par rapport aux autres régions du monde, les études sur l'évaluation de la résistance aux insecticides sont rares et la plupart des rapports montrent globalement une sensibilité d'*An. darlingi* aux insecticides testés (ce qui n'est pas forcément le cas pour les autres espèces) (Santacoloma et al. 2012; Galardo et al. 2015; Orjuela et al. 2018). En Guyane, *An. darlingi* est resté sensible aux insecticides utilisés pour son contrôle, y compris le DDT, la dieldrine et, actuellement, la deltaméthrine (Epelboin et al. 2018). Une diminution de la sensibilité aux insecticides a parfois été relevée mais ne perdure pas dans le temps (la sensibilité se rétablit ensuite) (Vezenegho et al. 2020, Annexe 2). *Anopheles darlingi* étant une espèce principalement sylvatique, l'explication semble être l'introduction continue de moustiques sensibles allant des zones forestières vers les zones urbanisées (où les insecticides sont utilisés), diluant ainsi l'effet de résistance (Vezenegho et al. 2020, Annexe 2). Cette hypothèse est soutenue par des études de génétique des populations (Angêlla et al. 2014).

Les programmes de lutte antivectorielle ne sont donc efficaces que lorsque l'on connaît bien la bio-écologie du vecteur. Toujours dans ce cadre, il est aussi nécessaire de se pencher sur les populations d'anophèles qui existent à l'échelle du territoire et les flux de gènes entre ces populations. C'est ce que nous permet de faire la génétique des populations.

3. La génétique des populations au service de la lutte antivectorielle

3.1. Structure génétique des populations : concepts de base

Nous nous intéresserons ici aux populations d'individus diploïdes, notre modèle d'étude étant l'anophèle.

Glossaire : Définitions importantes en génétique des populations

Gène : Séquence d'ADN susceptible d'être transcrite en ARN qui sera ensuite traduit en protéine (gène codant). De façon plus générale, en génétique des populations, ce terme est utilisé pour un fragment d'ADN codant ou non et non recombinant.

Locus : Emplacement physique, précis et invariable d'un gène (ou d'une portion d'ADN) sur un chromosome.

Allèle : C'est l'une des versions différentes d'un même gène à un locus dû à l'apparition de mutations qui sont des variations de la séquence nucléotidique. Chez les organismes diploïdes comme les anophèles, un gène possède deux allèles, chacun sur l'un des deux chromosomes homologues.

Individu homozygote : C'est lorsque les deux allèles d'un même gène sur un locus sont identiques.

Individu hétérozygote : C'est lorsque les deux allèles d'un même gène sur un locus sont différents.

Hétérozygotie espérée (H_e) = Hétérozygotie attendue sous Hardy-Weinberg (partie 3.1.2) : Estimation **théorique** de la fréquence des individus hétérozygotes si les allèles sont associés au hasard pour former les génotypes. Autrement dit, c'est la probabilité théorique de tirer au sort un individu avec 2 allèles différents.

Hétérozygotie observée (H_o) : Fréquence **observée** d'individus hétérozygotes. C'est une mesure du polymorphisme dans un échantillonnage.

Polymorphisme : Variabilité au niveau d'un locus. Dans une population, on dit qu'un gène est polymorphe, s'il possède au moins deux allèles ayant une fréquence supérieure ou égale à 1 %. S'il ne possède pas deux allèles avec une fréquence supérieure ou égale à 1 %, mais que le gène existe quand même en plusieurs exemplaires, il est **poly allélique** (un gène polymorphe est donc obligatoirement poly allélique).

Déficit en hétérozygotes : Les fréquences alléliques calculées au sein de l'échantillonnage montrent un déficit en individus hétérozygotes par rapport aux fréquences attendues sous les hypothèses de Hardy-Weinberg. $H_o < H_e$.

Population : Ensemble d'individus de la même espèce qui montrent une unité de reproduction: les individus d'une population peuvent se croiser entre eux, ils se reproduisent moins avec les individus des populations voisines. Une population est déterminée par des critères d'ordres spatiaux, temporels et par un patrimoine génétique, qui est un génome collectif.

Sous-population (ou dème) : Subdivision de la population. Population que l'on isole au sein d'une population plus large.

Panmixie : Décrit un mode de reproduction sexuée où les zygotes sont formés par rencontre aléatoire de tous les gamètes de la population.

3.1.1. Calcul des fréquences alléliques d'un échantillon

Les fréquences alléliques sont les fréquences, dans la population, des différents allèles au locus considéré. Leur connaissance donne la structure allélique de la population qui est importante en génétique des populations car c'est l'évolution des fréquences des gènes qui est significative pour l'évolution.

3.1.2. Etude théorique d'un cas idéal

Le premier modèle sur la structure génotypique d'une population a été simultanément publié par G.H. Hardy et W. Weinberg en 1908. Ce modèle, appelé "**Equilibre d'Hardy-Weinberg**" sert de base à la plupart des études de génétique des populations.

Les hypothèses de ce modèle sont les suivantes :

- **Panmixie** : les gamètes s'associent au hasard par rapport aux gènes considérés,
- **Population de taille infinie** : alors la fréquence d'un évènement est égale à sa probabilité (loi des grands nombres),
- **Fréquences des gènes non modifiées** par mutation, sélection ou migration.

Nous attendons, dans les zygotes ainsi formés, des proportions de génotypes fixés et puisqu'il n'y a ni sélection, ni mutation, ni migration et que la population est infinie (pas de dérive aléatoire des fréquences alléliques), ces proportions resteront les mêmes chez les adultes de la génération suivante. C'est ce que l'on appelle l'équilibre d'Hardy-Weinberg (HW).

Mais de nombreux paramètres peuvent influencer la reproduction au sein d'une population et modifier les fréquences génotypiques et/ou alléliques qu'on aurait obtenu si on respecte les hypothèses de ce modèle.

3.1.3. Influence du régime de reproduction : abandon de la panmixie

Si le régime de reproduction n'est pas panmictique, il existe plusieurs possibilités :

- L'autogamie : Chaque individu se reproduit par autofécondation. L'autofécondation conduit à un déficit en hétérozygote par rapport aux attendus sous l'hypothèse de panmixie. L'anophèle, n'étant pas hermaphrodite, ne peut se retrouver dans ce cas.
- La consanguinité : Un individu consanguin résulte de l'union entre 2 individus apparentés. Il est alors plus souvent homozygote qu'un individu issu de l'union de 2 individus non apparentés. Cela entraîne un **déficit d'hétérozygotes** sur l'ensemble du génome.

- L'homogamie : Les individus de même génotype pour un caractère préfèrent s'accoupler entre eux (régime de reproduction fermé au locus considéré). Ainsi le taux d'hétérozygotes diminue à chaque génération. On obtient un **déficit d'hétérozygotes** au niveau des loci responsables du caractère.
- L'hétérogamie : C'est l'union préférentielle entre individus phénotypiquement dissemblables (régime de reproduction ouvert au locus considéré). On obtient un **excès d'hétérozygotes** (ou déficit en homozygotes) qui peut avoir lieu sur l'ensemble du génome ou à certains loci responsables d'un caractère selon la raison de l'hétérogamie.

3.1.4. Influence des pressions évolutives

Les pressions évolutives s'exercent sur une population et en modifient la structure allélique. Il en existe 4 types qui correspondent à l'abandon d'une des hypothèses de la loi d'Hardy-Weinberg :

- Le hasard : Dans une population de taille finie, le hasard modifie les fréquences alléliques d'une génération à l'autre. La fréquence d'un gène ne fluctue pas indéfiniment. Elle augmente ou diminue puis, à un moment, se fixe ou est perdue. L'effet d'échantillonnage (population de taille finie) induit une variation aléatoire de la fréquence des gènes au fil des générations. C'est la **dérive génétique**. Plus la population est de petite taille, plus il y a de risque qu'elle soit homogénéisée par la dérive.

Remarque : La dérive génétique joue un rôle important si une population est passée à un effectif faible à une époque de son histoire (goulot démographique ayant entraîné une perte de la diversité génétique).

- La sélection : Un génotype est d'autant meilleur que les individus possédant ce génotype laissent, en espérance, plus de descendants. Elle peut affecter un ou plusieurs loci. La sélection peut augmenter ou diminuer la fréquence d'un allèle en affectant la survie ou la reproduction des porteurs de cet allèle pour le locus concerné. La sélection tend à fixer l'allèle le plus favorable. Elle n'affecte pas ou très peu le schéma génotypique d'HW mais affecte les fréquences alléliques. Elle peut également défavoriser les hétérozygotes ou les homozygotes.
- La mutation : C'est une erreur dans la copie conforme lors de la duplication de l'ADN durant la construction des gamètes. L'allèle est transformé en un autre (nouveau ou déjà présent dans la population). Elle va modifier les fréquences alléliques des loci qu'elle affecte. Son rôle est négligeable sur l'évolution de la fréquence des gènes par rapport aux autres pressions évolutives (les taux de mutations sont en général assez bas). Cependant, il a un rôle primordial comme source de gènes nouveaux.
- La migration : Elle est à l'origine des flux de gènes. C'est l'échange de gènes ou de leurs allèles entre différentes populations en raison de la migration d'individus fertiles d'une population au sein d'une autre population. Ce flux génétique tend à réduire les différences génétiques entre les populations, c'est-à-dire à homogénéiser les fréquences alléliques entre les populations qui échangent des gènes.

3.1.5. Effet Wahlund

Lorsque l'on décide d'un échantillonnage, il est difficile d'affirmer, à priori, si la population que l'on étudie peut être considérée comme étant une unité panmictique ou non. Il est possible que l'échantillonnage inclue plusieurs sous-populations (populations différentes génétiquement).

Il est donc nécessaire de comparer les fréquences alléliques observées avec notre échantillonnage par rapport à celles obtenues si on a une population panmictique. Il y a alors 2 possibilités :

- Toutes les sous-populations au sein de notre échantillonnage ont la même fréquence allélique : il n'y a qu'une population dans notre échantillonnage,
- Il y a différentes sous populations dans notre échantillonnage (populations avec des fréquences alléliques différentes) : dans ce cas, si on considère, à tort, que toutes les fréquences alléliques sont identiques, nous allons observer un **déficit en hétérozygotes** par rapport à la structure de HW. C'est l'**effet Wahlund**.

Autrement dit, on appelle « effet Wahlund » le déficit en hétérozygotes dû à la structuration au sein d'un échantillonnage : il existe une structure cachée au sein de l'échantillonnage.

3.1.6. Mesures de l'écart à la structure de HW : « Statistiques F » de Wright (« F-Statistics »)

La structure génotypique d'une population, attendue à l'équilibre d'HW, peut être altérée par les régimes de reproduction (non panmictiques) ou la sélection. Une autre cause d'écart à la structure d'HW peut également être dû à l'effet Wahlund. Pour décrire de telles situations, on peut utiliser les 3 « statistiques F » que S. Wright a définies (en 1965) (appelées aussi « indices de fixation ») (Wright 1965) :

- **F_{IS}** : Correspond à l'indice de fixation (F) des individus (I) dans les sous-populations (S). On mesure l'écart à la structure d'HW à l'intérieur des sous populations c'est-à-dire le déficit en hétérozygotes : on mesure le **degré d'homogénéité au sein d'une population**.

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

avec H_e = hétérozygotie espérée (attendue) et H_o : hétérozygotie observée

F_{IS} représente donc le ratio d'hétérozygotie en plus ou en moins observé par rapport à l'hétérozygotie attendue sous les hypothèses de HW. Il varie entre +1 et -1 :

- Si **F_{IS} est égal à zéro** : alors $H_e = H_o$: nous avons une **population homogène** (situation correspondant à HW) ;
- Si **F_{IS} est négatif** : alors $H_o > H_e$: nous observons donc un **excès d'hétérozygotes** (ou déficit d'homozygotes) par rapport à la structure d'HW ;

→ Si F_{IS} est positif : alors $H_o < H_e$: nous observons donc un **déficit d'hétérozygotes** (ou excès d'homozygotes) par rapport à la structure d'HW. Il existe une structuration dans notre échantillonnage. Lorsque $F_{IS} = 1$ ($H_o = 0$), nous avons une population où 100% des individus sont homozygotes.

Comme vu précédemment, le déficit en hétérozygote peut avoir plusieurs origines :

- L'effet Wahlund,
- La consanguinité ou l'hétérogamie : les individus homozygotes se reproduisent plus facilement entre eux (biais de sélection dans l'accouplement) ou les homozygotes sont favorisés par la sélection naturelle.

- F_{ST} : Correspond à l'indice de fixation (F) des sous-populations (S) dans la population totale (T). On mesure le déficit en hétérozygotes dû à la différenciation entre sous populations : permet de connaître le **degré de différenciation génétique entre sous-populations**.

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

avec H_T = hétérozygotie espérée (attendue) si on a une panmixie totale (tous les individus de toutes les sous-populations se croisent au hasard) : correspond à la diversité génétique de la population totale,

et H_S : hétérozygotie moyenne attendue si on a une panmixie locale (les individus se croisent au hasard à l'intérieur de chaque sous-population) : correspond à la diversité génétique de la sous-population.

F_{ST} varie entre 0 et +1 :

- Si F_{ST} est égal à zéro : alors $H_T = H_S$: nous avons une seule population homogène c'est-à-dire que **les 2 populations testées sont identiques** génétiquement (pas de structuration) ;
- Si F_{ST} est positif : plus on tend vers 1, plus **les populations sont différentes** : lorsque $F_{ST} = 1$, nous avons 2 sous-populations totalement différentes génétiquement (toutes les populations sont fixées pour l'un ou l'autre des allèles).

- F_{IT} : Correspond à l'indice de fixation (F) des individus (S) dans la population totale (T). On mesure l'écart global à la structure d'HW dans l'ensemble.

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

A l'aide des 3 relations précédentes, on peut obtenir l'équation qui montre le lien entre les 3 statistiques F : $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$.

3.1.7. Déséquilibre de liaison

Si deux loci polymorphes (possédant plusieurs allèles) sont indépendants dans une population, à l'équilibre d'HW, l'association entre les allèles des deux loci est aléatoire. Dans le cas contraire, **certaines combinaisons d'allèles au niveau de ces deux loci sont plus fréquentes ou moins fréquentes** qu'à l'équilibre. La différence entre les fréquences attendues et observées de ces combinaisons d'allèles correspond au déséquilibre de liaison génétique.

Ce déséquilibre de liaison peut avoir plusieurs causes :

- Si **les deux loci sont proches physiquement** sur le chromosome alors il y aura moins de recombinaisons possibles entre ces deux loci et ils seront plus souvent transmis ensemble,
- Les **systèmes de reproduction fermés** (autofécondation, clonalité) conduisent à des individus plus souvent homozygotes. Ainsi les recombinaisons ne rompent pas les associations puisque les allèles « échangés » sont identiques,
- La **sélection** peut également créer un déséquilibre de liaison : si certaines combinaisons d'allèles sont sélectivement meilleures, elles seront favorisées,
- Si la population étudiée est en fait constituée d'un **mélange récent de deux sous-populations génétiquement différentes** (ou s'il existe une arrivée continue de migrants génétiquement différents), on observera également des déséquilibres de liaison car les associations alléliques dans chacune de ces deux populations sont différentes.

3.2. Utilisation des marqueurs microsatellites comme outil pour étudier la structure génétique des populations d'*Anopheles darlingi*

Différentes techniques moléculaires permettent de caractériser les populations d'*An. darlingi*. Certaines équipes ont choisi l'électrophorèse des isoenzymes (Arredondo-Jiménez et al. 1996; Manguin et al. 1999). D'autres ont réalisé l'analyse des chromosomes polytènes pour étudier le polymorphisme chez *An. darlingi* (Kreutzer et al. 1972; Cornel et al. 2016). Parmi les techniques récentes qui ont été utilisées pour *An. darlingi*, il y a par exemple, le séquençage d'ADN mitochondrial comme celui du gène COI (Cytochrome Oxydase I) (Mirabello et Conn 2006; Pedro et Sallum 2009; Gutiérrez et al. 2010; Naranjo-Díaz et al. 2016; Prado et al. 2019) ou ND4 (NADH déshydrogénase, sous-unité 4) (Angèlla et al. 2007; Moutinho et al. 2011) ou d'ADN ribosomal comme celui du gène ITS2 (« Second internal transcribed spacer ») (Malafrente et al. 1999; Manguin et al. 1999). Le séquençage de marqueurs ADN associés aux sites de restriction, technique RADSeq (« Restriction-site Associated DNA Sequencing ») a aussi été plus récemment utilisé pour génotyper des polymorphismes de séquence d'ADN, sous la forme de polymorphismes mononucléotidiques (SNP : « Single Nucleotide Polymorphisms ») (Emerson et al. 2015; Campos et al. 2017; 2019; Prussing et al. 2019). Cependant, des études ont souligné que les estimations de la diversité avec la technique RADseq peuvent être systématiquement biaisées à cause de la non-randomisation des haplotypes de

l'échantillonnage (Arnold et al. 2013; Puritz et al. 2014; Andrews et al. 2014), ce qui empêche l'utilisation de cette technique comme outil standardisé pour mesurer et comparer la diversité génétique entre les populations.

Les marqueurs microsatellites ont finalement été privilégiés pour cette étude. A l'initiation de ce travail en 2013, c'était un outil très utilisé pour étudier la structure génétique d'*An. darlingi* (Scarpassa et Conn 2007; Mirabello et al. 2008; Gutiérrez et al. 2010; Angèlla et al. 2014). Son utilisation s'est maintenue plus récemment (Lainhart et al. 2015; Campos et al. 2017; Altamiranda-Saavedra et al. 2017; Rosero et al. 2017). La technologie nécessaire à ce génotypage était disponible dans notre laboratoire et le coût par échantillon reste très compétitif. De plus, l'étude des SNP n'était pas possible en 2013 puisque le génome d'*An. darlingi* venait de paraître et n'était pas encore bien annoté (c'est toujours le cas d'ailleurs en 2020).

Un microsatellite est une séquence d'ADN formée par une répétition de motifs composés de 1 à 4 nucléotides le plus souvent (répétitions en tandem de simples séquences [SSR : « Simple Sequence Repeat »]). Le nombre de répétition de ces motifs varie d'un individu à l'autre occasionnant un polymorphisme de taille. Ces SSR sont généralement localisées au niveau de séquences non codantes car ce polymorphisme changerait le cadre de lecture. Seuls les motifs de trinucleotides permettent son maintien par l'ajout ou la suppression d'un codon. Pour cette étude, nous avons choisi 8 marqueurs constitués de répétitions de dinucleotides et un marqueur constitué de répétitions de trinucleotides.

Le choix des marqueurs microsatellites est déterminant dans l'interprétation des écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Il est nécessaire d'utiliser des marqueurs sélectivement neutres pour s'affranchir d'éventuelles pressions de sélection susceptibles de mimer ou de masquer le signal d'une structure génétique des populations. Pour ce faire, outre le fait de limiter les marqueurs présents dans des régions codantes, il faut limiter la proximité physique avec un gène soumis à une pression de sélection. Ce dernier point nécessite un génome complet et annoté avec une bonne connaissance des pressions de sélection qui s'exercent sur les gènes. Les informations disponibles pour *An. darlingi* restent parcellaires et ne permettent pas de cartographier les microsatellites disponibles dans son génome (Marinotti et al. 2013).

L'amplification par PCR nécessite la connaissance des 2 séquences flanquantes du locus où sont choisies les 2 séquences complémentaires des amorces. Pour ce faire, soit on constitue une banque génomique suivie d'un "screening" approprié (recherche de séquences microsatellites à l'aide de sondes) à partir d'une banque génomique séquencée préexistante, soit une autre équipe a déjà défini ces séquences et mis au point la PCR pour l'espèce étudiée. C'est notre cas : l'équipe de Conn a mis au point 8 marqueurs microsatellites en 2001 (Conn et al. 2001) et l'équipe de A. F. Angèlla a mis au point 2 marqueurs supplémentaires (Angèlla et al. 2014). Nous avons choisi 8 microsatellites parmi ces 10 marqueurs publiés.

L'avantage d'utiliser des marqueurs microsatellites en génétique des population est qu'ils sont considérés comme très polymorphes, codominants, abondants dans le génome et aisés à manipuler et mettre en évidence (Lehmann et al. 1996).

Cependant, des contraintes liées à l'utilisation des marqueurs microsatellites en génétique des populations existent. Tout d'abord, le nombre de répétitions que

contient un microsatellite n'est pas infini et donc la taille des fragments, tout comme le nombre d'allèles différents à un locus est limité (Nauta et Weissing 1996; Lehmann et al. 1996). Ce phénomène peut introduire un biais dans l'estimation des flux de gènes en surestimant l'homologie des allèles entre différentes populations. De plus, le phénomène d'homoplasie de taille peut avoir lieu. C'est lorsque deux allèles sont de même taille mais résultent de processus évolutifs différents, ce qui conduira à un excès de similarité (Estoup et al. 2002). Celui-ci peut avoir plusieurs origines comme une variation de taille dans les séquences flanquantes (délétions ou insertions) (**Figure 7**). Cela peut aussi être dû à une variation du motif microsatellite lui-même qui varie de façon opposée en évoluant : par exemple une délétion pourra être compensée par une insertion de même taille lors d'une évolution ultérieure, on retourne alors au nombre de répétition d'origine.

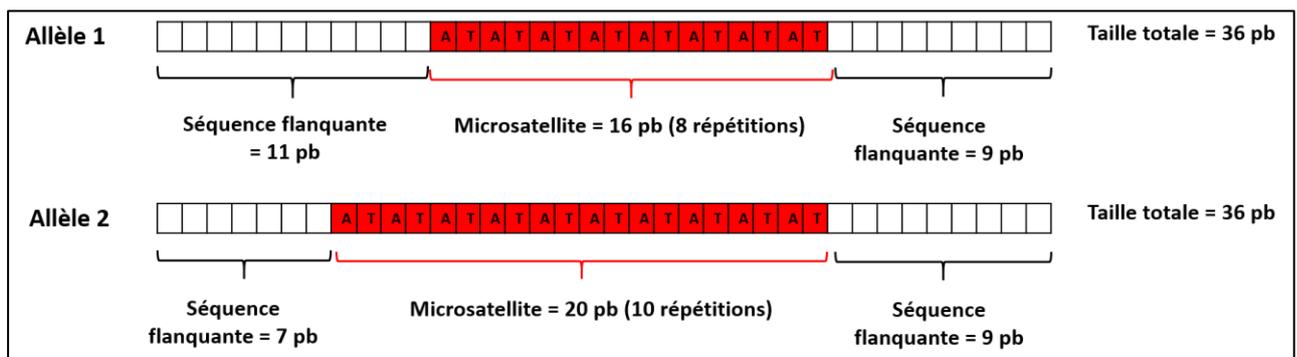


Figure 7 : Exemple illustrant le phénomène d'homoplasie dû à une variation dans les séquences flanquantes. *Les variations de taille des séquences flanquantes compensent celles du marqueur microsatellite. Le génotypage ne pourra pas distinguer les deux individus, concluant à des tailles identiques, malgré un nombre de répétitions du motif différent.*

Les microsatellites restent donc un bon outil pour étudier la structure des populations d'une même espèce sauf pour des taux de mutation élevés (microsatellites hypervariables) ainsi que de fortes contraintes de taille d'allèles (Estoup et al. 2002).

L'une des contraintes les plus importantes concernant les microsatellites est l'existence d'allèles nuls. Ce point sera développé à la **partie 3.3.8**. Il est aujourd'hui possible d'estimer la fréquence des allèles nuls grâce au logiciel Micro-Checker (Van Oosterhout et al. 2004).

Pour conclure, il n'existe aucun marqueur génétique parfait. L'utilisation d'un marqueur génétique reste donc une question de choix à adapter à chaque projet de recherche qui prendra en compte les contraintes du marqueur choisi.

3.3. Tests statistiques utilisés en génétique des populations

Nous allons détailler ici les tests statistiques utilisés dans nos études dont l'objectif est de caractériser les populations d'*An. darlingi* et de les comparer entre elles.

Les écarts à l'équilibre d'HW peuvent être le fait des variabilités liées à l'échantillonnage ou résulter d'un réel phénomène. Afin de faire la distinction entre ces deux situations, la mise en place d'un **test statistique** aide à la décision. Il permet de calculer une probabilité de commettre une erreur associée à cette prise de décision. Ce risque d'erreur est appelé **P-value**.

Pour cela, il faut tout d'abord poser l'hypothèse à tester : l'**hypothèse nulle H_0** stipule que la population est conforme au modèle préétabli. Pour notre étude, l'hypothèse nulle posée correspond à une population à l'équilibre d'HW c'est-à-dire que les populations comparées ont les mêmes fréquences alléliques et un F_{ST} égal à zéro.

La **P-value** est la probabilité de rejeter, à tort, l'**hypothèse nulle H_0** alors qu'elle est vraie. En l'absence d'aucun biais, le hasard seul fait croire dans x % des cas qu' H_0 est fautive alors que ce n'est pas le cas. Par exemple, c'est la probabilité de dire qu'un F_{ST} positif (les deux populations testées sont génétiquement différentes) est significatif alors qu'il ne l'est pas : la différence obtenue est induite par le hasard ou l'échantillonnage.

Ensuite, pour considérer que la valeur statistique obtenue est significative, il faut fixer arbitrairement un **seuil** à partir duquel on décidera qu' H_0 est rejetée. Ce seuil est appelé « **risque de première espèce** » ou « erreur de type I » et noté « α ». Pour prendre une décision sur la significativité des résultats, on compare la **P-value** obtenue avec α . En général, on choisit $\alpha = 0,05$ (5%). Ce sera le cas pour notre étude. Si la **P-value** obtenue est inférieure ou égale à 0,05, on considérera la valeur obtenue comme significative. Si la **P-value** est supérieure à 0,05, on considérera la valeur obtenue comme non significative.

3.3.1. Le principe des permutations

Afin d'estimer les **P-values**, lorsque les lois de distribution des paramètres étudiés ne sont pas connues, il est possible d'avoir recours à des procédures de randomisation (ou rééchantillonnage) aléatoire des données. Les programmes informatiques ont rendu possible ces approches. Les algorithmes de permutation génèrent un grand nombre de nouveaux jeux de données à partir desquels est recalculé le paramètre à tester. Sa variabilité sur l'ensemble des itérations permettra d'apprécier l'effet de l'échantillonnage et d'estimer la **P-value**.

3.3.2. Tester la panmixie locale en testant le F_{IS}

On peut tester la significativité du F_{IS} (« significativement différent de 0 ») par un test de permutation des allèles sur les génotypes. Le test statistique va consister à calculer, compte tenu du nombre de loci sur lequel la mesure a été faite, du degré de polymorphisme de ces différents loci (nombre d'allèles, distribution) et du nombre d'individus génotypés, la probabilité d'avoir obtenu, sous l'hypothèse de la panmixie (H_0), un F_{IS} plus important ou moins important que celui observé (test bilatéral).

Autrement dit, on prend les allèles présents chez l'ensemble des individus de notre échantillonnage et on les réassocie au hasard sous H_0 . On obtient un F_{IS} global. On fait cela 10 000 fois. On obtient à chaque fois 2 possibilités :

- On obtient une valeur de F_{IS} , sous H_0 , plus grande que le F_{IS} observé,
- On obtient une valeur de F_{IS} , sous H_0 , plus petite que le F_{IS} observé.

On obtient donc, après 10 000 permutations, la distribution des F_{IS} obtenus. On en extrait le pourcentage de valeurs obtenues supérieures à la valeur observée du F_{IS} (pour tester un déficit en hétérozygotes) et le pourcentage de valeurs inférieures (pour tester un excès d'hétérozygotes).

Il reste alors à interpréter ces estimations. Nous avons précisé plus haut que nous avons choisi $\alpha = 0,05$ (5%). Cela signifie que :

- Pour une valeur de F_{IS} observée positive : le résultat est significatif si le pourcentage de F_{IS} obtenus supérieurs au F_{IS} observé est inférieur à 5%. Autrement dit, si au moins 95% des valeurs obtenues par permutation sont inférieures au F_{IS} observé, ce dernier est significatif. On peut considérer que le « signal » existe car quand on fait une simulation par permutation, on tombe en dessous de cette valeur dans au moins 95% des cas.
- Pour une valeur de F_{IS} observée négative : le résultat est significatif si le pourcentage de F_{IS} obtenus inférieurs au F_{IS} observé est inférieur à 5%. Autrement dit, si au moins 95% des valeurs obtenues par permutation sont supérieures au F_{IS} observé, ce dernier est significatif. On peut considérer que le « signal » existe car quand on fait une simulation par permutation, on tombe au-dessus de cette valeur dans au moins 95% des cas.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au F_{IS} afin de tester s'il existe une structuration au sein de notre échantillonnage (déficit en hétérozygotes). C'est donc un F_{IS} observé significativement positif que l'on cherche à mettre en évidence (1^{er} cas ci-dessus). La *P-value* à prendre en compte pourrait donc correspondre au pourcentage de F_{IS} obtenus plus grands que le F_{IS} observé.

Cependant, le test effectué est un test bilatéral, somme de 2 tests unilatéraux : nous avons testé le déficit en hétérozygote (pourcentage de F_{IS} obtenus supérieurs au F_{IS} observé = P_{max}) et l'excès d'hétérozygotes (pourcentage de F_{IS} obtenus inférieurs au F_{IS} observé = P_{min}).

Il a donc été nécessaire d'effectuer une « correction » pour obtenir une *P-value* bilatérale et ne pas perdre en puissance lors du test.

La formule suivante a été utilisée : $P\ value = P_{min} + (1 - P_{max})$.

3.3.3. Tester la structuration en testant le F_{ST}

On peut également tester la significativité du F_{ST} (« significativement différent de 0 ») par un test de permutation.

On prend ici les individus présents dans l'ensemble de notre échantillonnage et on les redistribue au hasard dans les différentes populations définies (sous-échantillonnage). On simule ici la migration des individus entre les populations (H_0). On obtient un F_{ST} .

On fait cela 10 000 fois. On obtient à chaque fois 2 possibilités :

- On obtient une valeur de F_{ST} , sous H_0 , plus grande que le F_{ST} observé,
- On obtient une valeur de F_{ST} , sous H_0 , plus petite que le F_{ST} observé.

On obtient donc, après 10 000 permutations, la distribution des F_{ST} obtenus c'est-à-dire le pourcentage de valeurs obtenues supérieures à la valeur observée du F_{ST} et le pourcentage de valeurs inférieures.

Ici, contrairement au F_{IS} , nous ne pouvons avoir que des valeurs positives de F_{ST} . L'interprétation est donc plus simple. Une valeur positive signifie qu'il existe une structuration si elle est significative.

Nous avons choisi $\alpha = 0,05$ (5%). Cela signifie que le résultat est significatif si le pourcentage de F_{ST} obtenus supérieurs au F_{ST} observé est inférieur à 5%. Autrement dit, si au moins 95% des valeurs obtenues par permutation sont inférieures au F_{ST} observé, ce dernier est significatif. On peut considérer que le « signal » existe car quand on fait une simulation par permutation, on tombe en dessous de cette valeur dans au moins 95% des cas.

3.3.4. Tester la panmixie globale en testant le F_{IT}

On prend ici les allèles de tous les individus et on les réassocie au hasard dans l'ensemble de notre échantillonnage, un grand nombre de fois. On mesure le F_{IT} sur l'ensemble des loci.

Pour notre étude, il est redondant de tester le F_{IT} après avoir calculé le F_{IS} et le F_{ST} . Nous n'en parlerons donc plus par la suite.

3.3.5. Tester les déséquilibres de liaison

On prend ici les loci deux à deux et on les recombine entre eux au hasard à l'intérieur de chacune des populations. On fait cela 10 000 fois et on obtient la distribution des déséquilibres de liaison sous l'hypothèse nulle (H_0 = absence d'association statistique entre loci). On compare cette distribution au déséquilibre de liaison observé par paire de loci dans chaque population.

3.3.6. Correction de Bonferroni

On a fixé arbitrairement l'erreur α à 5%, seuil à partir duquel on décidera qu' H_0 est rejetée. Ce seuil a été défini pour le cas où H_0 ne porte que sur un seul paramètre, ce qui n'est plus valable dans le cadre de comparaisons multiples où le risque de rejeter à tort H_0 augmente et n'est plus contrôlé (il devient supérieur à 5%). Pour prendre en compte ce biais, une **correction de Bonferroni** a été appliquée. Cette correction permet donc de corriger le seuil de significativité lors de comparaisons multiples.

3.3.7. Cas des allèles nuls

Dans notre étude, les allèles nuls correspondent à des **allèles que l'on n'a pas pu détecter** avec la méthode utilisée (ici, PCR multiplexe de marqueurs microsatellites). Il y a plusieurs possibilités sur l'origine de la non-détection. Tout d'abord, il peut exister des erreurs technologiques :

- L'ADN de l'individu échantillonné a été dégradé lors de la conservation,
- L'extraction de l'ADN a échoué,
- L'amplification du marqueur microsatellite a échoué,
- La détection de l'amplicon a échoué.

Ces exemples affecteront certains échantillons qui apparaîtront « blanc » : aucun allèle ne sera détecté. Nous avons un biais technologique.

Une autre possibilité est une **mutation dans la séquence flanquante du marqueur microsatellite pour un allèle**. Pour cet allèle, l'amorce (de PCR), ne pouvant pas se fixer, aucune amplification n'aura lieu. L'individu apparaîtra donc « blanc » à l'état homozygote (pas l'allèle détecté). **Si l'individu est hétérozygote, il apparaîtra homozygote pour l'autre allèle**. Dans ce cas-ci, tous les individus possédant l'allèle nul sont concernés et l'étude est plus fortement impactée. C'est un problème afférent à la PCR qui doit être évalué et pris en compte dans l'analyse des marqueurs microsatellites.

La présence d'allèles nuls à un locus va provoquer un **déficit en hétérozygotes « artéfactuel »** (un hétérozygote est repéré homozygote).

Lorsque l'on observe un déficit en hétérozygotes avec nos données, il faut donc déterminer si ce déficit est causé par un phénomène biologique (autofécondation, effet Wahlund) ou par la présence d'allèles nuls. Pour cela, nous allons chercher à estimer à chaque locus et dans chaque population, la fréquence d'allèles nuls permettant d'expliquer le déficit. Nous avons utilisé le logiciel **Micro-Checker** version 2.2.3. qui permet de faire ces estimations (Van Oosterhout et al. 2004). Concrètement, il s'agit d'utiliser la fréquence estimée d'allèles nuls pour calculer la proportion d'individus « blancs » attendue sous l'hypothèse de panmixie (H_0) et de la comparer avec la proportion d'individus « blancs » observée. On peut alors voir si les allèles nuls expliquent la totalité du déficit ou si celui-ci est causé par un phénomène biologique.

En plus de donner la fréquence des allèles nuls attendue et observée, Micro-checker permet de mettre en évidence 2 phénomènes :

- La **dominance des allèles courts** (« **Large allele dropout** ») : Au cours de la PCR, si une compétition existe entre les 2 allèles d'un même locus, c'est l'allèle le plus court qui sera le mieux amplifié (plus facile à polymériser) : alors un génotype hétérozygote sera faussement interprété comme homozygote pour l'allèle le plus court,
- Le **bégaiement de la polymérase** (« **stuttering** ») : Parfois, la *Taq* ADN polymérase peut déraiper donnant lieu à un produit de PCR ne correspondant pas à la matrice initiale. Cet artefact pourra occasionner un déficit en hétérozygotes que Micro-checker est capable de détecter (le déficit étant plus important pour les individus hétérozygotes avec des allèles de tailles proches).

3.4. Etude de la structure génétique des populations d'*Anopheles darlingi* en Guyane

L'**objectif** de cette thèse est d'évaluer la **structure des populations et les flux de gènes chez *An. darlingi* en Guyane**. En effet, la connaissance de la dynamique de ces populations de moustiques est importante pour concevoir des interventions efficaces de lutte antivectorielle.

Deux hypothèses extrêmes peuvent être formulées pour comprendre l'intérêt de cette étude en lien avec la lutte antivectorielle. Une première hypothèse est qu'il n'existe qu'une seule population d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane. Si tel est le cas, les flux de gènes sont importants et il n'est pas envisageable de considérer que les pulvérisations d'insecticides extérieures et intradomiciliaires puissent avoir un effet local à long terme puisque qu'un flux d'individus permet continuellement de « réapprovisionner » rapidement la zone traitée. Une seconde hypothèse est qu'il existe une structuration des populations d'*An. darlingi* de telle sorte qu'il n'y ait aucun flux de gène, c'est-à-dire pas de brassage génétique entre les populations de deux sites géographiquement séparés. Ceci amène à une conclusion : ces deux populations ne se mélangent pas (isolement reproductif). Ainsi, une élimination locale du vecteur à l'aide de pulvérisation d'insecticides a un effet à long terme, il y a pas de « réapprovisionnement » par une population voisine. La réalité est sans doute située entre ces deux hypothèses extrêmes mais dans quelles proportions ? Ce type d'étude n'ayant jamais été réalisé en Guyane, il nous semble important de faire un « état des lieux » des populations d'*An. darlingi* présentes.

Les données de structuration génétique des anophèles permettent donc d'apporter des éléments de réponse pour évaluer si, dans certaines zones en Guyane, le contrôle d'un des vecteurs du paludisme dans le cadre d'une lutte antivectorielle est possible.

Huit marqueurs microsatellites ont été utilisés pour génotyper environ 2000 *An. darlingi* capturés principalement en Guyane. En amont, une étude préliminaire a été réalisée, permettant de vérifier que la méthode de capture (capture sur homme ou MosquitoMagnet®) ou l'heure de capture n'influencent pas la structure des populations créant un biais d'échantillonnage.

Le génome de l'anophèle est composé de 3 paires de chromosomes : une paire de chromosomes sexuels XX chez les femelles et XY chez les mâles et de 2 paires d'autosomes (chromosomes n°2 et 3) (Artemov et al. 2018).

Dans la partie expérimentale, seconde grande partie de ce manuscrit, seront détaillées les deux études qui ont composé ce travail de thèse : tout d'abord l'étude méthodologique sur le mode de capture et les créneaux horaires, ensuite l'étude de structure génétique d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Structure génétique d'*Anopheles darlingi* en fonction du mode de piégeage et de l'horaire de capture

Dans ce chapitre, je me suis intéressée plus particulièrement à l'échantillonnage des anophèles. Les spécimens d'*An. darlingi* échantillonnés pour étudier la structure génétique à l'échelle de la Guyane ont été capturés à l'aide de différentes méthodes : Capture sur Homme, Mosquito Magnet[®] avec attractant (Octénol ou Lurex[™]), Homme sous double moustiquaire, piège lumineux type CDC ou capture larvaire avec éclosion en laboratoire. Ils ont également été capturés à différents créneaux horaires selon les sites. Les captures ont été réalisées principalement à la tombée de la nuit mais sur certains sites, les captures ont été réalisées toute la nuit voire même en journée.

Avant d'étudier la structure génétique d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane, il nous a semblé important de réaliser une étude méthodologique sur un possible biais d'échantillonnage, ce qui n'avait jamais été publié. Sachant que des populations sympatriques d'*Anopheles* ont été mises en évidence dans la littérature (Arredondo-Jiménez et al. 1996; Moutinho et al. 2011; Angêlla et al. 2014; Guelbeogo et al. 2014; Campos et al. 2017), est-ce que les populations d'*An. darlingi* diffèrent selon les méthodes de capture utilisées ? Concrètement, est-ce que les populations capturées sur Homme ou dans un MosquitoMagnet[®] sont semblables ? Nous avons souhaité vérifier que le mode de capture choisi n'influence pas la capture d'une sous-population plus qu'une autre. En effet, si une sous-population d'*An. darlingi* est davantage capturée par un type de piégeage, les analyses moléculaires de structure des populations seront inévitablement biaisées si les moustiques échantillonnés ont été capturés avec des méthodes de collectes différentes.

Pour cette étude préliminaire, nous avons choisi de comparer 3 modes de collecte réalisés selon un carré latin (3X3) sur le site de Blondin : la capture sur Homme et le Mosquito Magnet[®] utilisant comme attractant l'octénol (C₈H₁₆O ; 1-octen-3-ol, un alcool dérivé de l'oct-1-ène) ou le L(+)-acide lactique (Lurex[™]) (Hoel et al. 2007; Vezenegho et al. 2014).

Compte tenu de l'absence de standardisation des protocoles de capture vis-à-vis des créneaux horaires de collecte des moustiques alors qu'une variation des rythmes d'agressivité a été démontrée au sein d'une même espèce, nous avons souhaité vérifier que ce sont bien les mêmes sous-populations d'*An. darlingi* qui sont capturées le soir, la nuit, tôt le matin ou en journée. Les moustiques ayant été capturés toute la nuit à Blondin, nous avons comparé les populations d'*An. darlingi* capturés le soir (18h30-22h30), en pleine nuit (22h30-5h) et tôt le matin (5h-7h). Curieusement, sur le site d'orpillage de Dagobert, 15,7 % des spécimens d'*An. darlingi* ont été capturés en pleine journée. Il nous a semblé intéressant de choisir ce site pour effectuer également une comparaison génétique entre les moustiques attrapés de nuit (18h30-22h30) et ceux attrapés de jour (7h-15h).

Le génotypage de 522 moustiques a été réalisé à l'aide de 8 marqueurs microsatellites. Les captures ont été effectuées sur ces 2 sites entre septembre et

décembre 2013. Lors de la session de capture suivante, une rotation des pièges a été effectuée. Le degré de différenciation génétique entre sous-populations d'*An. darlingi* a été mesuré en calculant le F_{ST} . L'assignation des individus à des groupes a été réalisée par une analyse discriminante en composante principale (DAPC : « Discriminant Analysis of Principal Components »).

L'article suivant a été soumis le 18/10/2020 au journal Parasites & Vectors.

Parasites & Vectors

Multiple methods and time slots collection of *Anopheles darlingi* populations: molecular evidence of unbiased entomological survey

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:									
Full Title:	Multiple methods and time slots collection of <i>Anopheles darlingi</i> populations: molecular evidence of unbiased entomological survey								
Article Type:	Research								
Section/Category:	Dipteran Vectors and Associated Disease								
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Agence Régionale de Santé (ARS) (Convention n°12-49/ARS du 11 juillet 2012 and n°13-83/ARS du 28 juin 2013)</td> <td>Not applicable</td> </tr> <tr> <td>French Armed Forces - Armée Française (LR607e)</td> <td>Not applicable</td> </tr> <tr> <td>Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-10-LABX-25-01)</td> <td>Not applicable</td> </tr> <tr> <td>European commission FP7 (REGPOTCT-2011-285837-STRonGer)</td> <td>Not applicable</td> </tr> </table>	Agence Régionale de Santé (ARS) (Convention n°12-49/ARS du 11 juillet 2012 and n°13-83/ARS du 28 juin 2013)	Not applicable	French Armed Forces - Armée Française (LR607e)	Not applicable	Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-10-LABX-25-01)	Not applicable	European commission FP7 (REGPOTCT-2011-285837-STRonGer)	Not applicable
Agence Régionale de Santé (ARS) (Convention n°12-49/ARS du 11 juillet 2012 and n°13-83/ARS du 28 juin 2013)	Not applicable								
French Armed Forces - Armée Française (LR607e)	Not applicable								
Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-10-LABX-25-01)	Not applicable								
European commission FP7 (REGPOTCT-2011-285837-STRonGer)	Not applicable								
Abstract:	<p>Background: <i>Anopheles darlingi</i> is the most important malaria vector in the Amazon Basin. Knowledge of the dynamics of these mosquito populations is important for designing efficient vector control interventions. <i>Anopheles</i> capture is the first step to implement any study about this vector ecology, population genetics, resistance to insecticide or malaria transmission level. A lot of collection methods are possible, but it has never been tested if different populations are sampled depending on the collection methods. Considering microstructures of vector populations or even sympatric vector populations with different trophic behavior, obvious selection biases could occur. Molecular comparison of <i>An. darlingi</i> population sampled using different collection methods and at different time slots was performed in order to assess possible selection bias.</p> <p>Methods: Mosquitoes were captured in French Guiana from two sites with different ecological fasciae, between September and December 2013. Three collection methods, human landing catch and Mosquito Magnet® traps baited with Octenol or Lurex™, were implemented following a 3 x 3 Latin square to allow for their comparison, avoiding possible effects of their geographical position. Populations sampled by time slots between 6:30 PM and 7:00 AM were compared considering evening, middle of the night and early morning. The day/night comparison was performed separately at another site in deep forest. Microsatellite genotyping from nine loci was performed to describe <i>An. darlingi</i> populations sampled in different conditions. Comparisons were based on pairwise Fst index and discriminant analysis of principal components.</p> <p>Results: A total of 522 <i>An. darlingi</i> were used. Comparing the collection methods (n=431), time slots (n=431) or even day/nighttime (n=91), the F_{ST} values were non-significant (p>0.25). That is consistent with the respective discriminant analysis of principal component (DAPC) which highlighted only one cluster.</p> <p>Conclusions: No significant population differentiation was highlighted between <i>An. darlingi</i> caught by various collection methods or time slots. Mosquitoes caught with different collection methods or time slots can be used to <i>An. darlingi</i> molecular study. Mosquito Magnet® trap could be an alternative to human landing catch which is controversial today.</p> <p>Keywords: <i>Anopheles darlingi</i>, Amazonia, Population genetic structure, Microsatellites, Collection methods, Collection time, Malaria</p>								
Corresponding Author:	Hervé BOGREAU, Ph.D Institute for Biomedical Research of French Armed Forces Marseille, FRANCE								

Corresponding Author E-Mail:	hervebogreau@yahoo.fr
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Institute for Biomedical Research of French Armed Forces
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Laetitia Ferraro
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Laetitia Ferraro
	Sébastien Briolant
	Mathieu Nacher
	Samuel Venezegho
	Antoine Adde
	Christophe Nguyen
	Pascal Gaborit
	Jean Issaly
	Romuald Carinci
	Vincent Pommier de Santi
	Romain Girod
	Isabelle Dusfour
	Hervé BOGREAU, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Suggested Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Is this study a clinical trial?<hr><i>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</i>	No
Are you submitting to an Article Collection?	No

[Click here to view linked References](#)

1 **Multiple methods and time slots collection of *Anopheles darlingi* populations: molecular**
2 **evidence of unbiased entomological survey**

1
2
3
3
4
5
6
4
7
8
5
9
10
11
6
12
13
14
7
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Laetitia Ferraro¹, Sébastien Briolant^{2,3,4}, Mathieu Nacher^{5,6}, Samuel Venezegho¹, Antoine Adde¹, Christophe
Nguyen^{2,3,4}, Pascal Gaborit¹, Jean Issaly¹, Romuald Carinci¹, Vincent Pommier de Santi^{3,7}, Romain Girod¹,
Isabelle Dusfour¹, Hervé Bogreau^{2,3,4}*Corresponding author

8 **Abstract**

9 ¹ **Background:**

10 ² *Anopheles darlingi* is the most important malaria vector in the Amazon Basin. Knowledge of the dynamics
11 ³ of these mosquito populations is important for designing efficient vector control interventions. *Anopheles*
12 ⁴ capture is the first step to implement any study about this vector ecology, population genetics, resistance to
13 ⁵ insecticide or malaria transmission level. A lot of collection methods are possible, but it has never been
14 ⁶ tested if different populations are sampled depending on the collection methods. Considering
15 ⁷ microstructures of vector populations or even sympatric vector populations with different trophic behavior,
16 ⁸ obvious selection biases could occur. Molecular comparison of *An. darlingi* population sampled using
17 ⁹ different collection methods and at different time slots was performed in order to assess possible selection
18 ¹⁰ bias.

19 ¹¹ **Methods:**

20 ¹² Mosquitoes were captured in French Guiana from two sites with different ecological fasciae, between
21 ¹³ September and December 2013. Three collection methods, human landing catch and Mosquito Magnet®
22 ¹⁴ traps baited with Octenol or Lurex™, were implemented following a 3 x 3 Latin square to allow for their
23 ¹⁵ comparison, avoiding possible effects of their geographical position. Populations sampled by time slots
24 ¹⁶ between 6:30 PM and 7:00 AM were compared considering evening, middle of the night and early morning.
25 ¹⁷ The day/night comparison was performed separately at another site in deep forest. Microsatellite genotyping
26 ¹⁸ from nine loci was performed to describe *An. darlingi* populations sampled in different conditions.
27 ¹⁹ Comparisons were based on pairwise F_{ST} index and discriminant analysis of principal components.

28 ²⁰ **Results:**

29 ²¹ A total of 522 *An. darlingi* were used. Comparing the collection methods (n=431), time slots (n=431) or
30 ²² even day/nighttime (n=91), the F_{ST} values were non-significant ($p>0.25$). That is consistent with the
31 ²³ respective discriminant analysis of principal component (DAPC) which highlighted only one cluster.

32 ²⁴ **Conclusions:**

33
34
35
36
37

33 No significant population differentiation was highlighted between *An. darlingi* caught by various collection
34 methods or time slots. Mosquitoes caught with different collection methods or time slots can be used to *An.*
35 *darlingi* molecular study. Mosquito Magnet® trap could be an alternative to human landing catch which is
36 controversial today.

37
38 **Keywords:**

39 *Anopheles darlingi*, Amazonia, Population genetic structure, Microsatellites, Collection methods, Collection
40 time, Malaria

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

42 Introduction

43¹ Entomological survey is a key component of malaria vector control programs. Sampling malaria vectors
44² has many aims including, the identification of *Anopheles* species, the assessment of vector species densities
45³ and longevity, the study of their resting and feeding behavior, their *Plasmodium* infection or their
46⁴ susceptibility to insecticides. Especially, the number of *Anopheles* caught is used to estimate the human
47⁵ biting rate (HBR), which ultimately measures the human's risk of exposure to malaria. Indeed, the HBR
48⁶ multiplied by the proportion of *Anopheles* with *Plasmodium* sporozoites in their salivary glands allows to
49⁷ determine the entomological inoculation rate (EIR), a standard parameter to evaluate malaria transmission
50⁸ [1] and to adapt interventions to control malaria.

51⁹ *Anopheles darlingi*, the most abundant *Anopheles* species in Amazonian urban and forest area [2], is a
52¹⁰ predominantly anthropophilic vector with high aggressive feeding behavior frequently after dusk [3]. This
53¹¹ mosquito is recognized as important malaria vector in French Guiana [4,5]. It exhibits a considerable
54¹² plasticity in biting behavior (time and place of bites, host source) in response to local environmental
55¹³ conditions in the Americas [6].

56¹⁴ A study in Acre State, Brazil, have reported behavioral differences between populations from adjacent
57¹⁵ capture sites that indirectly suggest a microstructure of *An. darlingi* populations (various biting time and
58¹⁶ exophilic/endophilic behavior were observed depending on the season) [7]. Microgeographical genetic
59¹⁷ differentiation of *An. darlingi* populations have been reported in the Western Amazon region of Brazil, from
60¹⁸ two sites 60 km apart [8] or on a smaller spatial scale on the outskirts of Porto Velho city center associated
61¹⁹ with a tropism for different breeding sites [9].

62²⁰ *Anopheles* sympatric populations were also reported suggesting possible partial reproductive isolation in
63²¹ the same geographic area. In Burkina Faso, the reproductive isolation of two local sympatric populations
64²² was describe for two species (*An. coluzzii* and *An. gambiae s.s.*) because of differences in timing of mating
65²³ swarms [10]. Sympatric populations of *An. funestus* have exhibited different behaviors, [11] as well as *An.*
66²⁴ *vestitipennis* in Mexico [12]. This reproductive isolation of *Anopheles* populations can even be highlighted

67 at the molecular level as previously in Cameroun for *An. gambiae* [13], in Sri Lanka for *An. culifacies* E [14]
68 and in Manaus (Brazil) for *An. darlingi* [15].

69¹ Although controversial, the “gold standard” for *Anopheles* collection in the field and assessment of
70² malaria transmission risk is human landing catch (HLC) because it directly measures HBR [16]. Many other
71³ collection methods based on traps are used such as Light traps, Mosquito Magnet® traps, BG-Sentinel trap
72⁴ [17]. The best alternative to HLC is searched [18–20] in order to i) avoid human contact with infected
73⁵ mosquitoes, which raises ethical concerns and ii) allow for the standardization of measurements, by breaking
74⁶ free from inter-individual variability in mosquito attractiveness [21]. However, the abundance of mosquitoes
75⁷ caught, the species richness and Simpson’s diversity index differ between trapping methods [22]. The inter-
76⁸ species bias is then known as a function of the method used for sampling malaria vectors.

77⁹ The pre-cited traps use natural, synthetic, physical or visual cues with varying effectiveness between
78¹⁰ *Anopheles* species [22] or even between populations [12]. HLC is based on natural host attractiveness.
79¹¹ Humans are placed as biological baits and collectors to attract and catch mosquitoes. Light traps, BG
80¹² sentinel® traps or Mosquito Magnet® traps tend to reproduce those baits by combining synthetic
81¹³ compounds, physical and visual attractants (volatile molecules called kairomones, light, color, heat, CO₂
82¹⁴ emission) to mechanically and systematically capture the insects [17]. Considering the possible presence of
83¹⁵ several parapatric or even sympatric *Anopheles* populations, as previously described [8,9], a selection bias
84¹⁶ can be expected depending on the collection methods.

85¹⁷ All comparative studies regarding collection methods usually focus on the number of *Anopheles* caught
86¹⁸ [18], the percentage of parous *An. darlingi* females [17,19,20], species richness [20,22] or biting behavior
87¹⁹ [23]. In contrast, none of these studies has ever established if the different collection methods collect the
88²⁰ same genetic populations of *An. darlingi*. Besides, it has not been reported either for other *Anopheles*
89²¹ species. Indeed, if different *An. darlingi* populations are captured by different methods, this would distort
90²² the study results of population genetic structure, which use more than one collection method. Furthermore, it
91²³ would be impossible to compare different studies which do not use the same collection method. With the
92²⁴ hesitation to use HLC as the standard anthropophilic *Anopheles* collection method, assessing the possible

93 distortion of genetic structure in the collected populations depending on the type of trap and the attractant is
94 mandatory. To date, no data has been published to unravel this fundamental methodological question
95 required to evaluate collection bias. This bias could then affect vector and malaria control.

96 There is also an interspecies difference for the biting rhythms. Some *Anopheles* species bite during the
97 first part of the night and others during the second part [24,25]. Given the variable periods of aggressiveness
98 of *Anopheles* species and even populations [12,23], the time of capture could also be at the origin of
99 selection bias in population genetic structure studies which use different capture time slots. It is therefore
100 necessary to investigate if the different times slots attract the same *An. darlingi* populations.

101 In order to test the hypothesis that different collection methods or time slots select different *Anopheles*
102 populations, *An. darlingi* mosquitoes were collected in French Guiana from sentinel sites using three
103 different collection methods: HLC and Mosquito Magnet® traps baited with octenol or lurex™. Five times
104 slots were also compared (evening, middle of the night and early morning and night *versus* day). Mosquitoes
105 were genotyped at microsatellite loci in order to compare genetic diversity and other usual parameters
106 between sampled populations.

108 **Methods**

109 **Mosquito collections**

110 All mosquitoes were caught in French Guiana, a French overseas territory located in the North-Eastern
111 South America where malaria transmission remains [26]. *Anopheles darlingi*, subgenus *Nyssorhynchus* is
112 considered as the major vector of malaria in French Guiana [27]. This territory is endemic for both
113 *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* [28].

114 *Anopheles darlingi* were collected in Blondin (03°52'30"N, 51°48'54"W) for all comparisons except for
115 the day/night comparison for which sampling was done at Dagobert (03°57'397 N 053°26'984 O) (**Figure**
116 **1**). Blondin is a hamlet located along the Oyapock River (at the border between French Guiana and Brazil)
117 near the town of Saint Georges de l'Oyapock. Dagobert is a gold mining site on the forest in French Guiana
118 center.

119 In order to compare collection methods, adult female mosquitoes were collected outdoors in Blondin
120 using human landing catch (HLC) or Mosquito Magnet® using octenol (that mimics human perspiring) or
121 lurex (that mimics naturally occurring human skin scents) as a mosquito attractant between September and
122 November 2013 (dry season) from 6:30 PM to 7:00 AM. To avoid possible selection biases related to the
123 position of the traps, a 3 x 3 Latin square was implemented. Three trap positions were delimited (**Figure 1**).
124 At each position one kind of trap was placed (HLC, Octenol Mosquito Magnet or Lurex Mosquito Magnet).
125 The trap was put only for one capture session then rotated at the next position for another capture session. A
126 capture session was performed between 6:30 PM one day and 07:00 AM the next day (Supplementary data -
127 **Table S1 and S2**).

128 Time slots comparisons were based on samples from Blondin where captures were carried out
129 continuously between 6:30 PM and 7:00 AM at each position except the HLC between 10:30 PM and 05:00
130 AM. For HLC, two humans perform HLC at each position.

131 For Day/night comparisons adult female mosquitoes were collected outdoors in Dagobert using only
132 HLC between November and December 2013 (dry season) from 7:00 AM to 10:30 PM.

133 To avoid a selection bias due to the season in the determination of the *Anopheles* genetic structure, all
134 mosquitoes were captured during a short period (3 months) in the same season. *An. darlingi* density and
135 density/hour/capture session was evaluated.

136 Outdoors, all mosquitoes were kept desiccated individually into microtubes then stored frozen until use
137 in the lab. They were identified using morphological taxonomic keys specific to the region [29,30].

138 **Extraction of DNA for genotyping**

140 DNA was extracted from one leg of each mosquito using the MagMax™ automate with MagMax™-96
141 DNA Multi-sample kit for 96-well reaction plate formats from Applied Biosystems®, Foster City,
142 California, USA, according to the manufacturer's recommendations (isolation of genomic DNA from solid
143 tissue). A one-hour incubation with proteinase K at 56°C was performed to disrupt samples without a
144 mechanical homogenizer.

146 **Microsatellite genotyping**

147¹ Nine microsatellites loci were genotyped (Supplementary data - **Table S3**). All of the primer pairs
 148² originate from the literature: seven were described by Conn *et al.* [31] and two primer pairs came from
 149³ Angèlla *et al.* [9]. The primer sequences of ADC01, ADC28, ADC110, ADC137, ADC138 and ADMP9 loci
 150⁴ were used without modification. Due to the lack of amplification for loci ADC02, ADC29 and ADC107,
 151⁵ primers were redesigned with Primer Express® software (Applied Biosystems®) as detailed in **Table S3**.

152⁶ These putative neutral microsatellites markers have not yet been mapped against *An. darlingi* chromosomes.

153⁷ Each locus was amplified by multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) using Type-it® Microsatellite
 154⁸ PCR from Qiagen®, Hilden, Germany, with fluorescently end-labeled (FAM™, NED™, PET™ or VIC™,
 155⁹ Applied Biosystems®) reverse primers. Two panels were composed. The first one mix ADC01, ADC28,
 156¹⁰ ADC29, ADC110 and ADC138 with an optimal annealing temperature of 64°C. The second panel was
 157¹¹ composed of ADC02, ADC107, ADC137 and ADMP9 with an optimal annealing temperature of 62°C. The
 158¹² PCR reactions were prepared containing 1x of Master Mix (contains HotStarTaq® Plus DNA Polymerase,
 159¹³ Type-it Microsatellite PCR Buffer with 6 mM MgCl₂ and dNTPs), 0.2 μM of each primer, RNase free-water
 160¹⁴ to complete the final volume of 20 μL and 5 μL of template DNA. Amplification were performed on a
 161¹⁵ Biometra®, Göttingen, Germany, T1 Thermocycler with the following conditions: 5 min at 95°C followed
 162¹⁶ by 28 cycles at 95°C for 30 s, annealing temperature of the panel for 90 s and 72°C for 30 s and closed with
 163¹⁷ 60°C for 45 min. For the capillary electrophoresis in ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer (Applied
 164¹⁸ Biosystems®), a mix was carried out with 20 μL formamide, 0.5 μL GeneScan™-500 LIZ® Size Standard
 165¹⁹ (Applied Biosystems®) and 1.5 μL of PCR product. Electrophoregrams were analyzed and sample files
 166²⁰ were generated using GeneMapper® software, version 3.7 (Applied Biosystems).

168 **Statistical Analyses**

169²¹ Comparisons of *Anopheles* densities between conditions were based on Fisher exact test. Frequency of
 170²² null alleles was tested for the nine microsatellite loci in MICRO-CHECKER V2.2.3. [32]. The genetic

171 variability of sampled vector populations was estimated using frequency of alleles at each locus and Nei's
172 unbiased expected heterozygosity (H_e) [33]. Hardy-Weinberg (HW) equilibrium tests (F_{IS}) and linkage
173 disequilibrium were performed using permutation procedure with GENETIX software, V4.05.2. [34].
174 Comparison of *An. darlingi* populations from different collection methods and time slots was based on
175 pairwise F_{ST} estimates [35,36]. P -values after sequential Bonferroni correction were obtained using FSTAT
176 software version 2.9.4 [37]. Permutation-based statistical tests were performed with 10,000 permutations.
177 Discriminant analysis of principal components (DAPC) [38] was performed with R [39] package, *Adegenet*
178 [40].

180 **Results**

181 *An. darlingi* field collection

182 A total of 3481 *An. darlingi* were caught in Blondin between September and November 2013
183 (Supplementary data - **Table S4.a.**). A subsample (n=431, Supplementary data - **Table S5**) was used to
184 assess selection bias according to collection methods and time slots. Because number of capture session was
185 different between the trap positions and the collection methods (Supplementary data - **Table S2**), the total
186 number of *An. darlingi* caught was presented by capture session. Because no human landing catch (HLC)
187 was performed between 10:30 PM and 05:00 AM (middle of the night), the *An. darlingi* density/hour was
188 calculated without this time slot except for the results according to the trap position (Supplementary data -
189 **Table S4.b.**). In Dagobert, a total of 264 *An. darlingi* were caught between November and December 2013
190 (Supplementary data - **Table S4.a.**). A subsample of 91 *An. darlingi* was used to compare population
191 caught during the night (N=55) *versus* the day (N=36) (Supplementary data - **Table S5**).

192 *An. darlingi* populations collected with different methods

193 *Anopheles* density was higher with HLC (79.7%, Fisher's exact test, $P < 0.0001$) and for the C trap
194 position (48.3%, Fisher's exact test, $P < 0.0001$) (Supplementary data - **Table S4.a.**). Considering the three
195 collection methods HLC, MM Octenol and MM Lurex, number of sampled *An. darlingi* were 2773, 342, and
196 366 respectively (supplementary data – **Table S4.a.**). Microsatellite genotyping was based on a subsample

197 of 431 *An. darlingi* ($N_{\text{HLC}} = 115$, $N_{\text{MM Octenol}} = 161$ and $N_{\text{MM-Lurex}} = 155$) (Supplementary data - **Table S5**). Of
 198 the 9 genotyped microsatellite loci, ADC28 was the least polymorphic (Allele number = 5 and $He < 0.45$)
 199 regardless of the capture method. Conversely, ADC01 was the most polymorphic (Allele number > 30 and
 200 $He > 0.929$). The results by loci are presented in **table 1** and supplementary data (**Table S6**). At locus
 201 ADC138, the significant departures from HWE, detected in all samples (Blondin and Dagobert) were due to
 202 nulls alleles according to tests implemented with MICRO-CHECKER software (data not shown). This
 203 marker was excluded in subsequent population structure analyses. Unbiased genetic diversity index (He)
 204 highlights high diversity regardless the collection methods ($He_{\text{HLC}} = 0.78$, $He_{\text{MM-Octenol}} = 0.78$, $He_{\text{MM-Lurex}} =$
 205 0.77). Considering F_{IS} , significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were detected at
 206 loci ADC01, ADC02, ADC28 and ADC110 after sequential Bonferroni correction ($P < 0.002$). Tests for
 207 linkage disequilibrium showed a significant association for the pair ADC107-ADC137.

208 Global (and locus-specific, data not shown) pairwise F_{ST} index do not point out significant genetic
 209 difference between *An. darlingi* populations sampled with the three different collection methods ($F_{\text{ST}} <$
 210 0.00146). The P -values range between 0.25 and 0.88 (**table 2**).

212 **Table 2. Genetic comparison of *An. darlingi* populations collected with three Collection methods**

39 Compared populations	40 HLC	41 MM Octenol	42 MM Lurex
43 HLC	44 -	45 0.00146	46 0.00069
47 MM Octenol	48 0.35000	49 -	50 -0.00039
51 MM Lurex	52 0.25000	53 0.88333	54 -

214 The three collection methods compared were : Human Landing Catch (HLC); Mosquito Magnet® baited with octenol
 215 (MM octenol); Mosquito Magnet® baited with lurex (MM lurex). Pairwise F_{ST} (above diagonal) are based on the
 216 genotyping of 8 loci microsatellites. Corresponding P -value (below diagonal) are implemented with 10000
 217 permutations with Fstat software and significant P -value must be < 0.01667 with Bonferroni correction.

219 Discriminant analysis of principal component (DAPC) exhibits three genetically similar populations as
 220 illustrated by three superimposed inertia ellipses (**Figure 2a**).

221 Considering the trap positions of the 3x3 Latin square, pairwise F_{ST} indexes between *An. darlingi*
 222 populations sampled at each position regardless the collection methods were non-significant. ($F_{ST} < 0.0016$
 223 with P -values > 0.11667).

224 ***An. darlingi* populations collected at different time slots**

225 Considering the three time slots compared (evening, middle of the night and early morning), the number
 226 of *An. darlingi* for genetic comparisons were 175, 114 and 142 respectively (Supplementary data – **Table**
 227 **S7**). Genetic diversity (H_e) over loci ranged from 0.77 (at middle of the night) to 0.78 (at evening).
 228 Significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were detected for a few samples at three
 229 loci: ADC01, ADC02 and ADC110 after sequential Bonferroni correction ($P < 0.002$) (**Table 1**). Tests for
 230 linkage disequilibrium showed a significant association for the pair ADC107-ADC137 (data not shown).

231 Pairwise F_{ST} indexes between *An. darlingi* populations sampled at different time slots are less than
 232 0.00002 (**Table 3**). These non-significant F_{ST} indexes (P -value > 0.7) highlight the absence of genetic
 233 differentiation between populations.

234 **Table 3. Genetic comparison of *An. darlingi* populations collected during different time slots**

	Evening [§]	Middle of the night [§]	Early morning [§]	Night [¶]	Day [¶]
Evening	-	-0.00025	-0.00132		
Middle of the night	0.70000	-	0.00002		
Early morning	0.95000	0.76667	-		
Night				-	-0.00151
Day				0.70000	-

236 *An. darlingi* populations were collected during different time slots – evening (06:30 PM – 10:30 PM), middle of the
 237 night (10:30 PM – 05:00 AM), early morning (05:00 AM – 07:00 AM) and Night (06:30 PM – 10:30 PM) versus Day
 238 (07:00 AM – 03:00 PM). Pairwise F_{ST} (above diagonal) are based on the genotyping of 8 loci microsatellites.
 239 Corresponding P -value (below diagonal) are implemented with 10,000 permutations with Fstat software and
 240 significant P -value must be < 0.01667 (< 0.05 for Day/Night comparison) with Bonferroni correction.

241 *An. darlingi* populations were collected in [§]Blondin and [¶]Dagobert.

242
 243
 244 Discriminant analysis of principal component (DAPC) plot illustrated this similarity with the three
 245 ellipses superimposed (**Figure 2b**).

246 As some *Anopheles*, especially in the forest, can be aggressive during the day, nycthemeral pattern of
247 collected populations was also studied at the Dagobert site [41]. This day/night comparison included two
248 time slots from 7:00AM to 3:00PM versus 6:30PM to 10:30PM. The *An. darlingi* genotyped were 36 and 55
249 respectively. Genetic diversities (He) were 0.75 (day) and 0.74 (night) (Table 1). Significant departures
250 from HWE after sequential Bonferroni correction ($P < 0.003$) were detected at ADC02, ADC28 and
251 ADC107. Tests for Linkage disequilibrium showed no significant association except for the pair ADC28-
252 ADC107. Pairwise F_{ST} indexes between *An. darlingi* populations sampled at daytime and nighttime was
253 non-significant (P -value = 0.7) (Table 3). This absence of genetic differentiation between these two
254 populations was illustrated by DAPC plot (Figure 2c).

256 Discussion

257 Molecular biology tools are more and more used in entomology. Their sensitivity makes it possible to
258 address new questions. Non-standardized sampling of anopheles, using variable collection methods,
259 involves risks of selection bias that can now be documented. The present study was designed to determine
260 whether collection methods or trapping times could bias the conclusions on the genetic structure of the *An.*
261 *darlingi* populations in French Guiana.

262 Collection methods and sampling bias of *An. darlingi*

263 The different collection methods may obviously lead to variations in the vector species sampled [42].
264 Our results confirm quantitative and even qualitative variations (details elsewhere [20]) according to the trap
265 used. In agreement with the literature [20], the Human Landing Catch (HLC), which has allowed the capture
266 of more than 70% of *Anopheles darlingi*, was more effective than the Mosquito Magnet® trap with
267 attractants (Octenol or Lurex) ($P < 0.0001$).

268 Despite these differences in Anopheline density, genetic diversity does not vary and remains high ($He >$
269 0.77) regardless of the collection method used. This level of genetic diversity is similar to those observed in
270 previous studies with the same microsatellite markers [43,9,8]. Moreover, index of differentiation (pairwise
271 F_{ST}) did not point out any difference between populations trapped by HLC, MM-Octenol and MM-Lurex, as

272 illustrated by the DAPC. These three different collection methods could therefore be used in a combined
273 way to assess the genetic structure of *Anopheles darlingi* populations. The comparison of different studies
274 using different traps should therefore be methodologically acceptable. Thus, the MosquitoMagnet®
275 previously identified as the best alternative to the controversial HLC [20] should therefore be used without
276 generating bias on the allele frequencies and vector population genetics.

277 This lack of observable bias in our study may seem to be inconsistent with previously observed genetic
278 differences between *An. vestitipennis* populations with different host preferences [12]. These discrepancies
279 raise two questions: i) the sensitivity of our molecular tools and their capacity to highlight a possible bias
280 and ii) the relevance of our study site and the possibility of encountering sympatric vector populations there.

281 The microsatellites used were chosen because they had already made it possible to highlight the genetic
282 structure [43–46] or even microstructure within *An. darlingi* populations [9]. Moreover, our data show an
283 important genetic polymorphism of microsatellites with an average of 17 alleles (range from 7 to 38). The
284 discriminating power of our markers is such that no genotype was found more than once in our entire
285 sample. As example, considering the genetic diversity (He) at each locus, the probability of sampling two
286 genetically identical *An. darlingi* with HLC would be $1.4 \cdot 10^{-12}$. Nevertheless, in a previous study, the power
287 of some of these markers seemed insufficient to reveal certain genetic microstructures in Brazilian *An.*
288 *darlingi* populations [8]. But having more than doubled the size of the populations compared to this previous
289 study and with an additional marker our protocol should allow a gain in power in the comparison of
290 populations. We have in fact highlighted genetic differences between *An. darlingi* populations from the two
291 sites of our study (Blondin and Dagobert), suggesting a sufficient power of our markers to detect genetic
292 differences between populations.

293 Concerning the choice of the site, it was impossible for us to know, *a priori*, if several populations of *An.*
294 *darlingi* cohabited in Blondin. However, the proximity of larval habitats, the omnipresence of the forest and
295 the surrounding human activities gave reason to expect significant diversity. The heterozygous deficits (F_{IS}
296 > 0) in our populations (Blondin) could have been caused by genetic microstructures. A 3x3 Latin square
297 system had been set up to take this microstructure into account in the analyses. However, rare linkage

298 disequilibria observed suggest an artefactual origin of these deviations related to the presence of null alleles,
299 as mentioned in another study [43]. And the absence of significant F_{ST} between the populations collected at
300 the different positions of the Latin square is in favor of an absence of microstructure. Our results appear to
301 be consistent with a previous study that failed to show any genetic difference between populations with
302 different trophic behavior (indoors vs. outdoors) [23]. The observed behavioral diversity could be due to the
303 high plasticity described in *An. darlingi* [6] without causing reproductive isolation of individuals.

304 *An. darlingi* populations according to the time slots

306 Our comparisons of *An. darlingi* populations collected during different time slots were carried out on
307 two sites, Blondin and Dagobert (Day/Night comparison). In Blondin, *Anopheles* density was higher at
308 evening (6:30 PM – 10:30 PM) (51.6%, Fisher's exact test, $p = 0.011$). In Dagobert, *An. darlingi* density was
309 higher at night (6:30 PM to 10:30 PM) (92%, Fisher's exact test, $p < 0.0001$). It is concordant with the *An.*
310 *darlingi* bio-ecology. Indeed, in Blondin, *An. darlingi* has shown a biting activity with a peak between 8:30
311 PM and 10:30 PM or a plateau throughout the night, depending on the season [47]. In Dagobert, even if *An.*
312 *darlingi* bites mainly after dusk, it was caught all day-long: in the evening (6:30 PM – 10:30 PM) and during
313 the day (7:00 AM and 3:00 PM).

314 In spite of these variations in density, the genetic diversity observed remains stable through the night (*He*
315 ranged from 0.771 to 0.779) and even in daytime populations (*He* 0.736 vs 0.754). In both sites, no *An.*
316 *darlingi* population genetic structure was observed according to the time slots. This is consistent with a
317 recent study [23], the only one to our knowledge that has compared *An. darlingi* populations collected at
318 different time slots (dusk versus dawn) using Genome-wide SNPs. Despite a non-aleatory distribution of
319 SNP related to behavior, they were not able to highlight a population structure. Interpretation of these
320 discrepancies is difficult in the absence of the fully annotated *An. darlingi* genome. Nevertheless, they
321 suggest the possible presence of markers associated with trophic behavior that does not lead to reproductive
322 isolation.

323 Our study was carried out in Blondin Village, along the Oyapock River (natural border with Brazil) and
324 in Dagobert, in the center of French Guiana where the Amazon forest dominate. Although, *An. darlingi* was
325 captured in two different ecologic sites, the same conclusions were made. Consequently, *An. darlingi*
326 settlement does not change the fact that mosquitoes at all time slots can be used to study *Anopheles*
327 population genetics with our microsatellite markers.

329 **Conclusion**

330 As part of malaria vector control programs, the entomological surveillance needs to catch *Anopheles* on
331 the scale of a country or a continent. Most of the time, several teams and laboratory step in the mosquitoes'
332 capture. Accordingly, the capture protocols (traps, time slot) can be different. Nevertheless, for genetic
333 population studies, the results can be mutualized and compared.

334 In this study, using microsatellite markers, we did not find any difference between *An. darlingi*
335 populations caught with different collection methods (HLC, MM octenol and MM lurex) or time slots
336 (evening, middle of the night, early morning or day). Indeed, *An. darlingi* captured with different collection
337 method and at any time can be used as part of population genetic structure studies and allow to compare the
338 results of different studies.

339
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

340 **Additional files**

341 1 **Table S1.** Collection method according to the trap position and the capture session date.

342 4 **Table S2.** Total capture sessions according to the trap position and the collection methods.

343 7 **Table S3.** Repeats and primer sequences of the microsatellite loci designed for *An. darlingi*.

344 9 **Table S4.** Total *Anopheles darlingi* caught per time slots, collection methods and trap position.

345 12 **Table S5.** Number of *An. darlingi* genotyped according to the collection methods and the trap position.

346 15 **Table S6.** Allele number for *An. darlingi* populations according to the collection methods and time slots.

347 18 **Table S7.** Number of *An. darlingi* genotyped according to the time slots and the trap position.

349 24 **Abbreviation**

350 27 BIC: Bayesian information criterion; DAPC: Discriminant Analysis of Principal Components; EIR:

351 30 Entomological Inoculation Rate; HBR: Human Biting Rate; He: expected heterozygosity; HLC: Human

352 32 Landing Catch; HWE: Hardy Weinberg Equilibrium; MM octenol: Mosquito Magnet® baited with octenol;

353 34 MM lurex: Mosquito Magnet® baited with lurex; PCR: Polymerase Chain Reaction

354 38 **Acknowledgement**

355 41 The authors thank the health centre, DAAC association and Camp Bernet staff of Saint-George's town for

356 44 their assistance during this study.

358 48 **Author's contributions**

359 52 HB, ID, SB, MN and RG conceived the study, SV contributed to the design of the experiments. SV, AA,

360 54 VPS, PG, RC, JI, ID, RG and SB performed field collections. CN and LF processed molecular assays. LF,

361 57 HB and SB analysed and interpreted data. LF, HB, MN and SB wrote the manuscript. All authors read and

362 59 approved the final version of the manuscript.

363 **Funding**

364 1 Financial support was made available by ARS (Conventions n°12-49/ARS du 11 juillet 2012 and n°13-
365 2 3
365 4 83/ARS du 28 juin 2013), and by the French Armed Forces (Grant LR607e). This work has also benefited
366 5
366 6 from an “Investissement d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-
367 7
367 8 10-LABX-25-01). Likewise, this study received a European commission "REGPOTCT-2011-285837-
368 9
368 10 STRonGer" Grant within the FP7.
368 11
368 12

369 13

370 14 **Availability of data and materials**

371 15
371 16
371 17
371 18
371 19 The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable
372 20
372 21 request.
372 22
372 23

373 24

374 25 **Ethics approval and consent to participate**

375 26
375 27
375 28
375 29 For HLC, female mosquitoes were collected with the aid of mouth aspirators when landing on collector legs.
376 30
376 31
376 32 Collectors were local volunteering residents. They were provided training on HLC and informed of the
377 33
377 34 associated risks of the collection method and were supervised during the captures by the authors. Malaria
378 35
378 36 prophylaxis was proposed and information on the medication was provided. Collectors who benefited from
379 37
379 38 prophylaxis gave their free, express and informed consent.
379 39
379 40
379 41

380 42

381 43 **Competing interests**

382 44
382 45
382 46
382 47
382 48 The authors declare that they have no competing interests
382 49
382 50

383 51

384 52

385 53

386 54

387 55

388 56

388 57
388 58
388 59
388 60
388 61
388 62
388 63
388 64
388 65

389 **Author details**

- 390 1 ¹ Vectopôle Amazonien Emile Abonnenc, Institut Pasteur de la Guyane, 23 Avenue Pasteur, BP 6010,
2
391 3 97306 Cayenne Cedex, French Guiana
4
5
6
392 7 ² Parasitology and Entomology Unit, Microbiology and Infectious Diseases Department, French Armed
8
393 9 Forces Institute for Biomedical Research (IRBA), Marseille, France.
10
11
394 12 ³ IRD, AP- HM, UMR Vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéenne (VITROME), Aix Marseille
13
14
395 15 Université, Marseille, France.
16
17
396 18 ⁴ IHU Méditerranée Infection, Marseille, France
19
20
397 21 ⁵ Centre d’Investigation Clinique Antilles- Guyane – Inserm1424, Cayenne Hospital, Cayenne, French
22
23
398 24 Guiana
25
26
399 27 ⁶ Epidemiology of Tropical Parasitoses, EA 3593, Université de Guyane, Cayenne, French Guiana
28
29
30
400 31 ⁷ French Armed Forces Centre for Epidemiology and Public Health (CESPA), Marseille, France
32
33
401 34 ⁸ Global Health Department, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France
35
36
402 37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

403 References

- 404
405¹ 1. Macdonald G. The epidemiology and control of malaria. Lond Oxf Univ Press. 1957;
406²
407³ 2. Reis IC, Codeço CT, Câmara DCP, Carvajal JJ, Pereira GR, Keppeler EC, et al. Diversity of *Anopheles* spp.
408⁴ (Diptera: Culicidae) in an Amazonian Urban Area. *Neotrop Entomol.* 2018;47:412–7.
409⁵
410⁶ 3. Fouque F, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Girod R. Annual variations in the number of malaria cases related to two
411⁷ different patterns of *Anopheles darlingi* transmission potential in the Maroni area of French Guiana. *Malar J.*
412⁸ 2010;9:80.
413⁹
414¹⁰ 4. Adde A, Dusfour I, Vezenegho SB, Carinci R, Issaly J, Gaborit P, et al. Spatial and Seasonal Dynamics of
415¹¹ *Anopheles* Mosquitoes in Saint-Georges de l'Oyapock, French Guiana: Influence of Environmental Factors. *J Med*
416¹² *Entomol.* 2017;54:597–605.
417¹³
418¹⁴ 5. Epelboin Y, Chaney SC, Guidez A, Habchi-Hanriot N, Talaga S, Wang L, et al. Successes and failures of sixty
419¹⁵ years of vector control in French Guiana: what is the next step? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113:e170398–
420¹⁶ e170398.
421¹⁷
422¹⁸ 6. Conn JE, Ribolla PE. Chapter 5 - Ecology of *Anopheles darlingi*, the Primary Malaria Vector in the Americas and
423¹⁹ Current Nongenetic Methods of Vector Control. In: Adelman ZN, editor. *Genet Control Malar Dengue* [Internet].
424²⁰ Boston: Academic Press; 2016. p. 81–102. Available from:
425²¹ <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002469000053>
426²²
427²³ 7. Moutinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi*
428²⁴ in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malar J.* 2011;10:174.
429²⁵
430²⁶ 8. Campos M, Conn JE, Alonso DP, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Microgeographical structure in the major
431²⁷ Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasit Vectors.* 2017;10:76–
432²⁸ 76.
433²⁹
434³⁰ 9. Angêlla AF, Salgueiro P, Gil LHS, Vicente JL, Pinto J, Ribolla PEM. Seasonal genetic partitioning in the
435³¹ neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Malar J.* 2014;13:203.
436³²
437³³ 10. Sawadogo SP, Costantini C, Pennetier C, Diabaté A, Gibson G, Dabiré RK. Differences in timing of mating
438³⁴ swarms in sympatric populations of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. (formerly *An. gambiae* M and S
439³⁵ molecular forms) in Burkina Faso, West Africa. *Parasit Vectors.* 2013;6:275–275.
440³⁶
441³⁷ 11. Guelbeogo WM, Sagnon N, Liu F, Besansky NJ, Costantini C. Behavioural divergence of sympatric *Anopheles*
442³⁸ *funestus* populations in Burkina Faso. *Malar J.* 2014;13:65.
443³⁹
444⁴⁰ 12. Arredondo-Jiménez JJ, Gimnig J, Rodríguez MH, Washino RK. Genetic differences among *Anopheles*
445⁴¹ *vestitipennis* subpopulations collected using different methods in Chiapas state, southern México. *J Am Mosq Control*
446⁴² *Assoc. United States;* 1996;12:396–401.
447⁴³
448⁴⁴ 13. Wondji C, Simard F, Fontenille D. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S
449⁴⁵ within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol.* 2002;11:11–9.
450⁴⁶
451⁴⁷ 14. Harischandra IN, Dassanayake RS, De Silva BGDNK. Three sympatric clusters of the malaria vector *Anopheles*
452⁴⁸ *culicifacies* E (Diptera: Culicidae) detected in Sri Lanka. *Parasit Vectors.* 2016;9:3.
453⁴⁹
454⁵⁰ 15. Cornel AJ, Brisco KK, Tadei WP, Secundino NF, Rafael MS, Galardo AK, et al. *Anopheles darlingi* polytene
455⁵¹ chromosomes: revised maps including newly described inversions and evidence for population structure in Manaus.
456⁵² *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111:335–46.
457⁵³
458⁵⁴ 16. WHO. Sampling malaria vector. *Malar Entomol Vector Control - Guide Particip - Train Module Malar Control.*
459⁵⁵ 2013. p. 31.
460⁵⁶
461⁵⁷
462⁵⁸
463⁵⁹
464⁶⁰
465⁶¹

- 445 17. Lima JBP, Rosa-Freitas MG, Rodovalho CM, Santos F, Lourenço-de-Oliveira R. Is there an efficient trap or
446 collection method for sampling *Anopheles darlingi* and other malaria vectors that can describe the essential parameters
447 affecting transmission dynamics as effectively as human landing catches? - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz.
448 1 2014;109:685–705.
2
- 449 3 18. Briet O, Huho B, Ginnig J, Bayoh N, Seyoum A, Sikaala C, et al. Applications and limitations of Centers for
450 4 Disease Control and Prevention miniature light traps for measuring biting densities of African malaria vector
451 5 populations: a pooled-analysis of 13 comparisons with human landing catches. Malar J. 2015;14:247.
6
- 452 7 19. Gama RA, Da Silva IM, Geier M, Eiras AE. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-
453 8 landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:763–71.
9
10
- 454 11 20. Vezenegho SB, Adde A, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Pommier de Santi V, et al. Mosquito magnet® liberty plus
455 12 trap baited with octenol confirmed best candidate for *Anopheles* surveillance and proved promising in predicting risk
456 13 of malaria transmission in French Guiana. Malar J. 2014;13:384.
14
- 457 15 21. Service MW. A critical review of procedures for sampling populations of adult mosquitoes. Bull Entomol Res.
458 16 1977;67:343--382.
17
- 459 18 22. Dusfour I, Carinci R, Gaborit P, Issaly J, Girod R. Evaluation of four methods for collecting malaria vectors in
460 19 French Guiana. J Econ Entomol. 2010;103:973–6.
20
21
- 461 22 23. Campos M, Alonso DP, Conn JE, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Genetic diversity of *Nyssorhynchus*
462 23 (*Anopheles*) *darlingi* related to biting behavior in western Amazon. Parasit Vectors. 2019;12:242.
24
- 463 25 24. Hamon J. Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta) : cycles
464 26 d'agressivité et variations saisonnières. Ann Société Entomol Fr. 1963;85–144.
27
28
- 465 29 25. Tananchai C, Pattanakul M, Nararak J, Sinou V, Manguin S, Chareonviriyaphap T. Diversity and biting patterns of
466 30 *Anopheles* species in a malaria endemic area, Umphang Valley, Tak Province, western Thailand. Acta Trop.
467 31 2019;190:183–92.
32
- 468 33 26. Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Saldanha R, Guidez A, Gomes MS, et al. Resurgence risk for malaria, and the
469 34 characterization of a recent outbreak in an Amazonian border area between French Guiana and Brazil. BMC Infect
470 35 Dis. 2020;20:373.
36
- 471 37 27. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of
472 38 dominant malaria vectors. Parasit Vectors. 2012;5:69.
39
40
- 473 41 28. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of
474 42 the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:525–33.
43
- 475 44 29. Floch H, Abonnenc E. Anophèles de la Guyane Française. Arch Inst Pasteur Guyane Territ Inini. 1951;236:1–92.
45
- 476 46 30. Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera:
477 47 Culicidae). Mosq Syst. 1981;13.
48
- 478 49 31. Conn JE, Bollback JP, Onyabe DY, Robinson T, Wilkerson RC, Pova MM. Isolation of polymorphic
479 50 microsatellite markers from the malaria vector *Anopheles darlingi*. Molecular Ecology Notes. 2001;223–5.
51
52
- 480 53 32. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. micro-checker: software for identifying and correcting
481 54 genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes. 2004;4:535–8.
55
- 482 56 33. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics.
483 57 1978;89:583–90.
58
- 484 59 34. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows pour la
485 60 génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Univ Montp II Montp
486 61 Fr. 2004;
62
63
64
65

487 35. Wright S. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating.
488 Evolution. [Society for the Study of Evolution, Wiley]; 1965;19:395–420.

489 1 36. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. Evolution.
490 2 1984;38:1358–70.
491 3

491 4 37. GOUDET J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3.
492 5 <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> [Internet]. 2001; Available from:
493 6 <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029733720/en/>
494 7

494 9 38. Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis
495 10 of genetically structured populations. BMC Genet. 2010;11:94.
496 11

496 12 39. R Core Team Rf. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing
497 13 Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>; 2018.
498 14

498 15 40. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. Bioinforma Oxf Engl.
499 16 2011;27:3070–1.
500 17

500 18 41. Pommier de Santi V, Dusfour I, de Parseval E, Lespinet B, Nguyen C, Gaborit P, et al. Risk of daytime
501 19 transmission of malaria in the French Guiana rain forest. Med Sante Trop. 2017;27:111–2.
502 20

502 22 42. Wong J, Bayoh N, Olang G, Killeen GF, Hamel MJ, Vulule JM. Standardizing operational vector sampling
503 23 techniques for measuring malaria transmission intensity: evaluation of six mosquito collection methods in western
504 24 Kenya. Malar J. 2013;12:143.
505 25

505 26 43. Scarpassa VM, Conn JE. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera:
506 27 Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. Mem Inst Oswaldo Cruz. Brazil; 2007;102:319–
507 28 27.
508 29

508 31 44. Mirabello L, Vineis JH, Yanoviak SP, Scarpassa VM, Póvoa MM, Padilla N, et al. Microsatellite data suggest
509 32 significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South
510 33 America. BMC Ecol. 2008;8:3.
511 34

511 35 45. Lainhart W, Bickersmith SA, Nadler KJ, Moreno M, Saavedra MP, Chu VM, et al. Evidence for temporal
512 36 population replacement and the signature of ecological adaptation in a major Neotropical malaria vector in Amazonian
513 37 Peru. Malar J. 2015;14:375.
514 38

514 40 46. Rosero CY, Jaramillo GI, Gonzalez R, Cardenas H. Genetic Differentiation of Colombian Populations of
515 41 *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). Neotrop Entomol. 2017;46:487–98.
516 42

516 43 47. Vezenegho SB, Adde A, Pommier de Santi V, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, et al. High malaria transmission in a
517 44 forested malaria focus in French Guiana: How can exophagic *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention
518 45 measures? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111:561–9.
519 46

519 47
520 48
520 49
521 50
521 51
522 52
522 53
522 54
523 55
523 56
524 57
524 58
524 59
525 60
525 61
525 62
525 63
525 64
525 65

526 **Figure 1. Map of collection sites of *An. darlingi* in Blondin, French Guiana September and November 2013**

527

528 Map and coordinates obtained from openstreet map, IGN and SIG Guyane. GPS coordinates of each position: position
529 1 A: 3°52'32.42"N, 51°48'54.98"O ; position B: 3°52'32.85"N, 51°48'51.39"O ; position C: 3°52'35.71"N,
530 2 51°48'48.66"O. , Distances between each trap position: 230 meters between positions A and C, 111 meters between
531 3 positions A and B, 146 meters between positions B and C.
532 4

532 5

532 6

533 7 **Figure 2. Clustering of *An. darlingi* populations by DAPC based on 8 loci microsatellites**

534 9 **2a.** Comparison of three capture method with 422 mosquitoes caught in Blondin, **2b.** Comparison of three time slots
535 10 on night with 422 mosquitoes caught in Blondin: evening (06:30 PM – 10:30 PM), middle of the night (10:30 PM –
536 11 05:00 AM), early morning (05:00 AM – 07:00 AM), **2c.** Comparison of two time slots with 91 mosquitoes caught in
537 12 Dagobert: night (06:30 PM – 10:30 PM) and day (07:00 AM – 03:00 PM).
537 13

537 14

538 15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

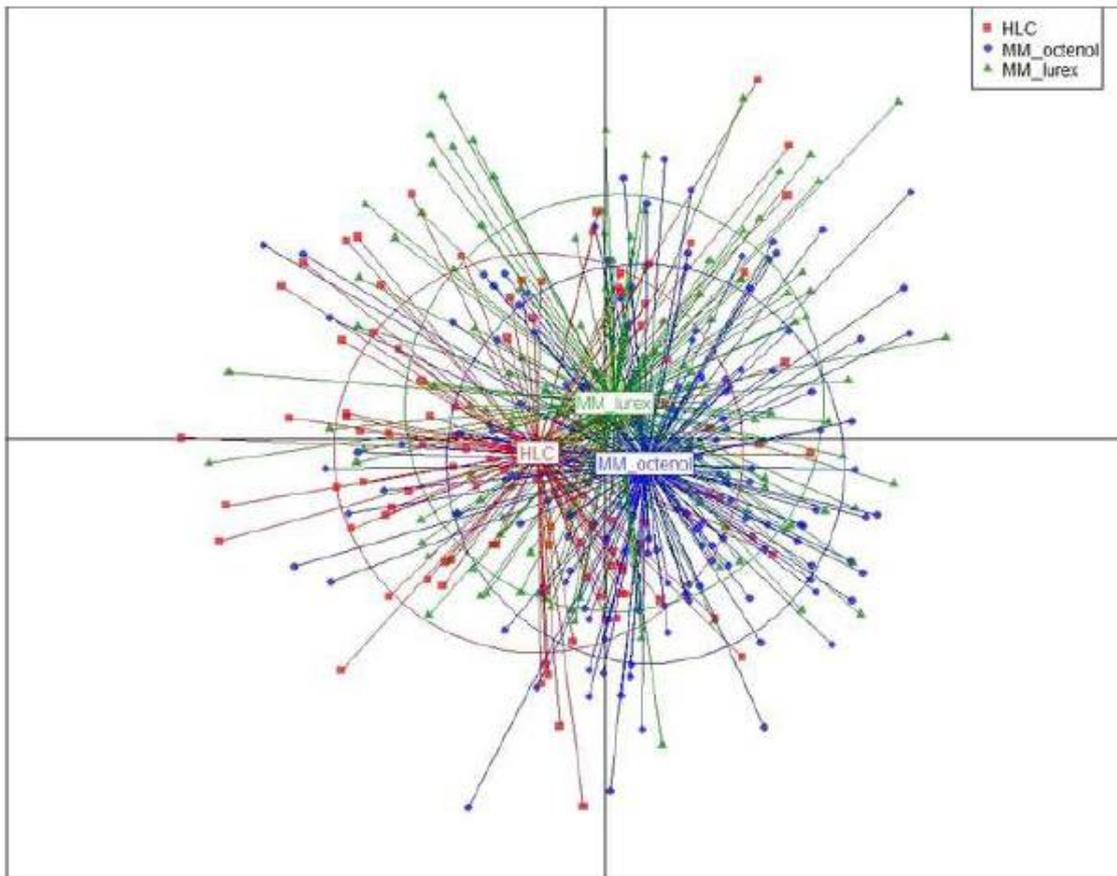
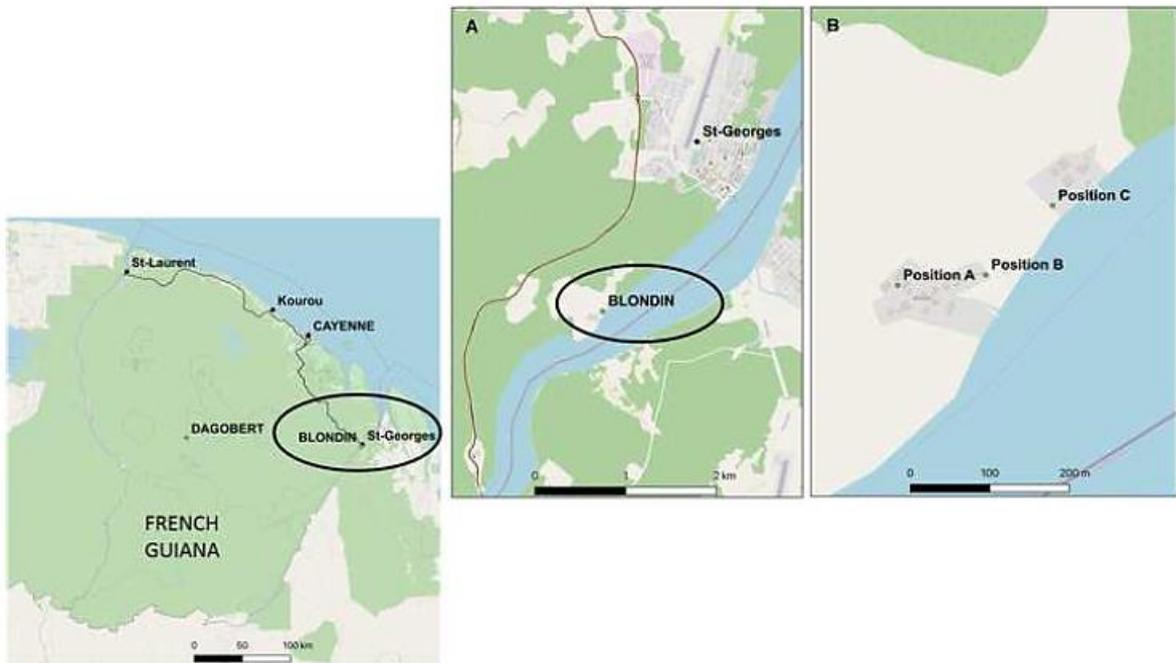
64

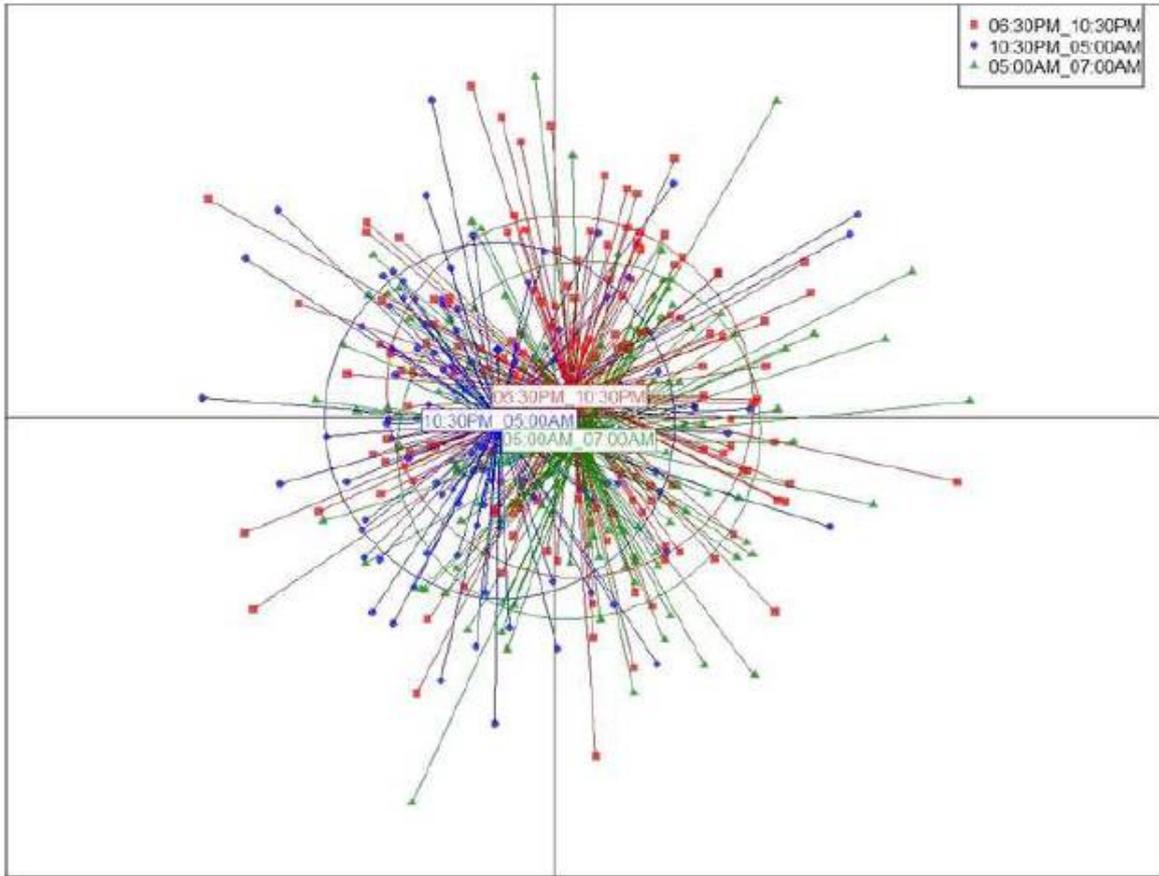
65

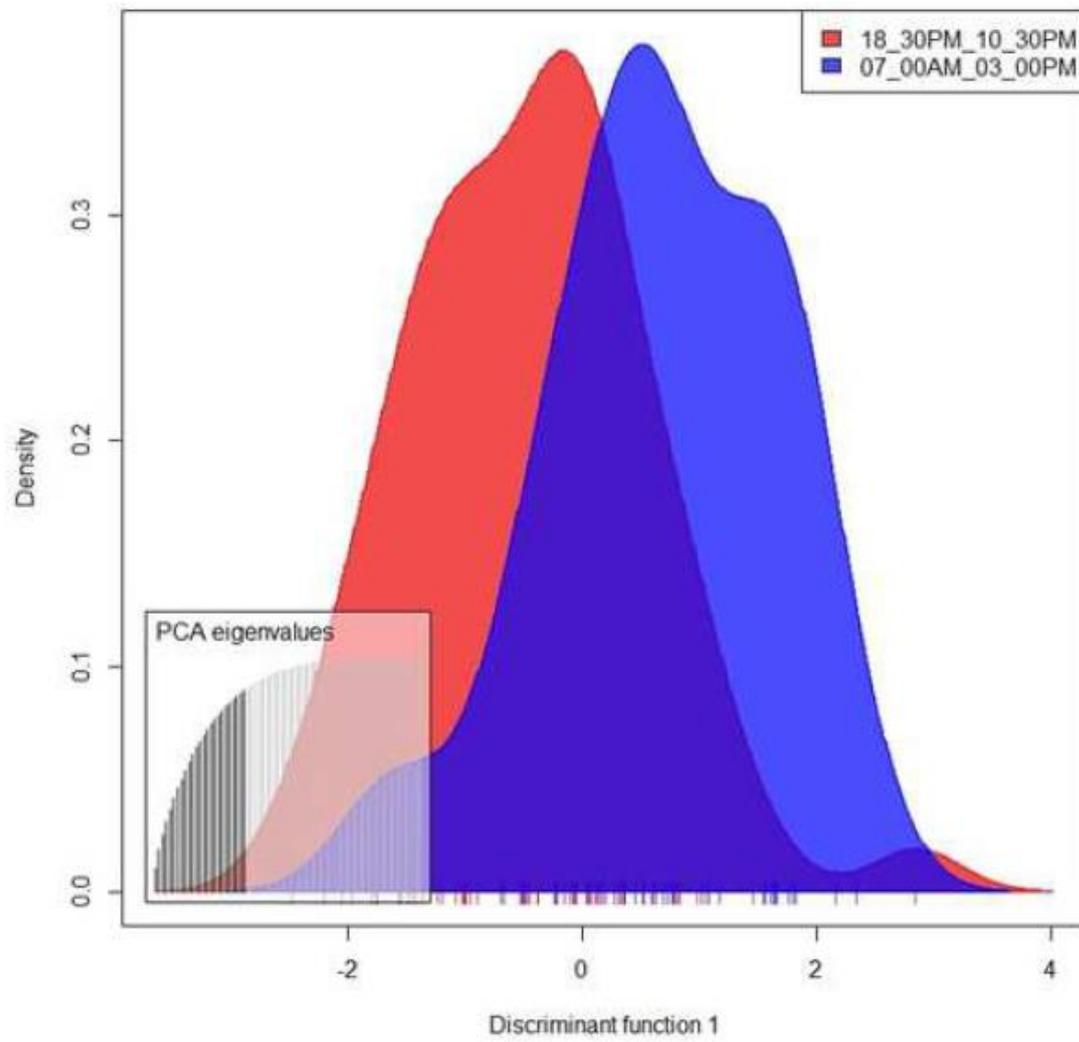
Table 1. Genetic diversity in populations of *An. Darlingi* depending on collection methods and time slots

Allele size (bp) N=522	Allele number N=522	COLLECTION METHODS (N=431)												TIMES SLOTS (N=431)						NYCTHEMERAL ACTIVITY (N=91)					
		HLC N=115			MM Octenol N=161			MM Lurex N=155			Evening N=175			Middle of the night N=114			Early morning N=142			Night [§] N=55		Day [§] N=36			
		He	F _{IS}	F _{IS}	He	F _{IS}	F _{IS}	He	F _{IS}	F _{IS}	He	F _{IS}	F _{IS}	He	F _{IS}	F _{IS}	He	F _{IS}	He	F _{IS}	He	F _{IS}			
ADC01	153-263	0.933	0.113*	0.941	0.102*	0.929	0.106*	0.935	0.085	0.928	0.152*	0.935	0.094*	0.884	0.034	0.865	0.005	0.884	0.034	0.865	0.005	0.884	0.034	0.865	0.005
ADC02	131-223	0.883	0.315*	0.862	0.374*	0.867	0.227*	0.880	0.306*	0.855	0.324*	0.868	0.290*	0.843	0.365*	0.878	0.052	0.843	0.365*	0.878	0.052	0.843	0.365*	0.878	0.052
ADC28	125-137	0.450	-0.013	0.421	0.159*	0.441	0.107	0.438	0.122	0.430	0.123	0.436	0.031	0.326	0.774*	0.499	0.717*	0.326	0.774*	0.499	0.717*	0.326	0.774*	0.499	0.717*
ADC29	246-316	0.829	0.036	0.838	0.023	0.844	0.008	0.835	0.009	0.849	0.083	0.830	-0.016	0.775	-0.100	0.786	0.154	0.775	-0.100	0.786	0.154	0.775	-0.100	0.786	0.154
ADC107	125-201	0.668	0.199	0.714	0.086	0.697	0.102	0.712	0.096	0.694	0.077	0.677	0.189	0.724	0.615*	0.706	0.729*	0.724	0.615*	0.706	0.729*	0.724	0.615*	0.706	0.729*
ADC110	160-184	0.819	0.074	0.803	0.056	0.779	0.100	0.797	0.034	0.794	0.239*	0.818	0.015	0.666	0.073	0.633	0.080	0.666	0.073	0.633	0.080	0.666	0.073	0.633	0.080
ADC137	121-149	0.791	0.024	0.771	0.001	0.747	-0.062	0.764	-0.023	0.761	0.008	0.783	-0.016	0.842	0.006	0.820	0.017	0.842	0.006	0.820	0.017	0.842	0.006	0.820	0.017
ADMIP9	166-214	0.872	0.023	0.863	-0.015	0.875	0.042	0.872	0.043	0.859	-0.021	0.875	0.011	0.831	0.082	0.841	0.076	0.831	0.082	0.841	0.076	0.831	0.082	0.841	0.076
Total		0.781	0.103	0.776	0.097	0.772	0.079	0.779	0.084	0.771	0.125	0.778	0.076	0.736	0.184	0.754	0.196	0.736	0.184	0.754	0.196	0.736	0.184	0.754	0.196

Genetic diversity in populations of *An. Darlingi* from French Guyana depending on collection methods and time slots: Range of allele size, allele number, genetic diversity (*He*: expected diversity) and deviation (*F_{IS}*) from Hardy-Weinberg Equilibrium based on 8 microsatellite loci. Corresponding time slot: evening: 06:30 PM – 10:30 PM; middle of the night: 10:30 PM – 05:00 AM; early morning: 05:00 AM – 07:00 AM; night: 06:30 PM – 10:30 PM and day: 07:00 AM – 03:00 PM. HLC: Human Landing Catch; MM octenol: Mosquito Magnet® baited with octenol; MM lurex: Mosquito Magnet® baited with lurex. * Significant disequilibrium from Hardy-Weinberg Equilibrium, after Bonferroni correction (*P*-value < 0.002), § Sampling to compare day-time versus night-time populations was conducted in Dagobert site (N=91), the other samples to compare collection methods and time slots were taken from Blondin (N=431). In bold: Presence of null alleles as estimated by Micro-checker, N: Sample size.







2. Structure génétique des populations d'*Anopheles darlingi* en Guyane

Une structuration des populations d'*An. darlingi* a été montrée en Amérique du Sud ailleurs qu'en Guyane : entre la Bolivie, le Venezuela et le Brésil, entre le Brésil, le Pérou et l'Amérique centrale mais aussi à l'échelle du Brésil seul ou de la Colombie (Conn et al. 1999; Scarpassa et Conn 2007; González et al. 2007; Mirabello et al. 2008; Rosero et al. 2017; Prussing et al. 2019). Aucune donnée à l'échelle de la Guyane n'était cependant disponible à l'initiation de nos travaux.

Comme abordé à la sous-section **2.3.3.**, nous avons observé en Guyane un comportement différent d'*An. darlingi* entre les populations des fleuves, du littoral et des sites d'orpaillage en forêt. Le long des fleuves Maroni (Twenké, Taluen et Cayodé) et Oyapock (Camopi), le pic de densité se situe entre avril et juin, en saison des pluies (Girod et al. 2008; 2011) avec un taux de piqûre important toute l'année mais très variable selon les années à Twenké (Fouque et al. 2010). Au contraire, sur le littoral (Macouria et Saint-Georges [embouchure du fleuve Oyapock]), le pic de densité se situe entre septembre et novembre en saison sèche. De plus, le pic d'agressivité a lieu au crépuscule (18h à 22h) sur le littoral et le Maroni (Dusfour et al. 2013) mais un peu plus tard sur l'Oyapock (21h30-3h30) (Girod et al. 2008) alors qu'en pleine forêt, 15,7 % des anophèles ont piqué en pleine journée (Pommier de Santi et al. 2017).

Cette variabilité des comportements d'*An. darlingi* observés en Guyane suggère une hétérogénéité des populations de cette espèce à l'échelle de ce département. La supposition de l'existence de deux sous populations sur le fleuve Maroni avait d'ailleurs déjà été émise (Fouque et al. 2010), mais sans aucune étude de génétique des populations permettant de tester cette hypothèse. Une meilleure connaissance des populations vectorielles à l'échelle de la Guyane apparaît aujourd'hui comme une nécessité. Les informations sur la structure des populations anophéliennes et leur dynamique en Guyane permettraient d'en optimiser la surveillance et la lutte. Comment choisir entre pulvérisations extérieures ou intradomiciliaire si la variabilité des comportements trophiques d'un vecteur est inconnue ? Comment surveiller les niveaux de résistance aux insecticides si la dynamique des populations n'est pas prise en compte ? La réponse à ces questions repose sur une meilleure compréhension de la structure des populations d'*An. darlingi* en Guyane.

Nous avons sélectionné 1881 *An. darlingi* dont les heures de captures et les protocoles de collecte pouvaient varier. Les moustiques ont été capturés sur 14 sites en Guyane. Sept sites sont répartis sur le littoral (Kourou, Matoury, Cacao, Régina, Saint-Georges, Blondin et Saut-Maripa) et sept autres sont situés en forêt : à l'est sur l'Oyapock (Camopi), l'ouest sur la Maroni (Midenangalanti et Bois Martin) et en pleine forêt (Dorlin, Dagobert, Sikini et Alikéné). Des captures ont également été effectuées à l'ouest du Suriname en forêt, à Mozeskreek. Les moustiques ont ensuite été génotypés au niveau de 9 marqueurs microsatellites décrits dans la littérature.

Sur la base des fréquences alléliques au niveau de ces marqueurs, une mesure de la diversité génétique des populations d'*An. darlingi* a été effectuée dans chaque localité. Les comparaisons des populations entre localités ont été basées sur l'index

de différenciation génétique (F_{ST}). Une analyse de regroupement (« clustering ») des génotypes avec ou sans prise en compte du lieu de prélèvement a été effectuée pour mettre en évidence d'éventuelles structures des populations sans *a priori*. Les deux méthodes implémentées, l'analyse discriminante en composante principale (DAPC) et l'inférence bayésienne (à l'aide du logiciel STRUCTURE [Pritchard et al. 2000]), ont été confrontées.

L'article suivant est en préparation.

Population genetic structure of *Anopheles darlingi* in French Guiana

Laetitia Ferraro¹, Hervé Bogreau^{2,3,4}, Mathieu Nacher^{5,6}, Samuel Venzegho¹, Antoine Adde¹, Christophe Nguyen^{2,3,4}, Pascal Gaborit¹, Jean Issaly¹, Romuald Carinci¹, Vincent Pommier de Santi^{3,7}, Romain Girod¹, Isabelle Dusfour¹, Sébastien Briolant^{2,3,4}*Corresponding author

Abstract

Background:

Anopheles darlingi is the most important malaria vector in the Amazon Basin. Knowledge of the dynamics of these mosquito populations is important for designing efficient vector control interventions. The aim of this study was to evaluate the genetic variability and genetic structure of *An. darlingi* in French Guiana.

Methods:

Mosquitoes were captured in 14 sites in French Guiana with two different ecological fasciae: coast and forest. Microsatellite genotyping based on eight loci was performed to assess levels of population genetic structuring among *An. darlingi* populations.

Results:

A total of 1881 *An. darlingi* were genotyped. STRUCTURE analysis highlighted five clusters in French Guiana. Significant population differentiation was observed among *An. darlingi* populations according to two ecological fasciae. The coastal sites are probably subject to a passive diffusion of mosquitoes linked to human movement by the road. The forest *An. darlingi* populations seem to be structured according to a passive diffusion by the gold miners' displacement between the gold mining sites.

Conclusions:

This is the first study in French Guiana which shows the *An. darlingi* population structuration. This structuration must be taken into account when designing surveillance and vector control programs.

Keywords:

Anopheles darlingi, Amazonia, Population genetic structure, Microsatellites, Malaria

Introduction

French Guiana is a French overseas territory where malaria remains endemic like in Suriname (Rousseau 2019; Hiwat et al. 2012). Actually in French Guiana, malaria contamination sites are mainly located in Saint-Georges-de-l'Oyapock (at the border with Brazil) but localized sites of transmission have been identified in Saül, Regina, Kourou and Maripasoula (Rousseau 2019) and in gold mining sites (Pommier de Santi, Djossou, et al. 2016; Pommier de Santi, Dia, et al. 2016; Mosnier et al. 2020). In 2018, 546 malaria cases were reported mainly due to *Plasmodium vivax* (90%) but *Plasmodium falciparum* being responsible of the other cases (Rousseau 2019). Entomological survey is a key component of malaria vector control programs. Knowledge of the dynamics of the mosquito populations is important for designing efficient malaria vector control interventions.

Anopheles darlingi, subgenus *Nyssorhynchus*, is the most abundant *Anopheles* species in Amazonian urban and forest area (Reis et al. 2018) and considered as the major vector of malaria in French Guiana and in Suriname (Hiwat et al. 2012; Adde et al. 2017; Epelboin et al. 2018). *An. darlingi* readily colonizes habitats with diverse ecological characteristics (Laporta et al. 2015; Alimi et al. 2015) and possesses phenotypic plasticity (combined with genetic variation) which allows it to adapt to a wide range of ecological conditions (Chu et al. 2019). This species is a predominantly anthropophilic vector with high aggressive feeding behavior among females, which frequently occurs just after dusk (Fouque et al. 2010). Nevertheless, it exhibits a considerable plasticity in biting behavior (time and place of bites, host source) source in response to local environmental conditions in the Americas (Conn and Ribolla 2016) which may be associated with genetic diversity (Campos et al. 2019). In tropical areas, the growth of *Anopheles* is continuous throughout the year, with density seasonal variations linked to climatic conditions (Hiwat and Bretas 2011). For *An. darlingi* in French Guiana, seasonal fluctuations density exists according to geographic areas. On the Maroni River (western border, with Suriname), in 1998 and 1999, *An. darlingi* Human Biting Rate (HBR) peaked in Loca from June to August whereas in Twenké high HBR was reported all year with important year to year variation (Fouque et al. 2010). However, between 2000 and 2002, in Twenké, Taluen and Cayodé, the density peak is located between April and June (rainy season) (Girod et al. 2008) as well as on the Oyapock river (in Camopi) (eastern border, with Brazil) (Girod et al. 2011) while in Macouria (coast) the peak is in September (dry

season) (Vezenegho et al. 2015) as well as in Saint-Georges (mouth of the Oyapock river) where it is between September and November (dry season) (Adde et al. 2017). These different behaviors suggest that there may have several *An. darlingi* subpopulations (Fouque et al. 2010) at the French Guiana geographic scale, but no genetic structure study has ever been done in French Guiana.

Population genetic structure of *An. darlingi* was reported in Amazonas at the continental or regional scale. Isolation by distance explained *An. darlingi* differentiation among populations of Bolivia, Venezuela and Brazil (Conn et al. 1999), in Brazilian Amazonia populations (Scarpassa and Conn 2007) or in Peruvian and Brazilian Amazon and Central America (Mirabello et al. 2008). In Colombia, possible genetic differentiation was highlighted attributed to biogeographic differences (González et al. 2007). Several studies have indicated that the geographic barriers could influence South America *An. darlingi* populations structure and differentiation (Pedro and Sallum 2009; Emerson et al. 2015; Naranjo-Díaz, Conn, and Correa 2016).

Some studies have reported the microgeographical differentiation of *An. darlingi* populations. Genetic differentiation between two sympatric *An. darlingi* populations were also reported in Manaus (Brazil) (Cornel et al. 2016). Significant genetic structure at a local scale was observed among *An. darlingi* populations in the Western Amazon region of Brazil, probably influenced by local anthropogenic modifications (Campos et al. 2017). Further, *An. darlingi* population structure is affected by local conditions that may also influence differentiation, as shown in Rondônia state, Brazil, where two genetically distinct subpopulations were associated with different rainfall periods (Angêlla et al. 2014). Our study aimed to evaluate the genetic variability and genetic structure of *An. darlingi* in French Guiana.

Methods

Study sites and sample collection

Anopheles darlingi were caught mainly in French Guiana (a French overseas territory) but one collection site was in Suriname, both located in the North-Eastern South America and being part of the Guianas. In the West of French Guiana, the Maroni River marks the border with Suriname. In the eastern, the Oyapock River marks the border with Amapá State, Brazil. The climate is tropical with four seasons: a rainy season from April to June and December to February and a dry season from July to November and in March (Meteo France

Web; Hiwat et al. 2012). In French Guiana, ninety percent of the inhabitants live on the coast but there is also illegal gold mining site where live miners in the middle of the forest and along the Maroni and the Oyapock Rivers. The road network connects the coastal towns between Saint-Laurent-du-Maroni on the western border with Suriname and Saint-Georges, on the eastern border with Brazil. The other municipalities are only accessible by boat, plane or helicopter (DEAL Guyane 2013). This two territories are endemic for both *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* (Rousseau 2019; Hiwat et al. 2018). Since 2010, the only insecticide authorized in Europe and used in French Guiana for vector control (for spraying during epidemics) is deltamethrin, a pyrethroid. Over time, *An. darlingi* has remained susceptible to insecticides used for its control, including deltamethrin (Epelboin et al. 2018).

Adult female were caught by Human Landing Catch (HLC), human-baited double net trap (DNT), Mosquito Magnet® baited with octenol (MM octenol) or lurex (MM lurex), CDC light trap (CDC-LT) or larval capture with hatching in laboratory (LC) at various time slot of collection as detailed in **Table 1**.

Anopheles darlingi were collected in 14 sites in French Guiana with two different ecological fasciae. Seven sites were situated close the coast: Kourou (KOU), Matoury (MAT), Cacao (CAC), Regina (REG), Saint-Georges-de-l'Oyapock (SGO), Blondin (BLO) and Saut-Maripa (SMP). Seven sites in French Guiana were located in the forest: 3 sites were situated on the Oyapock River close to gold mining sites: Camopi (CAM), Sikini (SIK) and Alikéné (ALI); 2 gold mining sites were in the Amazon forest: Dorlin (DOR) and Dagobert (DAG) and 2 sites were on the Maroni River: Midenangalanti (MID) and Bois Martin (BOM). One site was in Suriname in forest: Mozeskreek (MOZ) (**Figure 1 and Table 1**). The most distant localities are MOZ and SGO separated by 565 km. The nearest localities are SGO and BLO separated by 2 km.

All mosquitoes were kept desiccated individually into microtubes then stored frozen until use in the lab. They were identified using morphological taxonomic keys specific to the region (Floch and Abonnenc 1951; Faran and Linthicum 1981).

Extraction of DNA for genotyping

DNA was extracted from one leg of each mosquito using the MagMax™ automate with MagMax™-96 DNA Multi-sample kit for 96-well reaction plate formats from Applied Biosystems®, Foster City,

California, USA, according to the manufacturer's recommendations (isolation of genomic DNA from solid tissue). A one-hour incubation with proteinase K at 56°C was performed to disrupt samples without a mechanical homogenizer.

Microsatellite genotyping

Nine microsatellites loci were genotyped (Supplementary data - **Table S1**). All of the primer pairs originate from the literature: seven were described by Conn *et al.* (Conn et al. 2001) and two primer pairs came from Angèlla *et al.* (Angèlla et al. 2014). The primer sequences of ADC01, ADC28, ADC110, ADC137, ADC138 and ADMP9 loci were used without modification. Due to the lack of amplification for loci ADC02, ADC29 and ADC107, primers were redesigned with Primer Express® software (Applied Biosystems®) as detailed in **Table S1**. These putative neutral microsatellites markers have not yet been mapped against *An. darlingi* chromosomes.

Each locus was amplified by multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) using Type-it® Microsatellite PCR from Qiagen®, Hilden, Germany, with fluorescently end-labeled (FAM™, NED™, PET™ or VIC™, Applied Biosystems®) reverse primers. Two panels were composed. The first one mix ADC01, ADC28, ADC29, ADC110 and ADC138 with an optimal annealing temperature of 64°C. The second panel was composed of ADC02, ADC107, ADC137 and ADMP9 with an optimal annealing temperature of 62°C. The PCR reactions were prepared containing 1x of Master Mix (contains HotStarTaq® Plus DNA Polymerase, Type-it Microsatellite PCR Buffer with 6 mM MgCl₂ and dNTPs), 0.2 µM of each primer, RNase free-water to complete the final volume of 20 µL and 5 µL of template DNA. Amplification were performed on a Biometra®, Göttingen, Germany, T1 Thermocycler with the following conditions: 5 min at 95°C followed by 28 cycles at 95°C for 30 s, annealing temperature of the panel for 90 s and 72°C for 30 s and closed with 60°C for 45 min. For the capillary electrophoresis in ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), a mix was carried out with 20 µL formamide, 0.5 µL GeneScan™-500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems®) and 1.5 µL of PCR product. Electrophoregrams were analyzed and sample files were generated using GeneMapper® software, version 3.7 (Applied Biosystems).

Statistical Analyses

Frequency of null alleles was tested for the nine microsatellite loci in MICRO-CHECKER V2.2.3. (Van Oosterhout et al. 2004). The genetic variability of sampled vector populations was estimated using frequency of alleles at each locus and Nei's unbiased expected heterozygosity (H_e) (Nei 1978). Hardy-Weinberg (HW) equilibrium tests (F_{IS}) and linkage disequilibrium were performed using permutation procedure with FSTAT software version 2.9.4 (Goudet 2001). Genetic population structure analysis at both the population and individual levels was carried out using a model-based clustering method implemented in STRUCTURE software v.2.3.4 (Falush, Stephens, and Pritchard 2003) to simultaneously identify clusters (populations) and assign individuals to these populations. All model runs were based on 5,000 burn-in and 50,000 Monte Carlo Markov Chain (MCMC) replications for 10 iterations. Discriminant analysis of principal components (DAPC) (Jombart, Devillard, and Balloux 2010) was performed with R (R Core Team 2018) package, *Adegenet* (Jombart and Ahmed 2011). Comparison of *An. darlingi* populations from different collection sites was based on pairwise F_{ST} estimates (Wright 1965; Weir and Cockerham 1984). P -values after sequential Bonferroni correction were obtained using FSTAT software version 2.9.4. Permutation-based statistical tests were performed with 10,000 permutations.

Results

Genetic diversity at the intra-population level

A total of 1881 *An. darlingi* were genotyped ($N_{ALI} = 167$, $N_{BLO} = 622$, $N_{BOM} = 31$, $N_{CAC} = 136$, $N_{CAM} = 62$, $N_{DAG} = 91$, $N_{DOR} = 83$, $N_{KOU} = 40$, $N_{MAT} = 29$, $N_{MID} = 62$, $N_{MOZ} = 88$, $N_{REG} = 83$, $N_{SGO} = 297$, $N_{SMP} = 59$, $N_{SIK} = 31$) between May 2007 and July 2015 (**Table 1**). A total of 209 alleles were detected. Of the nine genotyped microsatellite loci, ADC28 was the least polymorphic (Allele number = 9 and $H_e < 0.762$) and ADC01 was the most polymorphic (Allele number = 54 and $H_e > 0.856$) (**Table 2**). The results by loci are presented in supplementary data (**Table S2**). At locus ADC138, the significant departures from HWE, detected in all samples, were due to nulls alleles according to tests implemented with MICRO-CHECKER software (data not shown). This marker was excluded in subsequent population structure analyses.

Unbiased genetic diversity index (H_e) highlights high diversity. H_e over loci ranged from 0.665 (DOR) to 0.821 (CAM). Considering F_{IS} , significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were detected at all site after sequential Bonferroni correction ($P < 0.0004$) except at KOU, MAT and SMP. Tests for linkage disequilibrium showed a significant association for the pair ADC29-ADC110 and ADC28-ADC107.

Population genetic structure among populations

STRUCTURE analysis determined that the optimal number of genetic clusters was five, according to the estimated natural log probability of the data ($\ln Pr(X|K)$) started leveling off at $K = 5$ (**Figure 2.a**). STRUCTURE results for $K = 5$ are shown in **Figure 2.b**, with individuals grouped by sampling site and ecological fasciae (coast and forest). Overall, there is evidence for structure among the two ecological fasciae groups, with inside substructures. Two substructures are highlighted in the coast ecological fasciae: one was constituted by BLO, REG, SGO and SMP and the second contained KOU, MAT and CAC. Three substructures were present in the forest ecological fasciae: one cluster was formed by DAG, ALI, CAM and SIK, the second by DOR, BOM and MID. At last, MOZ was a cluster well individuated.

Discriminant analysis of principal component (DAPC) showed 4 clusters (**Figure 3**). One cluster suggesting only one *An. darlingi* population included all the coastal ecological fasciae sites: KOU, SMP, SGO, MAT, BLO, REG and CAC. The second cluster included DAG and ALI. The third cluster included CAM, MOZ and SIK. This cluster is framed by the second cluster with the last cluster. The last cluster included DOR, MID and BOM.

Pairwise F_{ST} index showed significant genetic differentiation between *An. darlingi* populations sampled after the sequential Bonferroni correction except between some coastal sites: SGO and MAT, SMP and MAT, SMP and REG, SMP and SGO and between SIK and CAM (**Table 3**). The F_{ST} value range from 0.0009 to 0.2413 ($0.0005 < P\text{-values} < 0.0043$). The significant F_{ST} values showed a low difference between all coastal sites ($F_{ST} < 0.0440$, $P < 0.0005$). For the sites belonging to the forest ecological fasciae, the F_{ST} values are low to moderate ($0.0300 < F_{ST} < 0.2097$, $P < 0.0005$) like for the coast vs. forest sites comparison ($0.0462 < F_{ST} < 0.2413$, $P < 0.0005$).

Discussion

The present study was designed to analyze the genetic structure of the *An. darlingi* populations in French Guiana.

A total of 1881 individuals were analyzed with eight microsatellite markers. All loci showed a high degree of polymorphism with a total of 209 alleles detected. The range of expected Heterozygosity (H_e) was also similar to the results of studies structure which used the same microsatellites markers (Angella et al. 2014; Campos et al. 2017; Scarpassa and Conn 2007). Observed heterozygosity (H_o) are inferior to H_e (significant $FIS > 0$). This suggests a non-random allele frequency distribution in populations. Given the absence of generalized linkage disequilibrium, this slight deviation from HWE is mainly related to the presence of null alleles.

Anopheles darlingi were caught using variable collection methods and at various time slots. However, mosquitoes captured with different collection methods and at any time can be used as part of population genetic structure because no bias was inserted depending on this different sampling methods (Ferraro 2020, submitted).

STRUCTURE analyses found genetic structure among *An. darlingi* of the 14 sites in French Guiana. Five clusters were identified. *Anopheles* of the seven coastal sites were distributed in two subpopulations correlated with the human movement by the main French Guiana road which connects the coastal towns between Saint-Laurent-du-Maroni and Saint-Georges passing by KOU, MAT, CAC and REG. SGO, BLO and SMP are connected by the frequent fluvial traffic on the Oyapock River in this area. The more distant are the sites, the more mosquitoes belong to one or the other subpopulation. Also, a passive diffusion of mosquitoes correlated with the Human movements probably explain the low diversity between the coastal sites and the belonging in the two subpopulations into various proportions. For the seven forest sites in French Guiana, two clusters were highlighted. The sites along the Oyapock river and along the Maroni river were in two different clusters. Curiously, even if DAG and DOR are geographically close, DAG belongs to the Oyapock cluster unlike DOR which is with the Maroni cluster. DAG and DOR are both gold mining sites. Communication

roads are particular with these illegal sites in French Guiana, linked with the Human and gold displacement. DOR is along Petite Inini River flowing into the Maroni River by Grande Inini River. Also, passive diffusion of mosquitoes follows probably the Human movements by this waterway. But gold miners on DAG are related to peoples on DAG-CAM axis which used the fluvial roads. Between DAG and CAM, the Brazilian gold miners are very mobile and working on several gold mining sites on this axe par year (Pommier de Santi, Djossou, et al. 2016). CAM and SIK are a low mixture with the DOR cluster maybe for the same reason: Human movements take place between DOR and CAM participating, to a lesser extent, in a passive diffusion of mosquitoes. SIK and CAM are linked by frequent boat trips on the Sikini River which flows in the Oyapock River. Finally, there is a clear separation between *An. darlingi* of the coastal and the forest groups. It confirms that a significative genetic differentiation exists between the two ecological fasciae. MOZ which is an outside sampling site confirm that a total differentiation of the *An. darlingi* structure is happened when no connection roads are present.

Four clusters were highlighted with Discriminant analysis of principal component. All the seven coastal sites were in the same cluster whereas STRUCTURE did two with the same sampling. A second cluster included DAG and ALI and another included DOR, MID and BOM, both like STRUCTURE analyses. The last cluster encompassed MOZ, SIK and CAM whereas STRUCTURE analyses did two groups. However, MOZ was in a different cluster with STRUCTURE analysis. The DAPC illustration seems to have generated a distortion of the distances between certain populations. Supplementary genetic analysis is needed try to understand these results.

STRUCTURE analyses and DAPC suggesting that all the *An. darlingi* of the coastal ecological fasciae are genetically close, that is in accordance with the non-significant F_{ST} values between SGO and MAT, SMP and MAT, SMP and REG, SMP and SGO and the low other F_{ST} values between the sites of this group ($F_{ST} < 0.0440$, $P < 0.0005$). Considering the forest ecological fasciae, the significant F_{ST} values were low to moderate and a non-significant F_{ST} values was reveled between SIK and CAM.

A lot of studies have highlighted genetic structure of *An. darlingi* in South America. Genetic differentiation in Brazilian Amazonia populations was highlighted at distances from 296 to 1184 km with microsatellites but contrary to our results, no significant genetic differentiation was found between population

separated by less than 152 km (Scarpassa and Conn, 2007). In Colombia, genetic subdivision between *An. darlingi* populations west and east of the Andes was found using mtDNA COI and nuclear CAD markers, most likely influenced by this mountain range but, at a microgeographic scale, ecological differences have a significant impact on structure (Naranjo-Díaz et al., 2016). In Colombia, possible genetic differentiation was highlighted between the eastern and western populations (separated by about 600 to 700 km) using AFLP loci, attributed to biogeographic differences but conspecific populations with high gene flow between the two western populations separated by about 300 km. Nevertheless, they concluded that the search for the population structure should be re-analyzed, using other molecular markers such as microsatellites (González et al., 2007).

On the coast in French Guiana, where insecticide (deltamethrin) is spraying for vector control, we highlighted no genetic structuration of *An. darlingi* populations. Until now, *An. darlingi* has remained susceptible to deltamethrin (Epelboin et al. 2018). However, few evidence of insecticide resistance exists in that species in Colombia (Orjuela et al. 2018). In Blondin in French Guiana, rare pyrethroids resistance was reported but without having been able to set up there (Vezenegho 2020). Based on our results, the import of such resistance in *An. darlingi* populations could then spread rapidly to the entire coastal area.

Conclusion

The present study has highlighted a genetic structure of *Anopheles darlingi* populations in French Guiana. Five clusters are distributed according to two ecological fasciae. The seven coastal sites showed a low genetic differentiation and two mixed clusters. The seven forest sites are divided in two clusters and the genetic differentiation was more important than in the coastal ecological fasciae. These two clusters are divided according to the Human movement between the gold mining sites. This structuration of *An. darlingi* populations in French Guiana must take into account when designing surveillance and vector control programs.

Table 1. Characterization of the sampling sites of *An. darlingi* in French Guyana and Suriname; HLC: Human Landing Catch; DNT: human-baited double net trap; MM octenol: Mosquito Magnet® baited with octenol; MM lurex: Mosquito Magnet® baited with lurex; CDC-LT: CDC light trap; LC: larval capture with hatching in laboratory.

Site name	Site code	Latitude (N)	Longitude (W)	Biogeographical region	Period of collection	Season	Time slot of collection	Collection method	Number of individuals analyzed
Ahkené	ALI	3°13'1.45"	52°25'6.37"	Forest (Close to gold mining site)	06/2007, 05/2008, 07/2008, 01/2009	Wet	00.00-00.00	HLC, DNT, MM octenol	167
Blondin	BLO	3°52'35.71"	51°48'48.66"	River (Oyapock)	11-12/2012, 09-11/2013, 09/2014	Dry	18.00 – 10.00	HLC, MM Octenol, MM Lurex	622
Bois Martin	BOM	5°00'08.0"	54°26'05.5"	River (Maroni)	01-02/2013, 04-05/2014	Wet	18.00-23.00	HLC	31
Cacao	CAC	4°34'27.9012"	52°27'56.7684"	Coast	05/2007, 07/2007	Wet	and 05.00-07.00	HLC	136
Camopi	CAM	3°10'0.001"	52°21'0"	River (Oyapock)	11/2007, 09/2008	Wet	18.00-08.00	HLC, LC, MM octenol, CDC-LT	62
Dagobert	DAG	3°57'39.7"	53°26'9.84"	Forest (Gold mining site)	05-06/2007	Wet	07.00-22.30	HLC	91
Dorlin	DOR	3°45'0"	53°33'0"	Forest (Gold mining site)	11-12/2013	Dry	Not available	MM octenol	83
Kourou	KOU	5°07'42.7"	52°43'16.7"	Coast	06-07/2011	Wet	18.00-22.00	HLC	40
Matoury	MAT	4°47'30.4"	52°19'53.5"	Coast	02-03/2010, 02/2011	Wet	and 05.00-07.00	HLC	29
Midenangalanti	MID	5°02'26.1"	54°25'15.1"	River (Maroni)	04/2010	Wet	18.00-22.00,	HLC	
Mozeakreek	MOZ	4°51'51.6"	56°47'13.6"	Forest	03/2011	Dry	05.00-07.00		
Regina	REG	4°18'10.7"	52°08'31.7"	Coast	07/2007	Wet	and 09.00-11.00	HLC	62
Saint-Georges	SGO	3°53'49.1760"	51°47'49.02"	River (Oyapock)	11/2012	Dry	18.00-06.00	HLC	88
Saut-Maripa	SMP	3°48'10.26"	51°53'15.9828"	River (Oyapock)	05/2009, 02/2010, 04/2010	Wet	15.00-11.00	DNT, HLC	83
Sikini	SIK	3°23'0"	52°30'0"	Forest (Close to gold mining site)	03/2011	Dry	00.00-00.00	HLC, MM octenol	297
Total					09-12/2012, 08/11/2013	Wet	00.00-00.00	HLC, MM octenol	59
					06/2007	Wet	18.00-11.00	HLC, CDC-LT, DNT	31
					12/2008	Dry			1881

Table 2. Genetic diversity in populations of *An. Darlingi* from French Guyana: range of allele size, allele number, genetic diversity (H_e : expected diversity) and deviation (F_{is}) from Hardy-Weinberg Equilibrium based on 8 microsatellite loci. Corresponding site code: ALI: Alikéné, BLO: Blondin, BOM: Bois Martin, CAC: Cacao, CAM: Camopi, DAG: Dagobert, DOR: Dorlin, KOU: Kourou, MAT: Matoury, MID: Midenangalanti, MOZ: Mozeskreek, REG: Regina, SGO: Saint Georges, SMP: Saut Maupa, SIK: Sikini.
* Significant disequilibrium from Hardy-Weinberg Equilibrium, after Bonferroni correction (P -value < 0.0004). In bold: Presence of null alleles as estimated by Micro-checker, N: Sample size.

Site code	Allele size (bp) N=1881	Allele number N=1881	Locus									
			ADC01 153-271	ADC110 158-184	ADC28 123-141	ADC29 242-346	ADC107 121-209	ADC02 131-229	ADC137 121-169	ADMFP9 139-220	ALI 209	
ALI	H_e	0.902	0.822	0.648	0.767	0.819	0.843	0.859	0.818	0.810		
	F_{is}	0.131*	0.004	0.707*	0.227*	0.440*	0.062	0.014	-0.051	0.176*		
BLO	H_e	0.937	0.805	0.423	0.835	0.703	0.871	0.765	0.870	0.776		
	F_{is}	0.100*	0.064	0.075	0.024	0.120*	0.259*	0.010	0.011	0.084*		
BOM	H_e	0.856	0.795	0.234	0.907	0.849	0.599	0.813	0.413	0.683		
	F_{is}	0.074	0.082	0.538	0.061	0.695*	0.495*	-0.094	0.079	0.212*		
CAC	H_e	0.928	0.744	0.498	0.725	0.694	0.815	0.784	0.853	0.755		
	F_{is}	0.131*	0.040	-0.075	0.027	0.220*	0.262*	0.058	0.039	0.096*		
CAM	H_e	0.934	0.775	0.724	0.789	0.890	0.839	0.863	0.755	0.821		
	F_{is}	-0.007	-0.029	0.728*	0.143	0.618*	0.226*	0.002	0.053	0.213*		
DAG	H_e	0.871	0.652	0.399	0.774	0.711	0.852	0.825	0.831	0.739		
	F_{is}	0.021	0.078	0.749*	0.001	0.656*	0.236*	0.007	0.079	0.188*		
DOR	H_e	0.884	0.586	0.053	0.903	0.775	0.802	0.794	0.525	0.665		
	F_{is}	0.101	0.025	1.000	0.057	0.791*	0.029	0.007	-0.039	0.157*		
KOU	H_e	0.929	0.790	0.555	0.720	0.725	0.829	0.759	0.833	0.768		
	F_{is}	0.070	0.000	0.022	-0.064	0.185	0.017	-0.074	-0.068	0.011		
MAT	H_e	0.925	0.762	0.417	0.735	0.647	0.878	0.757	0.800	0.740		
	F_{is}	0.086	-0.068	0.190	0.219	0.058	0.244	-0.122	0.112	0.088		
MID	H_e	0.892	0.828	0.419	0.864	0.795	0.832	0.869	0.490	0.749		
	F_{is}	0.108	0.034	0.848*	0.097	0.752*	0.337*	0.025	0.086	0.252*		
MOZ	H_e	0.929	0.790	0.762	0.916	0.502	0.856	0.887	0.862	0.813		
	F_{is}	0.138*	-0.045	0.776*	0.103	0.663*	-0.003	0.096	0.044	0.190*		
REG	H_e	0.941	0.834	0.293	0.836	0.682	0.895	0.759	0.835	0.759		
	F_{is}	0.033	0.096	0.184	0.069	0.122	0.036	0.069	-0.004	0.064*		
SGO	H_e	0.934	0.792	0.456	0.802	0.690	0.904	0.790	0.860	0.779		
	F_{is}	0.124*	0.058	0.006	0.023	0.076	0.086*	0.010	0.061	0.060*		
SMP	H_e	0.922	0.817	0.445	0.856	0.703	0.882	0.813	0.851	0.786		
	F_{is}	0.036	-0.008	0.156	0.041	0.130	0.138	-0.111	0.043	0.046		
SIK	H_e	0.914	0.722	0.642	0.873	0.853	0.823	0.825	0.615	0.783		
	F_{is}	-0.043	0.034	0.820*	-0.055	0.595*	0.231	-0.118	0.020	0.174*		

Table 3. Estimates of F_{ST} with P -value (in italics) for all loci in *An. darlingi* populations. Corresponding site code: ALI: Alkené, BLO: Blondin, BOM: Bois Martin, CAC: Cacao, CAM: Camopi, DAG: Dagobert, DOR: Dorin, KOU: Kourou, MAT: Matoury, MID: Midenangalanti, MOZ: Mozeskreek, REG: Regina, SGO: Saint Georges, SMP: Saut Maripa, SIK: Sikini.

Compared populations	ALI	BLO	BOM	CAC	CAM	DAG	DOR	KOU	MAT	MID	MOZ	REG	SGO	SMP	SIK
ALI	-	0.0580*	0.1635*	0.0659*	0.0372*	0.0322*	0.1761*	0.0576*	0.0618*	0.1413*	0.1114*	0.0580*	0.0552*	0.0462*	0.0832*
BLO	0.00048	-	0.2120*	0.0218*	0.0858*	0.0754*	0.2179*	0.0359*	0.0128*	0.1857*	0.1498*	0.0036*	0.0030*	0.0010*	0.1320*
BOM	0.00048	0.00048	-	0.2266*	0.0848*	0.2097*	0.0392*	0.2194*	0.2279*	0.0300*	0.1208*	0.2205*	0.2106*	0.2063*	0.0738*
CAC	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.0949*	0.0835*	0.2380*	0.0305*	0.0093*	0.1987*	0.1572*	0.0274*	0.0151*	0.0186*	0.1392*
CAM	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.0743*	0.0915*	0.0837*	0.0826*	0.0622*	0.0713*	0.0865*	0.0856*	0.0711*	0.0130
DAG	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.0915*	0.0764*	0.0772*	0.1876*	0.1561*	0.0759*	0.0724*	0.0657*	0.1212*
DOR	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.2336*	0.2413*	0.0308*	0.1107*	0.2368*	0.2196*	0.2148*	0.0711*
KOU	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.0113*	0.1864*	0.1452*	0.0440*	0.0309*	0.0337*	0.1257*
MAT	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.1953*	0.1488*	0.0142*	0.0065	0.0104	0.1309*
MID	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.0825*	0.1924*	0.1857*	0.1730*	0.0461*
MOZ	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.1582*	0.1472*	0.1327*	0.0726*
REG	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.0052*	0.0030	0.1371*
SGO	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00095	0.00048	0.00048	0.00048	-	0.0009	0.1305*
SMP	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00095	0.00048	0.00048	0.00429	0.01000	-	0.1161*
SIK	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00143	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	-

F_{ST} values are above diagonal, P -values are below diagonal.

* Significant value after Bonferroni correction (P -value must be < 0.00048).

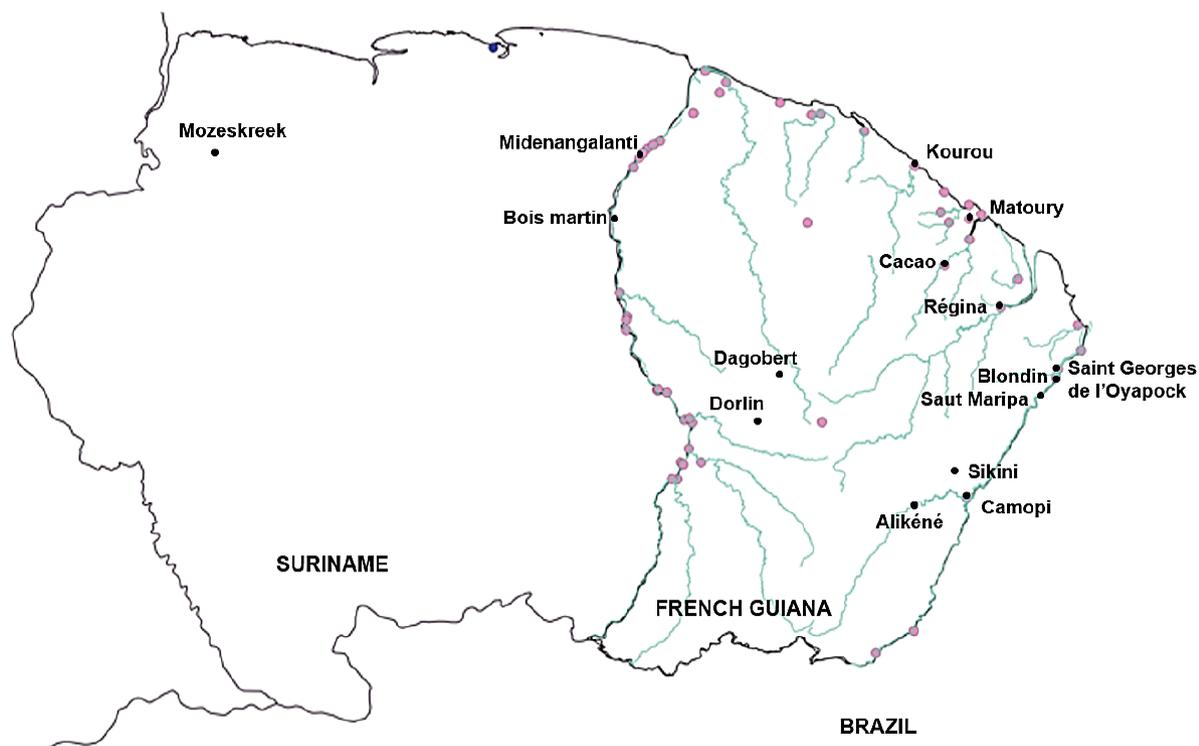


Figure 1. Map of 15 collection sites of *Anopheles darlingi* in French Guiana sourced from openstreet map, IGN and SIG Guyane. GPS coordinates of each position: Kourou (5°07'42.7"N, 52°43'16.7"W), Matoury (4°47'30.4"N, 52°19'53.5"W), Cacao (4°34'27.9012"N, 52°27'56.7684"W), Regina (4°18'10.7"N, 52°08'31.7"W), Saint-Georges-de-l'Oyapock (3°53'49.1760"N, 51°47'49.02"W), Blondin (3°52'35.71"N, 51°48'48.66"W), Saut Maripa (3°48'10.26"N, 51°53'15.9828"W), Camopi (3°10'0.001"N, 52°21'0"W), Dorlin (3°45'0"N, 53°33'0"W), Dagobert (3°57'39.7"N, 53°26'9.84"W), Sikini (3°23'0"N, 52°30'0"W), Alikéné (3°13'1.45"N, 52°25'6.37"W), Midenangalanti (5°02'26.1"N, 54°25'15.1"W), Bois Martin (5°00'08.0"N, 54°26'05.5"W), Mozeskreek (4°51'51.6"N, 56°47'13.6"W).

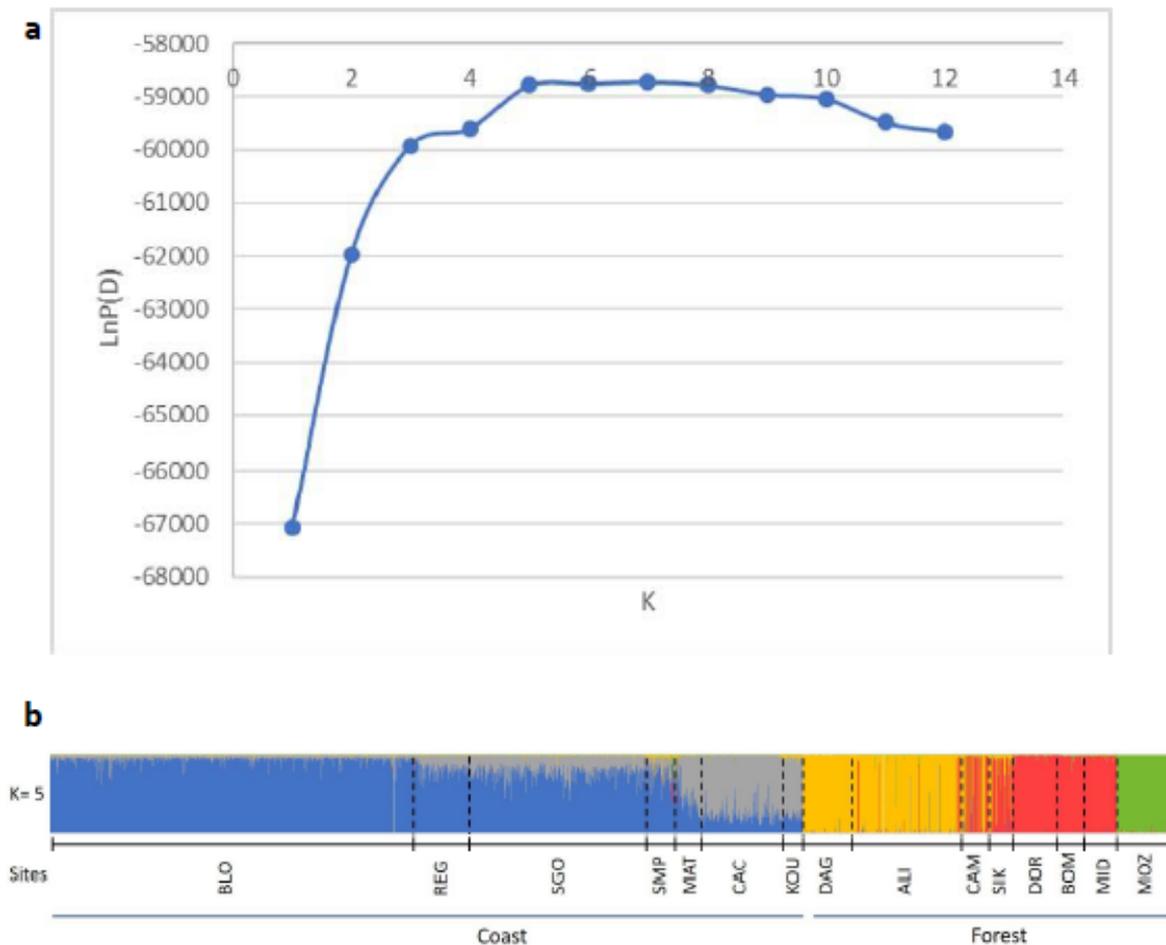


Figure 2. Results of STRUCTURE analysis of 8-loci microsatellites comparing dataset of 1881 *An. darlingi* caught in 15 samples sites in French Guiana and Suriname (Corresponding site code: ALI: Alikéné, BLO: Blondin, BOM: Bois Martin, CAC: Cacao, CAM: Camopi, DAG: Dagobert, DOR: Dorlin, KOU: Kourou, MAT: Matoury, MID: Midenangalanti, MOZ: Mozeskreek, REG: Regina, SGO: Saint Georges, SMP: Saut Maripa, SIK: Sikini). **a.** Determination of the optimal number of genetic clusters, according to the estimated natural log probability of the data ($\ln Pr(X|K)$). Optimal $K = 5$. **b.** STRUCTURE Bayesian clustering analysis. The multilocus genotype of each individual is represented by a column with five colors showing the genetic proportion assigned to each cluster ($K = 5$ inferred clusters). Individuals were ordered by locality and ecological fasciae (coastal and forest).

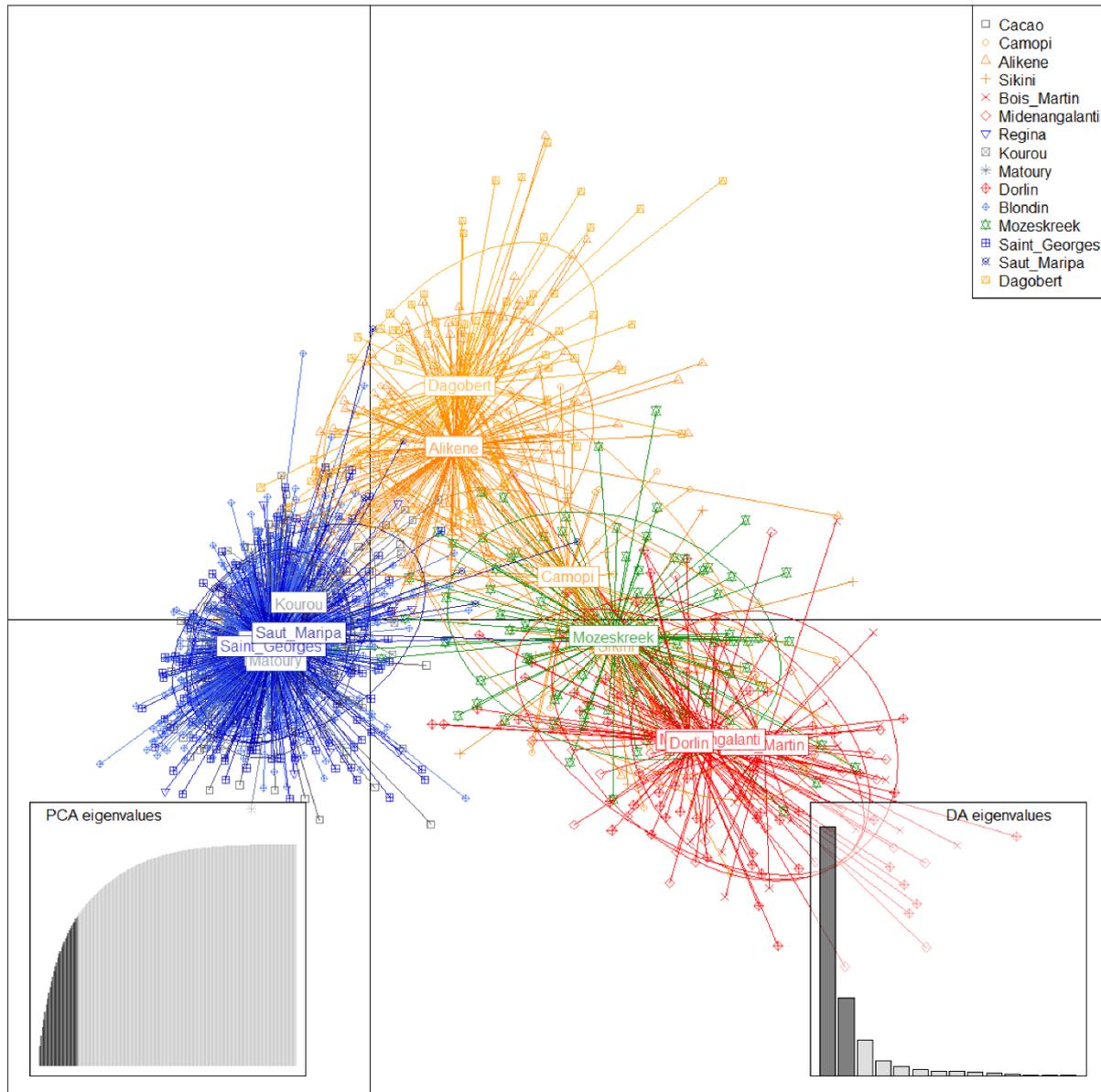


Figure 3. Results of clustering by DAPC of 8-loci microsatellites dataset of *An. darlingi*. Comparison of 15 sites with 1881 mosquitoes caught in French Guiana and Suriname.

Additional files

Table S1. Repeats and primer sequences of the microsatellite loci designed for *An. darlingi*.

Table S2. Allele number obtained for *An. darlingi*.

Abbreviation

BIC: Bayesian Information Criterion; DAPC: Discriminant Analysis of Principal Components; EIR: Entomological Inoculation Rate; HBR: Human Biting Rate; He: Expected Heterozygosity; HLC: Human Landing Catch; HWE: Hardy Weinberg Equilibrium; MM octenol: Mosquito Magnet® baited with octenol; MM lurex: Mosquito Magnet® baited with lurex; PCR: Polymerase Chain Reaction.

Acknowledgement

The authors thank the health center, DAAC association and Camp Bernet staff of Saint-George's town for their assistance during this study.

Author's contributions

HB, ID, SB, MN and RG conceived the study, SV contributed to the design of the experiments. SV, AA, VPS, PG, RC, JI, ID, RG and SB performed field collections. CN and LF processed molecular assays. LF, HB and SB analysed and interpreted data. LF, HB, MN and SB wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

Financial support was made available by ARS (Conventions n°12-49/ARS du 11 juillet 2012 and n°13-83/ARS du 28 juin 2013), and by the French Armed Forces (Grant LR607e). This work has also benefited from an "Investissement d'Avenir" grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-

10-LABX-25-01). Likewise, this study received a European commission "REGPOTCT-2011-285837-STRonGer" Grant within the FP7.

Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

For HLC, female mosquitoes were collected with the aid of mouth aspirators when landing on collector legs. Collectors were local volunteering residents. They were provided training on HLC and informed of the associated risks of the collection method and were supervised during the captures by the authors. Malaria prophylaxis was proposed and information on the medication was provided. Collectors who benefited from prophylaxis gave their free, express and informed consent.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Author details

¹ Vectopôle Amazonien Emile Abonnenc, Institut Pasteur de la Guyane, 23 Avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne Cedex, French Guiana

² Parasitology and Entomology Unit, Microbiology and Infectious Diseases Department, French Armed Forces Institute for Biomedical Research (IRBA), Marseille, France.

³ IRD, AP-HM, UMR Vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéenne (VITROME), Aix Marseille Université, Marseille, France.

⁴ IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

⁵ Centre d'Investigation Clinique Antilles-Guyane – Inserm1424, Cayenne Hospital, Cayenne, French Guiana

⁶ Epidemiology of Tropical Parasitoses, EA 3593, Université de Guyane, Cayenne, French Guiana

⁷ French Armed Forces Centre for Epidemiology and Public Health (CESPA), Marseille, France

⁸ Global Health Department, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

References

- Adde, A., I. Dusfour, S. B. Vezenegho, R. Carinci, J. Issaly, P. Gaborit, C. Nguyen, V. Ardillon, R. Girod, and S. Briolant. 2017. "Spatial and Seasonal Dynamics of Anopheles Mosquitoes in Saint-Georges de l'Oyapock, French Guiana: Influence of Environmental Factors." *Journal of Medical Entomology* 54 (3): 597–605. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx031>.
- Alimi, T. O., D. O. Fuller, Whitney A. Qualls, S. V. Herrera, M. Arevalo-Herrera, M. L. Quinones, M. V. G. Lacerda, and J. C. Beier. 2015. "Predicting Potential Ranges of Primary Malaria Vectors and Malaria in Northern South America Based on Projected Changes in Climate, Land Cover and Human Population." *Parasites & Vectors* 8 (August): 431. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1033-9>.
- Angêlla, A. F., P. Salgueiro, L. H. S. Gil, J. L. Vicente, J. Pinto, and P. E. M. Ribolla. 2014. "Seasonal Genetic Partitioning in the Neotropical Malaria Vector, Anopheles Darlingi." *Malaria Journal* 13: 203. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-203>.
- Campos, M., D. P. Alonso, J. E. Conn, J. M. Vinetz, K. J. Emerson, and Paulo Eduardo Martins Ribolla. 2019. "Genetic Diversity of Nyssorhynchus (Anopheles) Darlingi Related to Biting Behavior in Western Amazon." *Parasites & Vectors* 12 (1): 242. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3498-4>.
- Campos, M., J. E. Conn, D. P. Alonso, J. M. Vinetz, K. J. Emerson, and P. E. M. Ribolla. 2017. "Microgeographical Structure in the Major Neotropical Malaria Vector Anopheles Darlingi Using Microsatellites and SNP Markers." *Parasites & Vectors* 10 (1): 76–76. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2014-y>.
- Chu, V. M., M. A. M. Sallum, T. E. Moore, W. Lainhart, C. D. Schlichting, and J. E. Conn. 2019. "Regional Variation in Life History Traits and Plastic Responses to Temperature of the Major Malaria Vector Nyssorhynchus Darlingi in Brazil." *Scientific Reports* 9 (1): 5356. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41651-x>.
- Conn, J. E., J. P. Bollback, D. Y. Onyabe, T. Robinson, R. C. Wilkerson, and M. M. Pova. 2001. "Isolation of Polymorphic Microsatellite Markers from the Malaria Vector Anopheles Darlingi," no. 1(4): 223–25.
- Conn, J. E., and P. E. Ribolla. 2016. "Chapter 5 - Ecology of Anopheles Darlingi, the Primary Malaria Vector in the Americas and Current Nongenetic Methods of Vector Control." In *Genetic Control of Malaria and Dengue*, edited by Z. N. Adelman, 81–102. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800246-9.00005-3>.
- Conn, J. E., M. G. Rosa-Freitas, S. L. Luz, and H. Momen. 1999. "Molecular Population Genetics of the Primary Neotropical Malaria Vector Anopheles Darlingi Using MtDNA." *Journal of the American Mosquito Control Association* 15 (4): 468–74.
- Cornel, A. J., K. K. Brisco, W. P. Tadei, N. F. Secundino, Miriam S Rafael, A. K. Galardo, J. F. Medeiros, et al. 2016. "Anopheles Darlingi Polytene Chromosomes: Revised Maps Including Newly Described Inversions and Evidence for Population Structure in Manaus." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 111 (5): 335–46. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150470>.
- DEAL Guyane. 2013. "Plan Global des Transports et Déplacements de la Guyane (2013-2025)." May 2013. <http://www.guyane.developpement-durable.gouv.fr/le-plan-global-des-transports-et-deplacements-de-r645.html>.
- Emerson, K. J., J. E. Conn, E. S. Bergo, M. A. Randel, and M. A. M. Sallum. 2015. "Brazilian Anopheles Darlingi Root (Diptera: Culicidae) Clusters by Major Biogeographical Region." *PloS One* 10 (7): e0130773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130773>.
- Epelboin, Y., S. C. Chaney, A. Guidez, N. Habchi-Hanriot, S. Talaga, L. Wang, and I. Dusfour. 2018. "Successes and Failures of Sixty Years of Vector Control in French Guiana: What Is the next Step?" *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 113 (5): e170398–e170398. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170398>.
- Falush, D., M. Stephens, and J. K. Pritchard. 2003. "Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies." *Genetics* 164 (4): 1567–87.
- Faran, M.E., and K.J. Linthicum. 1981. "A Handbook of the Amazonian Species of Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae)." *Mosquito Systematics* 13.
- Floch, H., and E. Abonnenc. 1951. "Anophèles de La Guyane Française." *Archives de l'Institut Pasteur de La Guyane et Du Territoire de l'Inini* 236: 1–92.
- Fouque, F., P. Gaborit, R. Carinci, J. Issaly, and R. Girod. 2010. "Annual Variations in the Number of Malaria Cases Related to Two Different Patterns of Anopheles Darlingi Transmission Potential in the Maroni Area of French Guiana." *Malaria Journal* 9 (March): 80. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-80>.
- Girod, R., P. Gaborit, R. Carinci, J. Issaly, and F. Fouque. 2008. "Anopheles Darlingi Bionomics and Transmission of Plasmodium Falciparum, Plasmodium Vivax and Plasmodium Malariae in Amerindian Villages of the Upper-Maroni Amazonian Forest, French Guiana." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (7): 702–10. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000700013>.

- Girod, R., E. Roux, F. Berger, A. Stefani, P. Gaborit, R. Carinci, J. Issaly, B. Carne, and I. Dusfour. 2011. "Unravelling the Relationships between Anopheles Darlingi (Diptera: Culicidae) Densities, Environmental Factors and Malaria Incidence: Understanding the Variable Patterns of Malarial Transmission in French Guiana (South America)." *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 105 (2): 107–22. <https://doi.org/10.1179/136485911X12899838683322>.
- González, R., R. Wilkerson, Marco F. Suárez, F. García, G. Gallego, H. Cárdenas, C. E. Posso, and M. C. Duque. 2007. "A Population Genetics Study of Anopheles Darlingi (Diptera: Culicidae) from Colombia Based on Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction and Amplified Fragment Length Polymorphism Markers." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (3): 255–62. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000037>.
- Goudet, J. 2001. "FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices, Version 2.9.3." [Http://www2.Unil.Ch/Popgen/Softwares/Fstat.Htm](http://www2.unil.ch/Popgen/Softwares/Fstat.Htm). <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029733720/en/>.
- Hiwat, H., and G. Bretas. 2011. "Ecology of Anopheles Darlingi Root with Respect to Vector Importance: A Review." *Parasites & Vectors* 4 (September): 177–177. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-177>.
- Hiwat, H., B. Martínez-López, H. Cairo, L. Hardjopawiro, A. Boerleider, E. C. Duarte, and Z. E. Yadon. 2018. "Malaria Epidemiology in Suriname from 2000 to 2016: Trends, Opportunities and Challenges for Elimination." *Malaria Journal* 17 (1): 418. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2570-4>.
- Hiwat, H., S. Mitro, A. Samjawan, P. Sardjoe, T. Soekhoe, and W. Takken. 2012. "Collapse of Anopheles Darlingi Populations in Suriname after Introduction of Insecticide-Treated Nets (ITNs); Malaria down to near Elimination Level." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86 (4): 649–55. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0414>.
- Jombart, T., and I. Ahmed. 2011. "Adegenet 1.3-1: New Tools for the Analysis of Genome-Wide SNP Data." *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (21): 3070–71. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>.
- Jombart, T., S. Devillard, and F. Balloux. 2010. "Discriminant Analysis of Principal Components: A New Method for the Analysis of Genetically Structured Populations." *BMC Genetics* 11 (1): 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>.
- Laporta, G. Z., Y.-M. Linton, R. C. Wilkerson, E. S. Bergo, S. S. Nagaki, D. C. Sant'Ana, and M. A. M. Sallum. 2015. "Malaria Vectors in South America: Current and Future Scenarios." *Parasites & Vectors* 8 (1): 426. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1038-4>.
- Meteo France. Site Web. "CLIMAT ANTILLES GUYANE - Informations, Normales et Statistiques Sur Le Climat En Antilles (Guadeloupe, Martinique) et Guyane." Site Web. <http://www.meteofrance.gp/climat/antilles-guyane>.
- Mirabello, L., J. H. Vineis, S. P. Yanoviak, V. M. Scarpassa, M. M. Póvoa, N. Padilla, N. L. Achee, and J. E. Conn. 2008. "Microsatellite Data Suggest Significant Population Structure and Differentiation within the Malaria Vector Anopheles Darlingi in Central and South America." *BMC Ecology* 8 (March): 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-8-3>.
- Mosnier, E., I. Dusfour, G. Lacour, R. Saldanha, A. Guidez, M. S. Gomes, A. Sanna, et al. 2020. "Resurgence Risk for Malaria, and the Characterization of a Recent Outbreak in an Amazonian Border Area between French Guiana and Brazil." *BMC Infectious Diseases* 20 (1): 373. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05086-4>.
- Naranjo-Díaz, N., J. E. Conn, and M. M. Correa. 2016. "Behavior and Population Structure of Anopheles Darlingi in Colombia." *Infection, Genetics and Evolution* 39 (April): 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.004>.
- Nei, M. 1978. "Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals." *Genetics* 89 (3): 583–90.
- Orjuela, L. I., J. A. Morales, M. L. Ahumada, J. F. Rios, J. J. González, J. Yañez, A. Rosales, et al. 2018. "Insecticide Resistance and Its Intensity in Populations of Malaria Vectors in Colombia." *BioMed Research International* 2018: 9163543. <https://doi.org/10.1155/2018/9163543>.
- Pedro, P. M., and M. A. M. Sallum. 2009. "Spatial Expansion and Population Structure of the Neotropical Malaria Vector, Anopheles Darlingi (Diptera: Culicidae)." *Biological Journal of the Linnean Society* 97 (4): 854–66. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01226.x>.
- Pommier de Santi, V., A. Dia, A. Adde, G. Hyvert, J. Galant, M. Mazevet, C. Nguyen, et al. 2016. "Malaria in French Guiana Linked to Illegal Gold Mining." *Emerging Infectious Diseases* 22 (2): 344–46. <https://doi.org/10.3201/eid2202.151292>.
- Pommier de Santi, V., F. Djossou, N. Barthes, H. Bogreau, G. Hyvert, C. Nguyen, S. Pelleau, et al. 2016. "Malaria Hyperendemicity and Risk for Artemisinin Resistance among Illegal Gold Miners, French Guiana." *Emerging Infectious Diseases* 22 (5): 903–6. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151957>.
- R Core Team, RfFSC. 2018. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R foundation for statistical computing Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>.

- Reis, I. C., C. T. Codeço, D. C. P. Câmara, J. J. Carvajal, G. R. Pereira, E. C. Keppeler, and N. A. Honório. 2018. "Diversity of *Anopheles* Spp. (Diptera: Culicidae) in an Amazonian Urban Area." *Neotropical Entomology* 47 (3): 412–17. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0595-6>.
- Rousseau, C. 2019. "Surveillance Du Paludisme, Le Point Épidémiologique — N° 01 / 2019 : 1er Janvier Au 31 Mars 2019." *CIRE Guyane*, 2019.
- Scarpassa, V. M., and J. E. Conn. 2007. "Population Genetic Structure of the Major Malaria Vector *Anopheles Darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, Using Microsatellite Markers." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (3): 319–27. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000045>.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, and P. Shipley. 2004. "Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data." *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535–38. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>.
- Vezenegho, S. B., R. Carinci, P. Gaborit, J. Issaly, I. Dusfour, S. Briolant, and R. Girod. 2015. "*Anopheles Darlingi* (Diptera: Culicidae) Dynamics in Relation to Meteorological Data in a Cattle Farm Located in the Coastal Region of French Guiana: Advantage of Mosquito Magnet Trap." *Environmental Entomology* 44 (3): 454–62. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv053>.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. "Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure." *Evolution* 38 (6): 1358–70. <https://doi.org/10.2307/2408641>.
- Wright, S. 1965. "The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating." *Evolution* 19 (3): 395–420. <https://doi.org/10.2307/2406450>.

Supplementary data

Table S1. Repeats and primer sequences of the microsatellite loci designed for *An. darlingi*.

Locus (GenBank)	Repeat numbers	Primer sequences (5' – 3')	Ta (°C)	Fluorochrome
PANEL A				
ADC01 [†] (AF322185)	GA	F - GCTCTAATGATGCTCGTAACCGCT R - CGACACCGCACTTGCTACTACTCTG	64	FAM
ADC28 [†] (AF322187)	GA	F- CTCGTCGTCAGCGTCGTGC R- TGCCCATCCACTGCGTAACGG	64	PET
ADC29 [‡] (AF322188)	GA	F- CATGGAACGCACTGGGATTATT R- CATCGCGTAATCCGAAATTGAA	64	PET
ADC110 [†] (AF322190)	GT	F- CCGAACAACAGCCAACAGCTGTG R- CGTTCGACACAATCGTTACACACG	64	VIC
ADC138 [†] (AF322192)	AC	F- CTTGAGCCGGTGTGTGCTGC R- CCATTCTCGCAGCCTCCAGGAC	64	NED
PANEL B				
ADC02 [‡] (AF322186)	GA	F- CACTGCGGGCATCATTTC R- CCGGGCTATCTATTCTTCCCACT	62	PET
ADC107 ^{*□} (AF322189)	AC	F- GTCCACTCCCAGGCACAC R- AGCAATCGAGGCAAACCTTC	62	FAM
ADC137 [†] (AF322191)	GT	F- TCTTACGGGAATGGTGCGACGCTC R- CAGCCACCCATACGCTGTTGACCA	62	NED
ADMP9 [*] (DV729762)	AAC	F- ACAACGTCCAATGCAACAAC R- CTCGAGGGCTTTCTGTATCG	62	VIC

Ta: annealing temperature use in this study. The GenBank accession number is listed below the corresponding locus.

[†] described by Conn *et al.* (Conn *et al.* 2001)

^{*} described by Angella *et al.* (Angella *et al.* 2014)

[□] Redesigned for this study

Table S2. Allele number obtained for *An. darlingi*. Corresponding site code: ALI: Alikéné, BLO: Blondin, BOM: Bois Martin, CAC: Cacao, CAM: Camopi, DAG: Dagobert, DOR: Dorlin, KOU: Kourou, MAT: Matoury, MID: Midenangalanti, MOZ: Mozeskreek, REG: Regina, SGO: Saint Georges, SMP: Saut Maripa, SIK: Sikini.

Site	Number of individuals	Locus								Totality of loci
		ADC01	ADC110	ADC28	ADC29	ADC107	ADC02	ADC137	ADMP9	
ALI	167	29	11	9	22	15	15	11	10	122
BLO	622	40	12	5	20	12	23	11	15	138
BOM	31	19	10	3	17	10	8	11	7	85
CAC	136	31	11	5	13	8	14	10	13	105
CAM	62	24	10	6	13	13	12	11	8	97
DAG	91	17	9	4	14	5	13	10	9	81
DOR	83	19	12	2	18	9	11	12	10	93
KOU	40	24	9	4	9	6	12	8	10	82
MAT	29	23	7	4	12	6	14	8	11	85
MID	62	22	12	3	18	12	12	12	9	100
MOZ	88	23	10	6	21	8	18	14	11	111
REG	83	30	11	4	16	6	18	10	13	108
SGO	297	34	12	5	22	8	25	10	12	128
SMP	59	22	11	6	17	10	15	11	10	102
SIK	31	20	8	5	12	10	10	11	9	85
All	1881	54	14	9	37	24	35	18	18	209

3. Discussion générale

Dans le cadre de cette thèse je me suis intéressée à la structure génétique des populations d'*An. darlingi*, principal vecteur du paludisme en Guyane.

Les études de structure des populations d'*An. darlingi* menées dans cette thèse ont permis de combler le manque de connaissances existantes sur le sujet en Guyane. Ces études répondent à un besoin de compréhension de la dynamique des populations d'*An. darlingi*.

Un travail préliminaire s'est avéré nécessaire afin d'évaluer la faisabilité d'une étude de la structure génétique des populations d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane. De telles études à grande échelle s'appuient sur plusieurs campagnes de collecte impliquant plusieurs méthodes de collecte et des créneaux horaires de capture variables. Ces modifications peuvent être à l'origine de biais d'échantillonnage qu'il a été nécessaire d'évaluer.

Aucune valeur de F_{ST} ne s'est révélée statistiquement significative pour toutes les comparaisons effectuées. L'analyse discriminante en composante principale a donné des populations dont les ellipses se superposaient. Ces résultats suggèrent que les 3 types de collecte étudiés (capture sur Homme, MosquitoMagnet[®] avec Lurex[™] ou octénol) attirent les mêmes populations d'*An. darlingi*. Différentes méthodes de collectes peuvent donc être utilisées pour réaliser l'échantillonnage d'anophèles dans le cadre d'études moléculaires comme des études de structure génétique des populations. De même, l'heure de capture n'a pas été associée à des variations des populations anophéliennes.

Cette étude préliminaire a permis de confirmer que notre choix d'échantillonnage pour l'étude de structure des populations d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane n'insérait pas de biais dû à la méthode ou l'heure de capture et permettait d'étudier la structure d'*An. darlingi* en Guyane.

Le second travail avait donc pour objectif d'évaluer la structure génétique d'*An. darlingi* en Guyane. Pour ce faire, 1881 moustiques, capturés dans 14 sites répartis en Guyane sur le littoral et en forêt et un site forestier au Suriname, ont été génotypés.

Les analyses réalisées avec STRUCTURE ont permis de mettre en évidence cinq « clusters » comme indiqué dans la **Figure 8**. Les sept sites situés le long du littoral se répartissent en deux clusters : le premier était constitué de Blondin, Régina, Saint-Georges et Saut-Maripa et le second contenait Kourou, Matoury et Cacao. Trois sous-populations étaient détectées dans les sites forestiers : un cluster était formé par Dagobert, Alikéné, Camopi et Sikini, le second par Dorlin, Bois Martin et Midenangalanti. Enfin, Mozeskreek, le seul site au Suriname, a formé un « cluster » à lui tout seul.

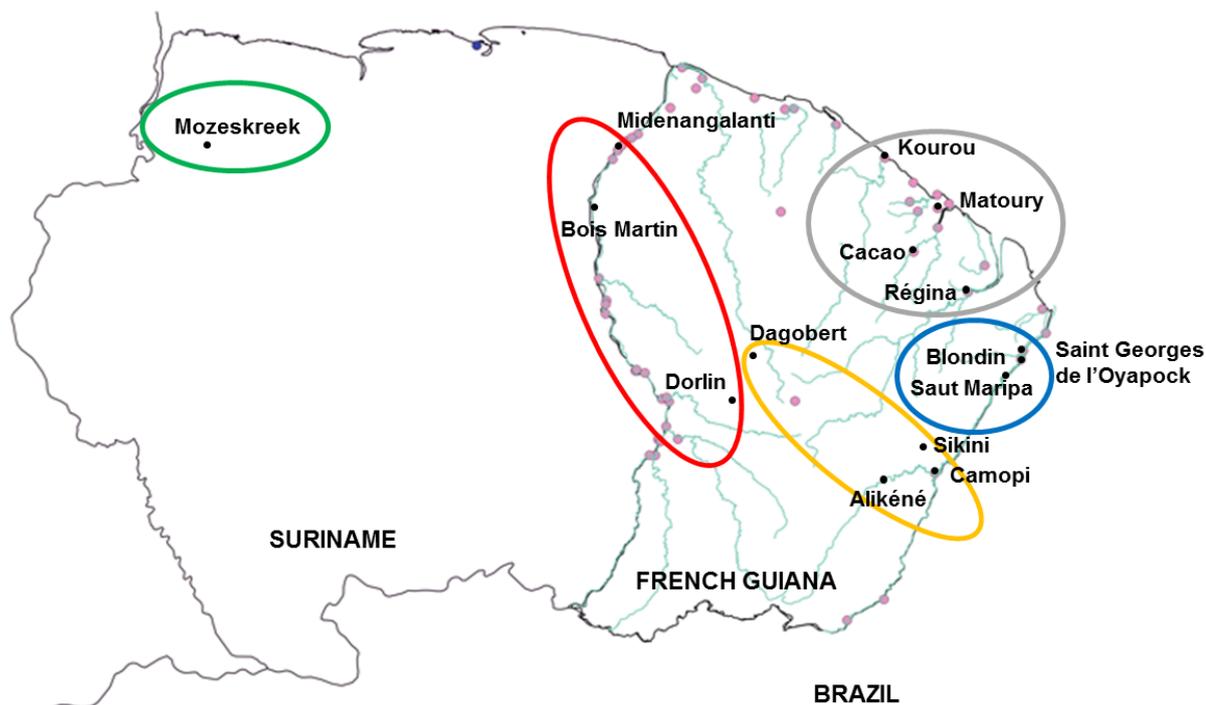


Figure 8 : Assignment des populations d’An. darlingi par site selon les analyses d’inférence bayésienne réalisées avec le logiciel STRUCTURE.

Chaque couleur correspond à un cluster contenant des populations d’An. darlingi génétiquement similaires.

Concernant les sites du littoral (Kourou, Matoury, Cacao, Régina, Saint-Georges, Blondin et Saut-Maripa) (en gris et bleu sur la **Figure 8**), l’homogénéité des populations est en adéquation avec la situation locale. Les déplacements humains y sont importants via le seul réseau routier présent en Guyane qui relie Saint-Laurent-du-Maroni à Saint-Georges en passant pas Kourou, Matoury, Cacao et Régina (**Figure 1**). Saint-Georges est également relié à Blondin et Saut-Maripa par des navigations fréquentes en pirogue sur le fleuve Oyapock. L’attribution des individus à l’un ou l’autre des deux clusters du littoral se fait graduellement selon l’éloignement géographique entre les sept sites avec une appartenance à l’un des 2 clusters dans des proportions variables. Il est probable que ce phénomène soit expliqué par une diffusion passive des moustiques avec les déplacements humains.

Concernant les sept sites forestiers en Guyane, les sites proches du fleuve Oyapock (Alikéné, Sikini et Camopi, en orange sur la **Figure 8**) et ceux du fleuve Maroni (Midenangalanti et Bois Martin, en rouge sur la **Figure 8**) se trouvaient dans deux groupes différents. Les deux sites d’orpillage au centre de la Guyane, Dagobert et Dorlin, bien que géographiquement proches, sont quant à eux répartis dans 2 clusters différents : Dagobert appartenait au cluster contenant les sites de l’Oyapock et Dorlin était avec le cluster des sites du Maroni. Dorlin est situé le long de la crique Petit Inini qui se jette dans la rivière Grande Inini se jetant elle-même dans le fleuve Maroni. Il paraît donc probable que les moustiques de Dorlin se retrouvent génétiquement proches de ceux du fleuve Maroni puisque les déplacements humains fluviaux les relient et peuvent entraîner une diffusion passive. De manière semblable, l’axe entre Dagobert et Camopi est soumis à un important déplacement d’orpilleurs

qui peuvent travailler sur différents sites d'orpillage sur une même année dans cette zone (Pommier de Santi et al. 2016b). Ce trafic fluvial peut être à l'origine de diffusion passive de moustiques et explique que Dagobert est situé dans le même cluster que les sites de l'Oyapock. On constate une nette séparation entre les sites du littoral et les sites forestiers avec une différenciation génétique significative entre ces faciès écologiques. Mozeskreek, le seul site externe au département, apparaît comme un groupe externe (« outgroup ») constituant à lui tout seul un cluster. Ces observations, sur la base d'un seul site extérieur au département, suggéreraient des échanges modérés entre la Guyane et les pays limitrophes.

L'analyse discriminative en composante principale (DAPC) a mis en évidence 4 clusters comme indiqué dans la **Figure 9**. Tous les sites du littoral ont été affectés dans un même groupe. Les sites de la forêt ont été répartis dans 3 groupes : un groupe comprenait Dagobert et Alikéné. Le second groupe comprenait Camopi et Sikini. Le dernier groupe comprenait Dorlin, Midenangalanti et Bois-Martin. Mozeskreek a été assigné au groupe formé par Camopi et Sikini.

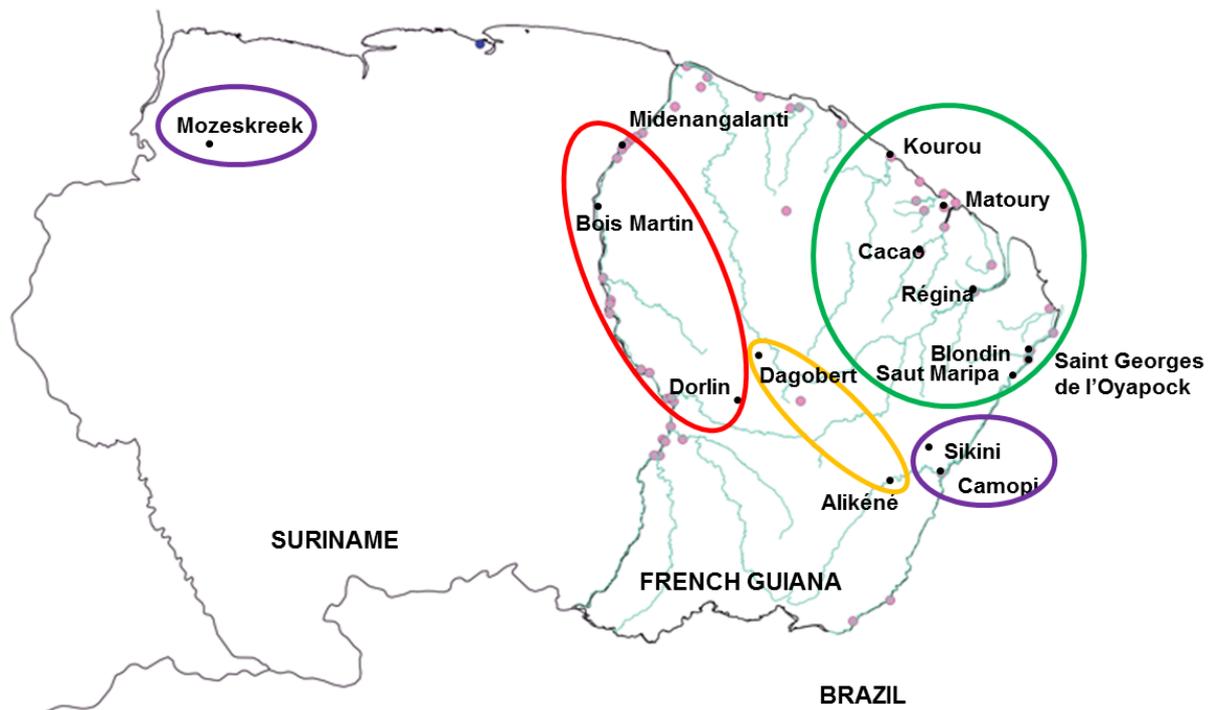


Figure 9 : Assignation des populations d'*An. darlingi* par site selon l'analyse discriminante en composantes principales (« Discriminant Analysis of Principal Component » [DAPC]).

*Chaque couleur correspond à un « cluster » d'*An. darlingi*.*

Tous les sites du littoral ont été affectés dans un même groupe alors que les analyses avec STRUCTURE en formaient deux. Les sites de la forêt ont été répartis dans 3 groupes similaires à ceux trouvés avec STRUCTURE : un groupe comprenait Dagobert et Alikéné. Le second groupe comprenait Camopi et Sikini. Le dernier groupe comprenait Dorlin, Midenangalanti et Bois-Martin. Mozeskreek a été assigné au

groupe formé par Camopi et Sikini, contrairement aux résultats des modélisations bayésiennes implémentées sous STRUCTURE. L'illustration DAPC semble avoir généré une distorsion des distances entre certaines populations.

Concernant les valeurs de F_{ST} obtenues pour les sites du littoral, une différenciation génétique non significative a été observée entre Saint-Georges et Matoury, Saut Maripa et Matoury, Saut Maripa et Régina, Saut Maripa et Saint-Georges. Toutes les autres comparaisons entre sites du littoral étaient statistiquement significatives mais les F_{ST} étaient faibles, ce qui est corrélé avec les résultats précédents. Concernant les sites en forêt, les valeurs significatives de F_{ST} étaient faibles à modérées et non significatives entre Sikini et Camopi, corroborant avec les analyses précédentes.

Les analyses ont donc révélé une structuration des populations d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane, particulièrement entre les sites du littoral et ceux situés en forêt.

En Guyane, sur le littoral, un pyréthrianoïde (deltaméthrine) est pulvérisé régulièrement dans le cadre de la lutte antivectorielle lors des épidémies d'arboviroses (dengue, chikungunya ou Zika) pour lutter contre leur vecteur, *Aedes aegypti* mais aussi ponctuellement lorsque des cas de paludisme sont détectés localement (aujourd'hui principalement sur Saint-Georges). Nous n'avons pas mis en évidence de structuration génétique d'*An. darlingi* entre les sites du littoral. Jusqu'à présent, *An. darlingi* est resté sensible à la deltaméthrine en Guyane (Epelboin et al. 2018) et il existe peu de preuves de résistance aux insecticides chez cette espèce, le seul exemple ayant été démontré en Colombie (Orjuela et al. 2018). À Blondin, une résistance rare aux pyréthrianoïdes a été signalée mais sans avoir pu s'y implanter (Vezenegho et al., manuscrit en préparation, Annexe 2). Compte tenu de nos résultats, l'importation d'une telle résistance sur le littoral pourrait alors se propager rapidement à toute la zone côtière.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La surveillance entomologique fait partie intégrante des programmes de lutte antivectorielle. L'étude de la structure génétique des populations d'*Anopheles* spp. permet de préciser leur distribution spatiale et leur dynamique. Ce sont des informations précieuses pour adapter les stratégies de lutte antivectorielle.

A l'échelle de la Guyane, nous avons mis en évidence cinq sous populations. Les deux premiers « clusters » regroupent tous les sites du littoral : Kourou, Matoury, Cacao, Régina, Blondin, Saint-Georges et Saut-Maripa. Les trois autres clusters forment une entité. Ils regroupent les populations de la forêt : Sikini, Camopi, Alikéné, Dagobert, Dorlin, Midenangalanti et Bois Martin. Une structuration des populations d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane a donc été mise en évidence selon les deux faciès écologiques. Les sites du littoral sont probablement soumis à une diffusion passive de moustiques liée aux déplacements humains par l'unique route nationale qui traverse la Guyane d'ouest en est le long du littoral. Les populations forestières d'*An. darlingi* semblent s'être structurées par diffusion passive selon les déplacements des orpailleurs entre les sites d'orpillage. Un test de la corrélation entre les distances génétiques et les distances géographiques permettrait de compléter ces résultats afin de voir si l'éloignement géographique explique la différenciation génétique observée entre ces sites. Ce test fait partie des perspectives.

Des résistances d'*An. darlingi* aux pyréthrinoïdes ont été détectées pour la première fois en Guyane à Saint-Georges par l'Institut Pasteur de la Guyane mais elles ne perdurent pas dans le temps (la sensibilité se rétablit ensuite). *Anopheles darlingi* étant une espèce principalement sylvatique, l'explication peut être l'introduction continue de moustiques sensibles allant des zones forestières proches vers les zones urbanisées du littoral (où les insecticides sont utilisés), diluant ainsi l'effet de résistance (Vezenegho et al. 2020, Annexe 2). Cette hypothèse est encouragée par les résultats de nos travaux. En effet, Saint-Georges fait partie du cluster du littoral avec Kourou, Matoury, Cacao, Régina, Blondin et Saut-Maripa. De plus, aucune différenciation génétique significative n'a été relevée entre Saint Georges et Matoury et Saint-Georges et Saut-Maripa. De ce fait, l'élimination du vecteur lors des pulvérisations d'insecticide à Saint-Georges ne pourrait qu'avoir un effet temporaire puisque les moustiques des localisations voisines pourraient recoloniser le site. En effet, la différenciation génétique étant nulle ou faible avec les moustiques des autres communes du cluster du littoral, ces dernières peuvent participer à la recolonisation.

La compréhension de ces éventuelles dynamiques de populations vectorielles mériterait d'être documentée pour comprendre ces variations très localisées des niveaux de résistances aux insecticides. Certaines études ont déjà démontré qu'il existe des microstructures d'*An. darlingi* (Angèlla et al. 2014; Campos et al. 2017) et un échantillonnage adapté nous permettrait de clarifier ce point en Saint-Georges de l'Oyapock.

D'autres perspectives sont également possibles avec les populations d'*An. darlingi* d'ores et déjà collectés. Lainhart *et al.* ont mis en évidence une structuration des populations d'*An. darlingi* en fonction de l'année de capture : un remplacement de la

population a eu lieu en 6 ans. Sur certains sites, les moustiques ont été capturés chaque année. Il serait intéressant de voir le niveau de différenciation génétique entre les populations d'un même site mais avec une ou plusieurs années d'écart. Angèlla *et al.* ont mis en évidence une microstructure saisonnière d'*An. darlingi*, c'est-à-dire l'existence de deux populations génétiquement différentes adaptées à des périodes différentes de la saison des pluies. Sur certains sites, les moustiques ont été capturés en saison des pluies et en saison sèche la même année. Il serait intéressant de voir le niveau de différenciation génétique entre les populations d'un même site selon la saison.

Nos travaux vont permettre de prendre en compte la structuration d'*An. darlingi* en Guyane lors de la conception des programmes de surveillance et de lutte antivectorielle.

ADC110

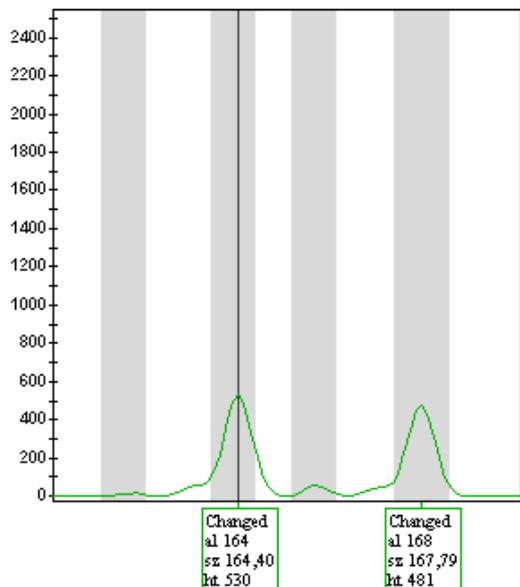
Séquence amplifiée : gj|18652997|gb|AF322190.1|

CCGAACAACAGCCAACAGCTGTGGAGAGGAGGTGTTAACTCGTACTGAATGGA
ATTTACATATTTTGTCTGAATGACAAATTGC GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGT CGTGCCTGCAATTCACGGGGAAACGGGGAGGGGTAATTCGTGT
GTAACGATTGTGTCTGAACG

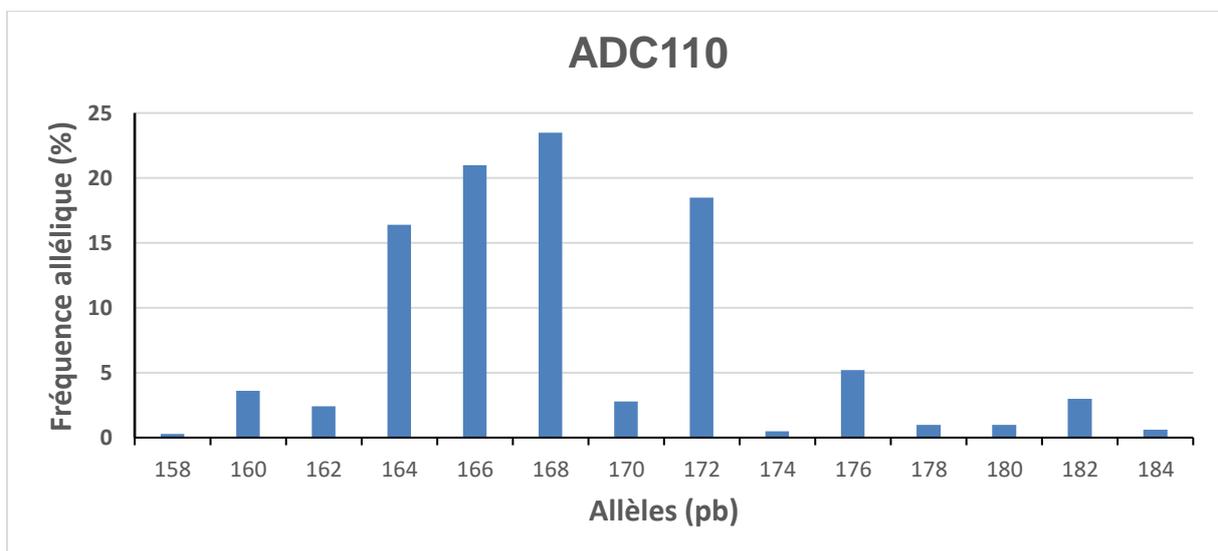
Amorces :

Désignation amorce	Motif répété	Séquence	Fluorochrome associé	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
ADC110-F	GT	5' CCGAACAACAGCCAACAGCTGTG 3'		7011,6
ADC110-R		5' CGTTCGACACAATCGTTACACACG 3'	VIC	7985

Exemple d'électrophorogramme :



Fréquence allélique :



ADC28

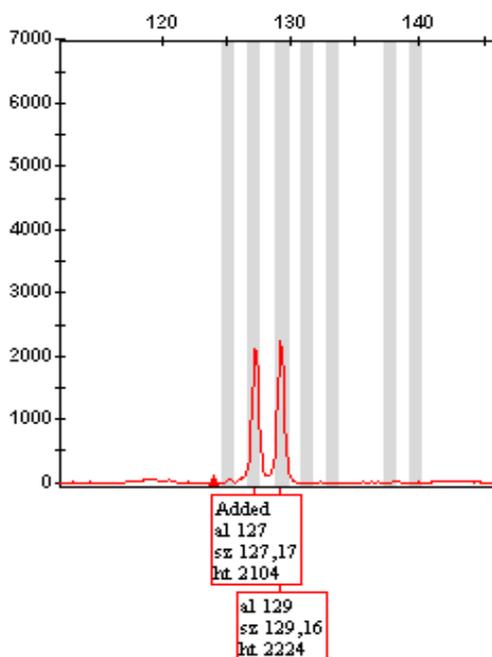
Séquence amplifiée : gj|18652994|gb|AF322187.1|

CTCGTCGTCAGCGTCGTGCCAAGTACGGACACTGTGCCTGTCTCCTTAGACA**G**
AGAGAGAGAGAGAGAGAAACAGAGAGCATAACATTAGACGCTCGTCCCGCCATT
TTCT**CCGTTACGCAGTGGATGGGCA**

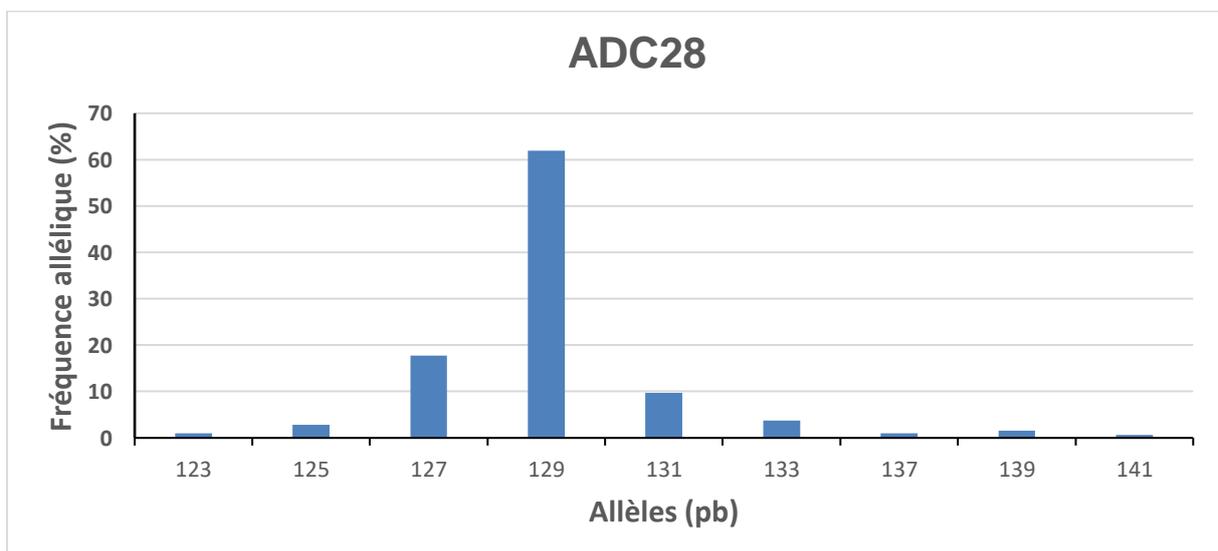
Amorces :

Désignation amorce	Motif répété	Séquence	Fluorochrome associé	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
ADC28-F	GA	5' CTCGTCGTCAGCGTCGTGC 3'		5771,8
ADC28-R		5' TGCCATCCACTGCGTAACGG 3'	PET	7266

Exemple d'électrophorégramme :



Fréquence allélique :



ADC29

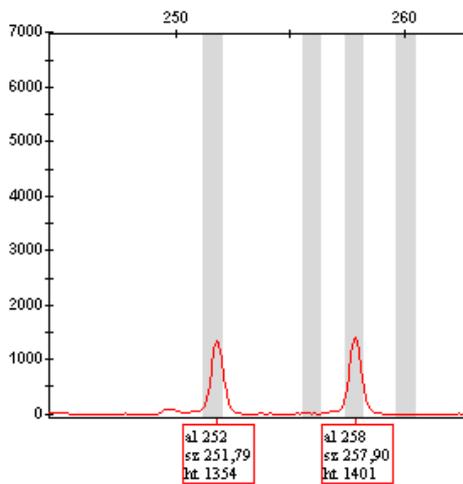
Séquence amplifiée : gj|18652995|gb|AF322188.1|

CATGGAACGCACTGGGATTATTGCTGGATGAACCGACAGAAGTAGAAATGGACT
CCGGTGTGGTATGCTCAAGCAGCAACGCGGTGGATAACTATTATGCAATCCAT
CGATCGTTGGCCGAGAATGAACAGATA **GAGAGAGAGAGAGAGAGA** AAGCGAG
GGGATGGAATAGAGTGTGGTTGGCTTCATTGTGCGACCGCCCGATGATGCTTAA
AAGGGAAACTGATTTTGCAATTCAATTTCCGGATTACGCGATG

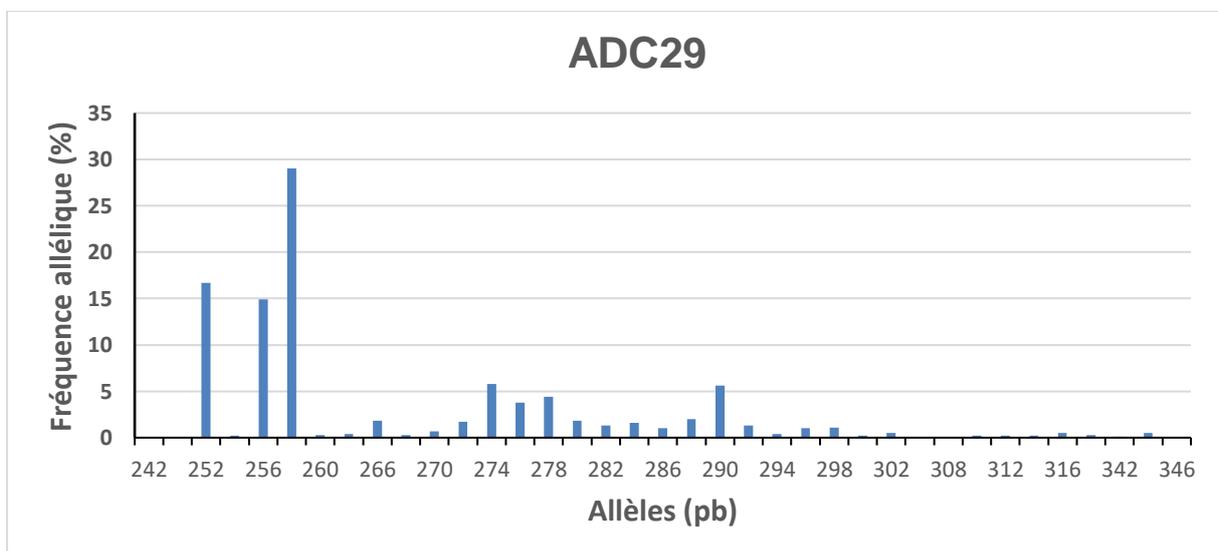
Amorces :

Désignation amorce	Motif répété	Séquence	Fluorochrome associé	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
ADC29-F	GA	5' CATGGAACGCACTGGGATTATT 3'		6774,5
ADC29-R		5' CATCGCGTAATCCGAAATTGAA 3'	PET	7627

Exemple d'électrophorogramme :



Fréquence allélique :



ADC02

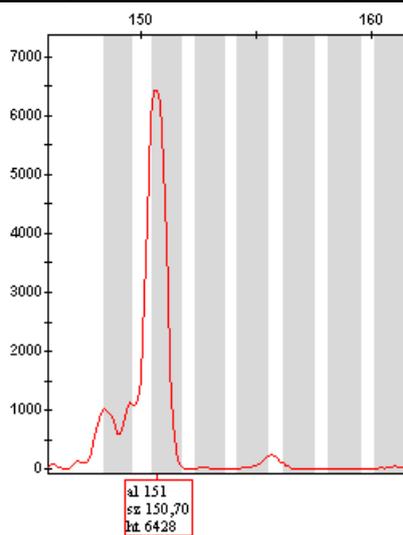
Séquence amplifiée : |18652993|gb|AF322186.1|

CACACTGGGGCATCATTTCATTTTCGTAGATAGACAAGGAGGGTGGGAGAGGGAG
GGGAATAGTGGGAGAAATAGAGAGAAAAAATA[GAGAGAGAGAGAGA]AGAAGA
AGAGAAAAAGAGAGAGAGAGAGAGTGGGAAAGAATAGATAGCCCGG

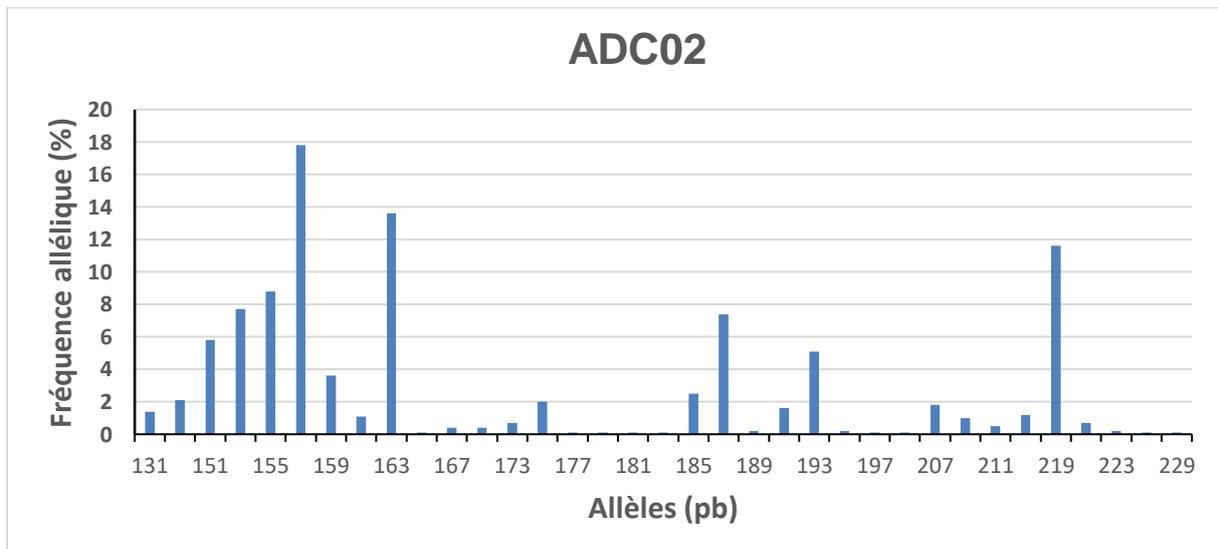
Amorces :

Désignation amorce	Motif répété	Séquence	Fluorochrome associé	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
ADC02-F	GA	5' CACACTGGGGCATCATTTCATTTTC 3'		6974,6
ADC02-R		5' CCGGGCTATCTATTCTTTCCCACT 3'	PET	8105

Exemple d'électrophorégramme :



Fréquence allélique :



ADC137

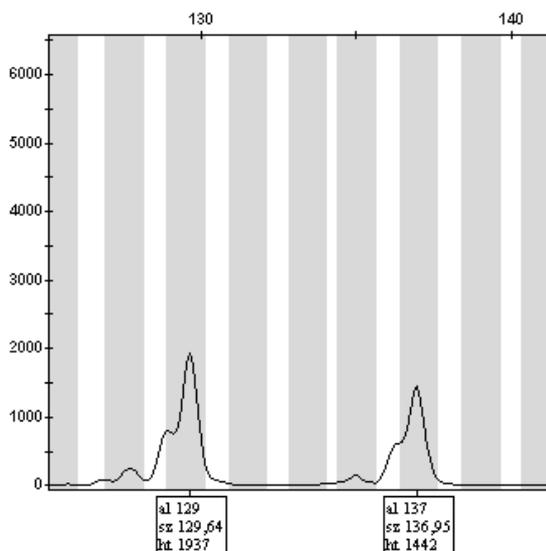
Séquence amplifiée : gj|18652998|gb|AF322191.1|

TCTTACGGGAATGGTGCACGCTCGGATGCGACAGTTTTGCGTGGTTCGCACA
TGGTCTCCTTTTCTGTGC GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT ATGTGTTTCGCTAAC
CTGAATATTGGTCAACAGCGTATGGGTGGCTG

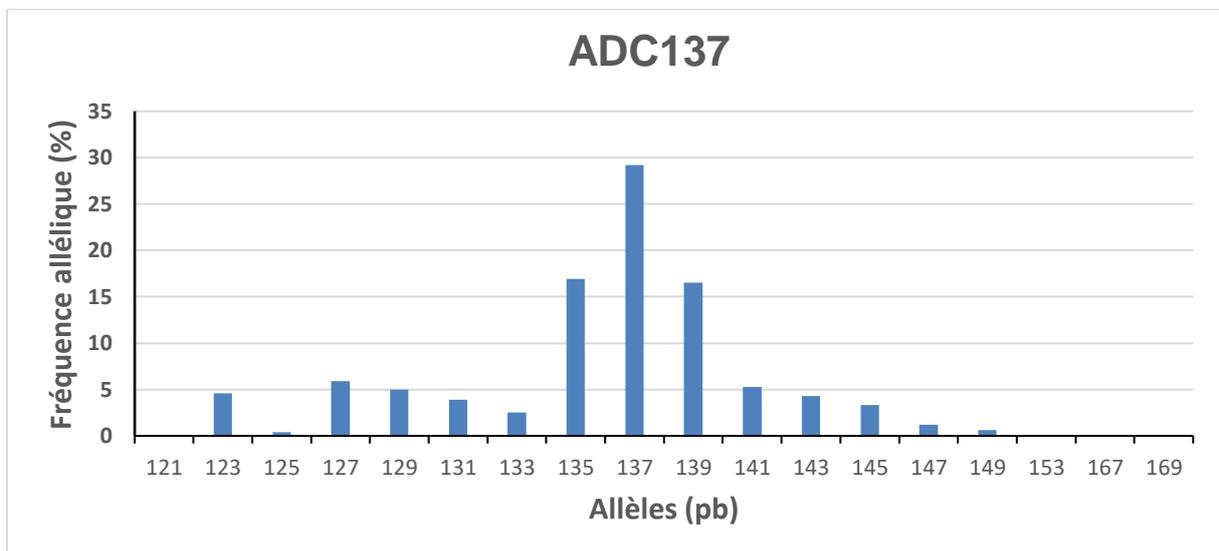
Amorces :

Désignation amorce	Motif répété	Séquence	Fluorochrome associé	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
ADC137-F	GT	5' TCTTACGGGAATGGTGCACGCTC 3'		7384,8
ADC137-R		5' CAGCCACCCATACGCTGTTGACCA 3'	NED	7954

Exemple d'électrophorégramme :



Fréquence allélique :



ADMP9

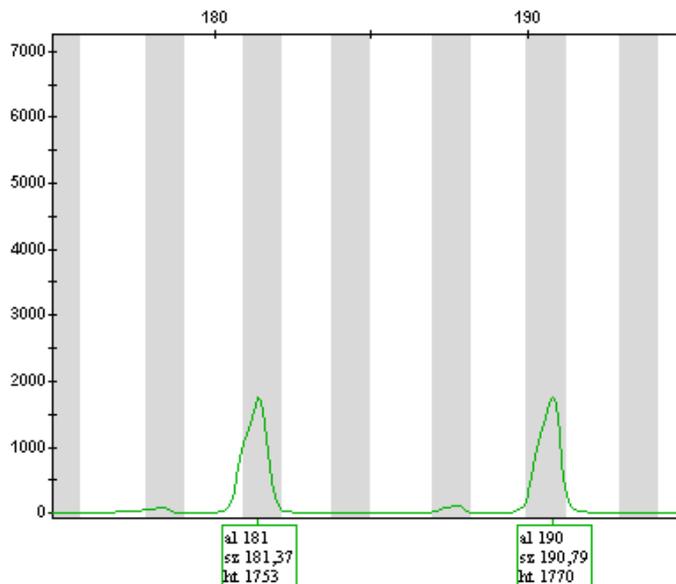
Séquence amplifiée : gj|82560823|gb|DV729762.1|DV729762

ACAACGTCCAATGCAACAACGGCCAATGAACAACAACAACAACAACAACA
ACAACAACGACAGAGGCTCCAGCAACGAATGCTTCTAGCAGCTCGAATACGAC
CACAACGGAGCCGAGCCTGGTGGATCAGTATCGGGATCAGGTACGCCAGGAAG
CGATACAGAAAGCCCTCGAG

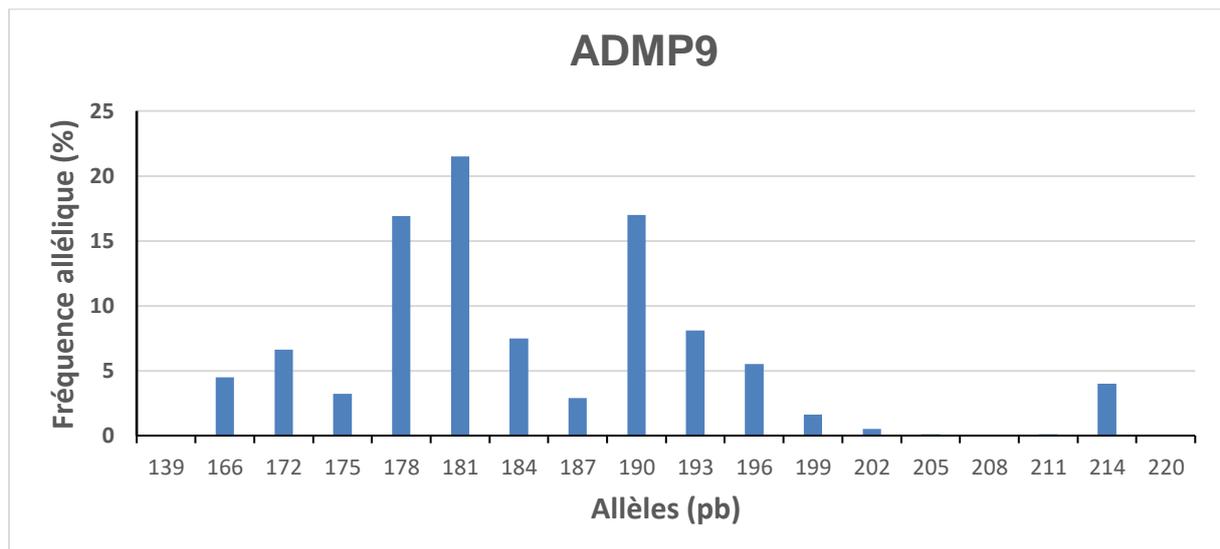
Amorces :

Désignation amorce	Motif répété	Séquence	Fluorochrome associé	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
ADMP9-F	AAC	5' ACAACGTCCAATGCAACAAC	3'	6048
ADMP9-R		5' CTCGAGGGCTTTCTGTATCG	3'	VIC 6818

Exemple d'électrophorégramme :



Fréquence allélique :



ANNEXE 2 : Short Communication in preparation for submission to American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Title: Variation in pyrethroid resistance phenotypes in *Anopheles darlingi* from residual malaria transmission area: warning on suspected resistance built-up in French Guiana.

Authors: Samuel Vezenegho¹, Romuald Carinci¹, Jean Issaly¹, Christophe Nguyen^{2,3}, Pascal Gaborit¹, Laetitia Ferraro¹, Guillaume Lacour¹, Emilie Mosnier^{4,5}, Vincent Pommier de Santi^{3,6}, Yanouk Epelboin¹, Romain Girod^{1,7}, Sébastien Briolant^{2,3,*}, Isabelle Dusfour^{1,8,*}

Author's affiliations:

¹Vectopôle Amazonien Emile Abonnenc, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana, France.

²Unité de Parasitologie et Entomologie, Département de Microbiologie et Maladies Infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France.

³Aix Marseille Université, IRD, AP-HM, SSA, UMR Vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéennes (VITROME), IHU - Méditerranée Infection, Marseille, France.

⁴ Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, rue des flamboyants, Cayenne, French Guiana, France

⁵Aix Marseille University, INSERM, IRD, SESSTIM, Sciences Economiques & Sociales de la Santé & Traitement de l'Information Médicale, Marseille, France

⁶Centre d'Epidémiologie et de Santé Publique des Armées, Marseille, France.

⁷Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar

⁸Département de Santé Globale, Institut Pasteur, Paris, France.

* corresponding authors, contribute equally to the work.

Anopheles darlingi is the main vector of malaria in South America. For decades, this species has been targeted by vector control program including indoor residual spraying and bednets distributions. *Anopheles darlingi* has a high adaptability in its behavior depending on the locality in its distribution^{1,2}. Known as a sylvatic mosquito, its density drastically increases in presence of human³. However, few evidence of insecticide resistance exists in that species^{4,5}. The reason that was early hypothesized and supported by population genetic studies was the massive genetic exchange between the forest and the human dwellings where vector control is operated, that dilutes the resistance effect⁶. In French Guiana, *An. darlingi* is found across the territory and remains strongly associated to malaria outbreaks. Those outbreaks and transmission of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* occur along the rivers and inland close to goldmines⁷⁻¹⁰. A drastic loss of cases have been recorded the last 20 years but the area of Saint Georges de l'Oyapock, at the border with Amapa state (Brazil), remains impacted¹¹. In areas of high transmission, indoor residual spraying with deltamethrin is recurrently implemented. Since 2012, long lasting impregnated nets (LLINs) have been distributed. Furthermore, spatial sprays of deltamethrin are performed during outbreaks. Additionally, Armed forces involved in illegal goldmining control use permethrin-impregnated uniforms¹². Molecules from the pyrethroid family are the only one available and authorized for adulticide use under the European and French regulation. In a context of malaria control, means to reduce vector must be evaluated and insecticide efficacy monitor.

We selected two populations of *An. darlingi* in French Guiana. The first one is located at La Césarée (LC) farm in Macouria at 45-minutes' drive from Cayenne, the capital town. This equine and bovine farm is surrounded by a humid savannah. No insecticidal treatment is performed in that area. The second site is situated in Blondin (BL) hamlet accessible by 5-minutes boat from Saint Georges de l'Oyapock located at 2-hours' drive from Cayenne. This group of houses along the Oyapock river suffered from recurrent malaria cases. Vector control was implemented each year to prevent malaria transmission from September to December. Inhabitants were equipped with LLINs impregnated with deltamethrin (2012) then alpha-cypermethrin (2016).

Mosquito collections were performed in 2014, 2015, 2016 and 2018 (Table 1) using human landing collection. CDC-bottle tests were performed either in our field lab of Saint Georges de l'Oyapock with freshly collected mosquitoes from Blondin or in our Cayenne lab with mosquitoes captured at La Césarée. Sixty-seven to 315 mosquitoes were exposed to the insecticide per time point, site and insecticide along with control bottle for 4 to 12 replicates (Table 1). Insecticide resistance was evaluated for deltamethrin (12.5µg/ml), permethrin (21.5µg/ml) and alpha-cypermethrin (12.5µg/ml). Additionally, malathion (50µg/ml) was tested at Blondin in 2014 and 2015 (Table 1). The number of knocked-down mosquitoes in the impregnated bottle, which included both dead and unable to fly mosquitoes, were recorded every 5 to 15 min minutes until 100% of them were down (Table 1). Species identification was performed after the test. Raw data were corrected by Abbott's formula when needed.

Therefore, we obtained knock-down rates at 30 min (30%KD), the recommended diagnostic time, and also a KT50/95 value which is the theoretical time to knock down/kill 50%/95% of mosquitoes. This time is calculated based on datasets with a minimum of four time-points producing from 0 to 100% of 30%KD. The probit regression of the knocked-down response over time was performed in BioRssays in R environment, which produces *p-value* for the logistic regression significance. The *p-values* equals to 0.97 and above permitted to consider the regression valid (ref). The script also permits to compare regression results using chi-square test . In addition, the ratio of resistance RR50 or RR95 generally calculated with the KT values divided by the same values for reference strain were calculated per insecticide by dividing the obtained values by the minimal KT in the panel.

To complement the study, surviving (n = 16) and dead (n = 32) *An. darlingi* mosquitoes exposed to diagnostic concentrations of pyrethroid insecticides and malathion (caught at Blondin hamlet in 2014) were used to amplify and sequence a fragment of the acetylcholinesterase 1 (ACE1) gene as described in¹³ and a fragment of the voltage-gated sodium channels (VGSC) gene as described in¹⁴. This last one spanning codons 1010, 1013 and 1014 at the S6 segment of domain II to identify point mutations,

which have been associated with insecticide resistance in different species of *Anopheles* malaria vectors.

All mosquitoes were identified as *An. darlingi*. All populations with a 30%KD above 98% were diagnosed as susceptible according to the rules for CDC-bottle test interpretation. As expected, La Césarée population was susceptible to all pyrethroids whatever the date. Blondin population was susceptible to malathion with 100% of dead mosquitoes at 30 minutes in 2014 and 2015. However, we observed that 30%KD values varied below 90%, the threshold for resistance, up to 100% for pyrethroid compounds in Blondin (Table 1). In 2014 and 2016, those results had changed from one week to another from resistant to susceptible. Susceptibility was recorded in 2015 and 2018 for which only one week of test was performed.

To investigate further those fluctuations, KT50, KT95 and associated Resistance Ratio (RR) were obtained. First, they confirmed the trends observed for the end-point measures at 30 minutes. La Césarée had the lowest KT's overall while KT from BL-2016-38 where the highest in Blondin for all insecticides. The lowest values at la Césarée were used to calculate RR50 for each insecticide (Table 2, underlined values). The ratio calculated with those values highlighted the fact that the population of 2014-BL-38 expose to deltamethrin and BL-2016-38 exposed to any pyrethroids had resistance ratio (RR50) above 2, the threshold to diagnose resistance. Secondly, we observed that the slope of regression was lower in BL than in LC, suggesting that even if the data do not support resistance, it takes more time to knocked down mosquitoes with pyrethroids in BL than in LC.

No *kdr* mutations nor ACE1 mutations were detected in the 48 *An. darlingi* from Blondin.

The observations made over the years, rise the concern of insecticide resistance development in *An. darlingi* population in places where the use of pyrethroids is important¹⁵. In Blondin, both LLIN and IRS are performed with pyrethroids and *Aedes* control could be performed as well. The population uses household insecticides for several purposes.

Since 2017, no IRS is routinely performed anymore but only in case of outbreak along with spatial spraying, while distribution of LLINs is sustained but Public health agency. In 2014, Blondin was the epicenter of malaria transmission in Saint Georges de l'Oyapock (STG). After several years without large outbreaks, a drastic resurgence appeared in Trois Palétuviers in 2017. The hamlet is situated downstream of STG on the Oyapock river. In the meantime, French Guiana population suffered from chikungunya and Zika outbreaks against which pyrethroid-based control had been performed. None of those insecticidal applications are implemented in La Césarée.

Nevertheless, *An. darlingi* resistant populations are rare across its distribution on the opposite of *Aedes aegypti*, that may co-occurs but for which a drastic increase of resistance was observed¹⁶. In fact, constant efficacy of control methods was already observed in the past in comparison with *Ae. aegypti* population that became resistant to DDT. The hypothesis formulated at that time was the continuous introduction of susceptible mosquitoes from forested areas to urbanized ones. Population genetic studies support this hypothesis⁶. *Anopheles darlingi* resistance development seems to be slow down or nullified by a dilution effect. This factor would explain the variation in our monitoring.

Resistance to pyrethroids is a crucial point in French Guiana. As European territory, restrictive use of adulticide occurs. In consequence, only pyrethroids are available. This monotherapy conducts to select further resistance knowing that those molecules are used beyond vector control in household and against pest mosquitoes. In addition, LLIN providers have not renewed market released authorization for European markets, restraining the number of available product.

Nevertheless, insecticide resistance surveillance should be sustained in those places and a management plan set up. To reach this goal molecular markers of resistance should be obtained to early detect resistance. As shown in our study and a previous one in Colombia¹⁴, mutations on the sodium voltage gated gene is not involved in our *An. darlingi* populations. Further works on metabolic resistance are required as *An. darlingi* populations from Colombia exhibit metabolic resistance involving oxidases and esterases¹⁷. In addition, vector control method should be evaluated to maintain an efficient toolbox in a context of malaria control in the region.

Insecticide	Site	Year	Wk	N	n	30%KD	STD
Deltamethrin (12.5µg/ml)	BL	2014	39	81	4	85%	11%
			41	88	4	93%	4%
			42	67	4	100%	0%
		2015	39	116	5	100%	0%
		2016	38	110	4	92%	2%
			42	109	5	50%	17%
	2018	39	315	12	100%	0%	
	LC	2014	38	81	4	100%	0%
		2018	33	170	8	100%	0%
			35	131	4	100%	0%
Alpha-cypermethrin (12.5µg/ml)	BL	2015	40	117	6	98%	3%
		2016	38	131	4	81%	3%
			42	135	9	77%	17%
		2018	39	109	4	100%	0%
	LC	2016	36	215	9	100%	0%
		2018	36	91	4	100%	0%
			37	105	4	100%	0%
			38	114	4	100%	0%
Permethrin (21.5µg/ml)	BL	2014	39	82	4	93%	5%
			41	72	4	85%	11%
			42	89	4	100%	0%
		2015	39	150	7	100%	0%
		2016	38	106	4	92%	4%
			42	158	4	93%	2%
	2018	39	316	12	100%	0%	
	LC	2015	37	153	6	100%	0%
		2016	37	136	6	100%	0%
		2018	33	185	8	100%	0%
			35	95	4	100%	0%
	Malathion (50µg/ml)	BL	2014	42	85	4	100%
2015			39	95	4	100%	0%

Table 1: Percentages of knocked-down mosquitoes at 30 minutes (30%KD) and the standard deviation (STD) amongst replicates in CDC-bottle test for *Anopheles darlingi* populations collected in Blondin (BL) and La Césariée (LC). Test results are break down into the insecticidal molecule, year and week (Wk). In addition, the number of mosquitoes tested (N) and replicates are mentioned (n). Dark grey: resistant populations with 30%KD < 90%; light grey: 98%<30%KD< 99% resistance to control; white: susceptible 30%KD>98%.

Insecticide	Site	Year	Wk	n	KT50 [CI95]	KT95 [CI95]	RR50 (CI95)	RR95 (CI95)	Slope (SE)	Intercept (SE)	C	
Deltamethrin	BL	2014	39	11	11.3 [8.56-13.79]	50.16 [43.24-60.61]	2.09 [0.98-4.47]	4.10 [2.44-6.90]	2.64 (0.25)	-2.81 (0.38)		
			42	6	5.95 [4.57-7.24]	23.35 [19.63-29.18]	1.07 [0.41-2.77]	1.97 [1.07-3.63]	2.77 (0.28)	-2.14 (0.33)	a	
		2015	39	6	7.64 [5.84-9.07]	22.62 [19.73-27.59]	1.38 [0.59-3.22]	1.91 [1.07-3.41]	3.49 (0.44)	-3.08 (0.52)	a	
		2016	38	10	13.64 [12.59-14.64]	31.27 [28.53-34.95]	2.46 [1.39-4.36]	2.65 [1.55-4.51]	4.56 (0.29)	-5.18 (0.37)		
		2018	39	5	6.9 [6.55-7.25]	13.94 [13.04-15.07]	1.24 [0.69-2.24]	1.17 [0.67-2.04]	5.43 (0.24)	-4.55 (0.23)		
		LC	2018	33	5	5.53 [4.96-6.04]	11.83 [10.57-13.77]	-	-	4.97 (0.46)	-3.69 (0.4)	b
			2018	35	4	5.93 [5.53-6.33]	10.68 [9.72-12.08]	1.07 [0.50-2.27]	0.90 [0.40-2.03]	6.45 (0.56)	-4.99 (0.47)	b
			2015	40	6	7.43 [5.54-9.01]	26.02 [21.90-33.51]	1.59 [0.73-3.48]	2.10 [1.32-3.35]	3.02 (0.38)	-2.63 (0.46)	c
		BL	2016	38	14	20.34 [19.42-21.24]	44.18 [41.71-47.15]	4.37 [2.51-7.58]	3.57 [2.41-5.29]	4.88 (0.20)	-6.39 (0.29)	
			2018	39	6	7.02 [6.41-7.6]	15.58 [14.09-17.64]	1.50 [0.74-3.05]	1.26 [0.71-2.20]	4.75 (0.35)	-4.02 (0.35)	d
Alpha-cypermethrin	LC	2016	36	7	4.65 [4.18-5.09]	12.36 [11.20-13.89]	-	-	3.87 (0.25)	-2.58 (0.22)		
			36	4	7.08 [6.54-7.61]	12.82 [11.62-14.57]	1.52 [0.70-3.28]	1.03 [0.50-2.14]	6.37 (0.55)	-5.42 (0.50)	ce	
		2018	37	7	8.43 [7.72-9.12]	19.91 [18.03-22.50]	1.81 [0.94-3.49]	1.61 [0.96-2.68]	4.41 (0.30)	-4.08 (0.32)		
			38	4	6.53 [5.82-7.20]	13.64 [12.05-16.12]	1.40 [0.67-2.91]	1.10 [0.60-2.02]	5.14 (0.49)	-4.19 (0.46)		
			39	9	7.82 [5.83-9.77]	33.44 [28.60-39.87]	1.18 [0.32-4.29]	2.19 [1.37-3.50]	2.60 (0.23)	-2.32 (0.33)	f	
		2014	41	6	10.44 [7.94-12.45]	43.79 [33.69-69.35]	1.58 [0.50-4.98]	2.86 [1.61-5.11]	2.64 (0.38)	-2.69 (0.48)		
			42	5	8.20 [4.80-8.20]	15.30 [13.69-18.04]	1.03 [0.18-5.70]	1.00 [0.53-1.87]	4.69 (0.82)	-3.91 (0.91)		
		BL	2015	39	6	9.78 [8.19-11.05]	27.69 [24.26-33.62]	1.48 [0.47-4.61]	1.81 [1.11-2.95]	3.63 (0.41)	-3.60 (0.50)	f
			2016	38	9	16.92 [16.06-17.76]	32.18 [30.12-34.83]	2.56 [0.86-7.58]	2.10 [1.31-3.37]	5.89 (0.34)	-7.24 (0.45)	
			2018	39	6	9.22 [8.74-9.69]	19.55 [18.31-21.08]	1.39 [0.47-4.11]	1.28 [0.82-1.98]	5.04 (0.24)	-4.86 (0.26)	g
Permethrin	LC	2015	37	5	6.59 [5.12-7.71]	15.26 [13.95-17.15]	-	-	4.51 (0.60)	-3.69 (0.67)	h	
			37	7	8.72 [8.12-9.3]	18.36 [16.88-20.30]	1.32 [0.43-4.02]	1.20 [0.71-2.01]	5.09 (0.31)	-4.78 (0.33)	g	
			33	5	6.78 [6.41-7.16]	12.62 [11.71-13.79]	1.02 [0.33-3.18]	0.82 [0.46-1.48]	6.10 (0.38)	-5.08 (0.34)		
		2018	35	5	7.84 [7.02-8.62]	18.19 [16.16-21.19]	1.18 [0.37-3.74]	1.19 [0.68-2.08]	4.50 (0.37)	-4.02 (0.38)	gh	

Table 2: Results of significant regressions performed per pyrethroid molecule, site, year and week (Wk): Lethal Time 50 (LT50), LT95, ratio of resistance (RR50 and RR95) with their confidence interval at 95% (CI95), parameters of regression (slope and intercept with their standard errors) are represented. Results of statistical comparison of regression parameters per insecticide are presented: a same letter corresponds to populations without differences (c). The number of time points per regression is also mentioned (n).

References:

1. Campos M, Alonso DP, Conn JE, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Genetic diversity of *Nyssorhynchus (Anopheles) darlingi* related to biting behavior in western Amazon. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):242. doi:10.1186/s13071-019-3498-4
2. Chu VM, Sallum M a. M, Moore TE, Lainhart W, Schlichting CD, Conn JE. Regional variation in life history traits and plastic responses to temperature of the major malaria vector *Nyssorhynchus darlingi* in Brazil. *Sci Rep*. 2019;9(1):5356. doi:10.1038/s41598-019-41651-x
3. Girod R, Roux E, Berger F, Stefani A, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Carme B, Dusfour I. Unravelling the relationships between *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) densities, environmental factors and malaria incidence: understanding the variable patterns of malarial transmission in French Guiana (South America). *Ann Trop Med Parasitol*. 2011;105(2):107-122. doi:10.1179/136485911X12899838683322
4. Orjuela LI, Morales JA, Ahumada ML, Rios JF, González JJ, Yañez J, Rosales A, Cabarcas DM, Venegas J, Yasnot MF, Quiñones ML. Insecticide Resistance and Its Intensity in Populations of Malaria Vectors in Colombia. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9163543. doi:10.1155/2018/9163543
5. Galardo AKR, Póvoa MM, Sucupira IMC, Galardo CD, Santos RLCD. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):765-769. doi:10.1590/0037-8682-0082-2015
6. Angèlla AF, Salgueiro P, Gil LHS, Vicente JL, Pinto J, Ribolla PEM. Seasonal genetic partitioning in the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Malar J*. 2014;13:203. doi:10.1186/1475-2875-13-203
7. Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, Dusfour I, Mendibil A, Simon F, Deparis X, Pagès F. Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. *Malar J*. 2016;15:35. doi:10.1186/s12936-016-1088-x
8. Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, Nguyen C, Vezenegho SB, Dusfour I, Girod R, Briolant S. Malaria in French Guiana Linked to Illegal Gold Mining. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(2):344-346. doi:10.3201/eid2202.151292
9. Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, Bogreau H, Hyvert G, Nguyen C, Pelleau S, Legrand E, Musset L, Nacher M, Briolant S. Malaria Hyperendemicity and Risk for Artemisinin Resistance among Illegal Gold Miners, French Guiana. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(5):903-906. doi:10.3201/eid2205.151957
10. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, Gomes MSM, Djossou F, Legrand E. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):525-533. doi:10.1590/0074-0276140031
11. Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Saldanha R, Guidez A, Gomes MS, Sanna A, Epelboin Y, Restrepo J, Davy D, Demar M, Djossou F, Douine M, Ardillon V, Nacher M, Musset L, Roux E. Resurgence risk for malaria, and the characterization of a recent outbreak in an Amazonian border area between French Guiana and Brazil. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):373. doi:10.1186/s12879-020-05086-4
12. Migliani R, Pradines B, Michel R, Aoun O, Dia A, Deparis X, Rapp C. Malaria control strategies in French armed forces. *Travel Med Infect Dis*. 2014;12(4):307-317. doi:10.1016/j.tmaid.2014.05.008
13. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*. 2004;13(1):1-7. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x
14. Orjuela LI, Álvarez-Díaz DA, Morales JA, Grisales N, Ahumada ML, Venegas H J, Quiñones ML, Yasnot MF. Absence of knockdown mutations in pyrethroid and DDT resistant populations of the main malaria vectors in Colombia. *Malar J*. 2019;18(1):384. doi:10.1186/s12936-019-3034-1
15. Vezenegho SB, Adde A, Pommier de Santi V, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Dusfour I, Girod R, Briolant S. High malaria transmission in a forested malaria focus in French Guiana: How can

exophagic *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention measures? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(9):561-569. doi:10.1590/0074-02760160150

16. Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):346-352. doi:10.1590/s0074-02762011000300015

17. Fonseca-González I, Quiñones ML, McAllister J, Brogdon WG. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):18-26. doi:10.1590/s0074-02762009000100003

BIBLIOGRAPHIE

- Adde, A., I. Dusfour, S. B. Vezenegho, R. Carinci, J. Issaly, P. Gaborit, C. Nguyen, V. Ardillon, R. Girod, and S. Briolant. 2017. "Spatial and Seasonal Dynamics of *Anopheles* Mosquitoes in Saint-Georges de l'Oyapock, French Guiana: Influence of Environmental Factors." *Journal of Medical Entomology* 54 (3): 597–605. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx031>.
- Akhavan, D., P. Musgrove, A. Abrantes, and R. d'A. Gusmão. 1999. "Cost-Effective Malaria Control in Brazil: Cost-Effectiveness of a Malaria Control Program in the Amazon Basin of Brazil, 1988–1996." *Social Science & Medicine* 49 (10): 1385–99. [https://doi.org/10.1016/S0277-9536\(99\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S0277-9536(99)00214-2).
- Alimi, T. O., D. O. Fuller, Whitney A. Qualls, S. V. Herrera, M. Arevalo-Herrera, M. L. Quinones, M. V. G. Lacerda, and J. C. Beier. 2015. "Predicting Potential Ranges of Primary Malaria Vectors and Malaria in Northern South America Based on Projected Changes in Climate, Land Cover and Human Population." *Parasites & Vectors* 8 (August): 431. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1033-9>.
- Altamiranda-Saavedra, M., J. E. Conn, and Margarita M. Correa. 2017. "Genetic Structure and Phenotypic Variation of *Anopheles darlingi* in Northwest Colombia." *Infection, Genetics and Evolution* 56 (December): 143–51. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.011>.
- Andrews, K. R., P. A. Hohenlohe, M. R. Miller, B. K. Hand, J. E. Seeb, and G. Luikart. 2014. "Trade-Offs and Utility of Alternative RADseq Methods: Reply to Puritz et al." *Molecular Ecology* 23 (24): 5943–46. <https://doi.org/10.1111/mec.12964>.
- Angêlla, A. F., L. H. S. Gil, L. H. P. Da Silva, and P. E. M. Ribolla. 2007. "Population Structure of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* in Rondônia, Brazilian Amazon, Based on Mitochondrial DNA." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (8): 953–58.
- Angêlla, A. F., P. Salgueiro, L. H. S. Gil, J. L. Vicente, J. Pinto, and P. E. M. Ribolla. 2014. "Seasonal Genetic Partitioning in the Neotropical Malaria Vector, *Anopheles darlingi*." *Malaria Journal* 13: 203. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-203>.
- Arnold, B., R. B. Corbett-Detig, D. Hartl, and K. Bomblies. 2013. "RADseq Underestimates Diversity and Introduces Genealogical Biases Due to Nonrandom Haplotype Sampling." *Molecular Ecology* 22 (11): 3179–90. <https://doi.org/10.1111/mec.12276>.
- Arredondo-Jiménez, J. I., J. Gimnig, M. H. Rodríguez, and R. K. Washino. 1996. "Genetic Differences among *Anopheles vestitipennis* Subpopulations Collected Using Different Methods in Chiapas State, Southern México." *Journal of the American Mosquito Control Association* 12 (3 Pt 1): 396–401.
- ARS (Agence régionale de santé) de Guyane. 2015. "Plan de Lutte Contre Le Paludisme En Guyane - Contrôle du paludisme sur l'ensemble du territoire 2015-2018." 99 pages. <https://www.guyane.ars.sante.fr/system/files/2017-06/palu%20plan%202015-2018.pdf>
- Artemov, G. N., V. N. Stegnyy, M. V. Sharakhova, and I. V. Sharakhov. 2018. "The Development of Cytogenetic Maps for Malaria Mosquitoes." *Insects* 9 (3): 121. <https://doi.org/10.3390/insects9030121>.
- Brasil, P., M. G. Zalis, A. De Pina-Costa, A. M. Siqueira, C. B. Júnior, Sidnei Silva, André Luiz Lisboa Areas, et al. 2017. "Outbreak of Human Malaria Caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A Molecular

- Epidemiological Investigation.” *The Lancet Global Health* 5 (10): e1038–46. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9).
- Briet, O., B. Huho, J. Gimnig, N. Bayoh, A. Seyoum, C. Sikaala, N. Govella, et al. 2015. “Applications and Limitations of Centers for Disease Control and Prevention Miniature Light Traps for Measuring Biting Densities of African Malaria Vector Populations: A Pooled-Analysis of 13 Comparisons with Human Landing Catches.” *Malaria Journal* 14 (1): 247.
- Briolant, S., M. M. Costa, C. Nguyen, I. Dufour, V. Pommier de Santi, R. Girod, and L. Almeras. 2020. “Identification of French Guiana Anopheline Mosquitoes by MALDI-TOF MS Profiling Using Protein Signatures from Two Body Parts.” *PLoS One* 15 (8): e0234098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098>.
- Campos, M., D. P. Alonso, J. E. Conn, J. M. Vinetz, K. J. Emerson, and P. E. M. Ribolla. 2019. “Genetic Diversity of *Nyssorhynchus (Anopheles) darlingi* Related to Biting Behavior in Western Amazon.” *Parasites & Vectors* 12 (1): 242. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3498-4>.
- Campos, M., J. E. Conn, D. P. Alonso, J. M. Vinetz, K. J. Emerson, and P. E. M. Ribolla. 2017. “Microgeographical Structure in the Major Neotropical Malaria Vector *Anopheles darlingi* Using Microsatellites and SNP Markers.” *Parasites & Vectors* 10 (1): 76. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2014-y>.
- Carne, B., V. Ardillon, R. Girod, C. Grenier, M. Joubert, F. Djossou, and F. Ravachol. 2009. “[Update on the epidemiology of malaria in French Guiana].” *Médecine Tropicale (Marseille)* 69 (1): 19–25.
- Carnevale, P., and V. Robert, eds. 2009. *Les anophèles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. Les anophèles : Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. Didactiques. Marseille: IRD Éditions. <http://books.openedition.org/irdeditions/10374>.
- Charlwood, J. D. 1980. “Observations on The Bionomics of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Brazil.” *Bulletin of Entomological Research* 70 (4): 685–92. <https://doi.org/10.1017/S0007485300007975>.
- Charlwood, J. D. 1996. “Biological Variation in *Anopheles darlingi* Root.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 391–98.
- Charrier, R., C. Garandeau, and K. Le Goaziou. 2017. “L’impact Du Spatial Sur l’économie de La Guyane, Insee Dossier Guyane - N°5.” <https://insee.fr/fr/statistiques/3182000>.
- Chu, V. M., M. A. M. Sallum, T. E. Moore, W. Lainhart, C. D. Schlichting, and J. E. Conn. 2019. “Regional Variation in Life History Traits and Plastic Responses to Temperature of the Major Malaria Vector *Nyssorhynchus darlingi* in Brazil.” *Scientific Reports* 9 (1): 5356. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41651-x>.
- Conn, J. E., J. P. Bollback, D. Y. Onyabe, T. Robinson, R. C. Wilkerson, and M. M. Pova. 2001. “Isolation of Polymorphic Microsatellite Markers from the Malaria Vector *Anopheles darlingi*,” *Molecular Ecology Notes*. 1(4): 223–25.
- Conn, J. E., and P. E. Ribolla. 2016. “Chapter 5 - Ecology of *Anopheles darlingi*, the Primary Malaria Vector in the Americas and Current Nongenetic Methods of Vector Control.” In *Genetic Control of Malaria and Dengue*, edited by Z. N. Adelman, 81–102. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800246-9.00005-3>.
- Conn, J. E., M. G. Rosa-Freitas, S. L. Luz, and H. Momen. 1999. “Molecular Population Genetics of the Primary Neotropical Malaria Vector *Anopheles darlingi* Using MtDNA.” *Journal of the American Mosquito Control Association* 15 (4): 468–74.
- Cornel, A. J., K. K. Brisco, W. P. Tadei, N. F. Secundino, Miriam S Rafael, A. K. Galardo, J. F. Medeiros, et al. 2016. “*Anopheles darlingi* Polytene Chromosomes: Revised Maps Including Newly Described Inversions and Evidence for Population Structure in Manaus.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 111 (5): 335–46. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150470>.

- De Oliveira, C. D., W. P. Tadei, F. C. Abdalla, P. F. Paolucci Pimenta, and O. Marinotti. 2012. "Multiple Blood Meals in *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)." *Journal of Vector Ecology* 37 (2): 351–58. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00238.x>.
- DEAL (Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) Guyane. 2013. "Plan Global des Transports et Déplacements de la Guyane (2013-2025)." May 2013. <http://www.guyane.developpement-durable.gouv.fr/le-plan-global-des-transports-et-deplacements-de-r645.html>.
- Deane, L., M. O. R. Causey, and M. P. Deane. 1948. *Notas sobre a distribuição e a biologia dos Anofelinos das regiões Nordeste e Amazônica do Brasil*. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública. 1(4): 827–965.
- Degefa, T., D. Yewhalaw, G. Zhou, H. Atieli, A. K. Githeko, and G. Yan. 2020. "Evaluation of Human-Baited Double Net Trap and Human-Odour-Baited CDC Light Trap for Outdoor Host-Seeking Malaria Vector Surveillance in Kenya and Ethiopia." *Malaria Journal* 19 (1): 174. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03244-2>.
- Douine, M., L. Musset, S. Pelleau, Y. Lazrek, and L. Mutricy. 2017. "Paludisme et Orpaillage Illégal En Guyane : Un Enjeu Majeur de Santé Publique," *Bull Epidemiol Hebd*. no. (6):102-9. http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2017/6/2017_6_1.htm.
- Duplan, H., S. Cazaux, and B. Hurpeau. 2014. "Accès Aux Soins Hospitaliers En Guyane : Derrière Un Constat Encourageant, de Fortes Disparités, Insee Analyses Guyane - N°2." October 14, 2014. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1285646>.
- Dusfour, I., R. Carinci, J. Issaly, P. Gaborit, and R. Girod. 2013. "A Survey of Adult Anophelines in French Guiana: Enhanced Descriptions of Species Distribution and Biting Responses." *Journal of Vector Ecology* 38 (2): 203–9. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12031.x>.
- Dusfour, I., F. Jarjaval, P. Gaborit, M. Mura, R. Girod, and F. Pagès. 2012a. "Confirmation of the Occurrence of *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* in French Guiana." *Journal of the American Mosquito Control Association* 28 (4): 309–11.
- Dusfour, I., J. Issaly, R. Carinci, P. Gaborit, and R. Girod. 2012b. "Incrimination of *Anopheles (Anopheles) intermedius* Peryassú, An. (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón, An. (Nys.) *oswaldoi* Peryassú as Natural Vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 107 (3): 429–32.
- Elliott, R. 1968. "Studies on Man Vector Contact in Some Malarious Areas in Colombia." *Bull World Health Organ* 38: 239–53.
- Emerson, K. J., J. E. Conn, E. S. Bergo, M. A. Randel, and M. A. M. Sallum. 2015. "Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) Clusters by Major Biogeographical Region." *PloS One* 10 (7): e0130773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130773>.
- Epelboin, L., T. Chroboczek, E. Mosnier, P. Abboud, A. Adenis, D. Blanchet, M. Demar, et al. 2015. "L'infectiologie en Guyane : le dernier bastion de la médecine tropicale française." *La Lettre de l'Infectiologue* Tome XXXI-n° 4-juillet-août 2016: 136-168. <http://www.hal.inserm.fr/inserm-01407150/document>.
- Epelboin, Y., S. C. Chaney, A. Guidez, N. Habchi-Hanriot, S. Talaga, L. Wang, and I. Dusfour. 2018. "Successes and Failures of Sixty Years of Vector Control in French Guiana: What Is the next Step?" *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 113 (5): e170398. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170398>.
- Estoup, A., P. Jarne, and J.-M. Cornuet. 2002. "Homoplasy and Mutation Model at Microsatellite Loci and Their Consequences for Population Genetics Analysis." *Molecular Ecology* 11 (9): 1591–1604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01576.x>.

- FAO, Département des forêts, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. 2010. "Evaluation Des Ressources Forestières Mondiales - Rapport National Guyane Française." www.fao.org/docrep/013/al507F/al507F.pdf.
- Faran, M.E., and K.J. Linthicum. 1981. "A Handbook of the Amazonian Species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae)." *Mosquito Systematics* 13 (1): 1-81. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Faran%20%26%20Linthicum%201981.pdf>.
- Floch, H. 1954. "Lutte Antimalarile et Antipaludique En Guyane Française." *Institut Pasteur de La Guyane Française et Du Territoire de l'Inini*.
- Floch, H., and E. Abonnenc. 1951. "Anophèles de La Guyane Française." *Archives de l'Institut Pasteur de La Guyane et Du Territoire de l'Inini* 236: 1-92.
- Forattini, O. P. 1962. *Entomologia Médica. Vol. 1. Parte Geral, Diptera, Anophelini*. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo.
- . 1987. "Exophilic behavior of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of Brazil." *Revista de saude publica* 21 (4): 291-304.
- Foster, P. G., Marques Porangaba de Oliveira T., Bergo E. S., Conn J. E., Sant'Ana D. C., Nagaki S. S., Nihei S., et al. 2017. "Phylogeny of Anophelinae Using Mitochondrial Protein Coding Genes." *Royal Society Open Science* 4 (11): 170758. <https://doi.org/10.1098/rsos.170758>.
- Fouque, F., P. Gaborit, R. Carinci, J. Issaly, and R. Girod. 2010. "Annual Variations in the Number of Malaria Cases Related to Two Different Patterns of *Anopheles darlingi* Transmission Potential in the Maroni Area of French Guiana." *Malaria Journal* 9 (March): 80. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-80>.
- Galardo, A. K. R., M. M. Póvoa, I. M. C. Sucupira, C. D. Galardo, and R. La Corte Dos Santos. 2015. "*Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) Susceptibility to Pyrethroids in an Endemic Area of the Brazilian Amazon." *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* 48 (6): 765-69. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0082-2015>.
- Galvão, A. L. A., R. G. Damasceno, and A. P. Marques. 2001. "Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica de Belém, Pará (Publicado originalmente em 1942)." *Memórias do Instituto Evandro Chagas* 2: 183-257.
- Gama, R. A., I. M. Da Silva, M. Geier, and A. E. Eiras. 2013. "Development of the BG-Malaria Trap as an Alternative to Human-Landing Catches for the Capture of *Anopheles darlingi*." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (6): 763-71. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013013>.
- Giglioli, G. 1938. "Malaria in British Guiana. Part III. Breeding Habits of *An. darlingi* Natural Factors Which Limit the Distribution of This Species and of Malaria." 1938. /paper/Malaria-in-British-Guiana.-Part-III.-Breeding-of-A.-Giglioli/ac8084d97073099adaca5b7bd96fab493968b175.
- Gil, L. H. S., F. P. Alves, H. Zieler, J. M. V. Salcedo, R. R. Durlacher, R. P. A. Cunha, M. S. Tada, L. M. A. Camargo, E. P. Camargo, and L. H. Pereira-da-Silva. 2003. "Seasonal Malaria Transmission and Variation of Anopheline Density in Two Distinct Endemic Areas in Brazilian Amazonia." *Journal of Medical Entomology* 40 (5): 636-41. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.5.636>.
- Gil, L. H. S., M. S. Tada, T. H. Katsuragawa, P. E. M. Ribolla, and L. H. Pereira da Silva. 2007. "Urban and Suburban Malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II: Perennial Transmissions with High Anopheline Densities Are Associated with Human Environmental Changes." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (3): 271-76. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000013>.
- Girod, R., P. Gaborit, R. Carinci, J. Issaly, and F. Fouque. 2008. "*Anopheles darlingi* Bionomics and Transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*

- and *Plasmodium malariae* in Amerindian Villages of the Upper-Maroni Amazonian Forest, French Guiana.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (7): 702–10. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000700013>.
- Girod, R., E. Roux, F. Berger, A. Stefani, P. Gaborit, R. Carinci, J. Issaly, B. Carme, and I. Dusfour. 2011. “Unravelling the Relationships between *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Densities, Environmental Factors and Malaria Incidence: Understanding the Variable Patterns of Malarial Transmission in French Guiana (South America).” *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 105 (2): 107–22. <https://doi.org/10.1179/136485911X12899838683322>.
- González, R., R. Wilkerson, M. Fidel Suárez, F. García, G. Gallego, H. Cárdenas, C. Elisa Posso, and M. Cristina Duque. 2007. “A Population Genetics Study of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from Colombia Based on Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction and Amplified Fragment Length Polymorphism Markers.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (3): 255–62. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000037>.
- Guelbeogo, W. M., N. Sagnon, F. Liu, N. J. Besansky, and C. Costantini. 2014. “Behavioural Divergence of Sympatric *Anopheles funestus* Populations in Burkina Faso.” *Malaria Journal* 13 (1): 65. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-65>.
- Gutiérrez, L. A., G. F. Gómez, J. J. González, M. I. Castro, S. Luckhart, Jan E. Conn, and M. M. Correa. 2010. “Microgeographic Genetic Variation of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83 (1): 38–47. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0381>.
- Harbach, R. E. 2013. “The Phylogeny and Classification of *Anopheles*,” In: Sylvie Manguin (ed), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. IntechOpen, July. <https://doi.org/10.5772/54695>.
- Harbach, R. E., and I. J. Kitching. 2016. “The Phylogeny of Anophelinae Revisited: Inferences about the Origin and Classification of *Anopheles* (Diptera: Culicidae).” *Zoologica Scripta* 45 (1): 34–47. <https://doi.org/10.1111/zsc.12137>.
- HCSP. 2017. “Primaquine à visée « altruiste » et paludisme à *Plasmodium falciparum* en Guyane.” *Rapport de l’HCSP*. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique. <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=631>.
- Hiwat, H., and G. Bretas. 2011. “Ecology of *Anopheles darlingi* Root with Respect to Vector Importance: A Review.” *Parasites & Vectors* 4 (September): 177. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-177>.
- Hiwat, H., M. De Rijk, R. Andriessen, C. J. M. Koenraadt, and W. Takken. 2011. “Evaluation of Methods for Sampling the Malaria Vector *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae) in Suriname and the Relation with Its Biting Behavior.” *Journal of Medical Entomology* 48 (5): 1039–46. <https://doi.org/10.1603/me10245>.
- Hoel, D. F., D. L. Kline, S. A. Allan, and A. Grant. 2007. “Evaluation of Carbon Dioxide, 1-Octen-3-ol, and Lactic Acid as Baits in Mosquito Magnet Pro Traps for *Aedes Albopictus* in North Central Florida.” *Journal of the American Mosquito Control Association* 23 (1): 11–17. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2007\)23\[11:EOCDOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2007)23[11:EOCDOA]2.0.CO;2).
- Insee. 2015. “Populations Légales Des Départements En 2015.” May 9, 2015. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/3292643?sommaire=3292701>.
- Insee. 2020. “Tableau de Bord Conjoncture : Guyane.” August 31, 2020. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2122304>.
- Jules, J. R., H. G. Albuquerque, M. C. Suárez-Mutis, S. M. Pereira de Oliveira, H. R. Gil-Santana, W. Rodrigues, and J. Alencar. 2019. “Species Diversity and Abundance of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) in Cachoeiras de Macacu Municipality, Rio de Janeiro State: An Area of the Atlantic Forest

- Receptive and Vulnerable to Malaria,” January.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjy236>.
- Juminer, B., Y. Robin, F. X. Pajot, and R. Eutrope. 1981. “[Features of malaria in Guyana].” *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique Et De Ses Filiales* 74 (2): 176–92.
- Kreutzer, R. D., J. B. Kitzmiller, and E. Ferreira. 1972. “Inversion Polymorphism in the Salivary Gland Chromosomes of *Anopheles darlingi* Root.” *Mosquito News*, 555–65.
- Lainhart, W., S. A. Bickersmith, K. J. Nadler, M. Moreno, M. P. Saavedra, V. M. Chu, P. E. Ribolla, J. M. Vinetz, and J. E. Conn. 2015. “Evidence for Temporal Population Replacement and the Signature of Ecological Adaptation in a Major Neotropical Malaria Vector in Amazonian Peru.” *Malaria Journal* 14 (1): 375.
<https://doi.org/10.1186/s12936-015-0863-4>.
- Laporta, G. Z., Y.-M. Linton, R. C. Wilkerson, E. S. Bergo, S. S. Nagaki, D. C. Sant’Ana, and M. A. M. Sallum. 2015. “Malaria Vectors in South America: Current and Future Scenarios.” *Parasites & Vectors* 8 (1): 426.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-1038-4>.
- Lehmann, T., W. A. Hawley, L. Kamau, D. Fontenille, F. Simard, and F. H. Collins. 1996. “Genetic Differentiation of *Anopheles gambiae* Populations from East and West Africa: Comparison of Microsatellite and Allozyme Loci.” *Heredity* 77 (2): 192–200. <https://doi.org/10.1038/hdy.1996.124>.
- Leon, W., J. Valle, R. Naupay, E. Tineo, A. Rosas, and M. Palomino. 2003. “Comportamiento Estacional Del *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root 1926 En Localidades de Loreto y Madre de Dios, Perú 1999 2000.” *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 20 (1): 22–27.
- Lepelletier, L., F. Gay, M. Nadire-Galliot, J. P. Poman, S. Bellony, J. Claustre, B. M. Traore, and J. Mouchet. 1989. “[Malaria in Guiana. I. General status of the endemic].” *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique Et De Ses Filiales* 82 (3): 385–92.
- Liu, N. 2015. “Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions.” *Annual Review of Entomology* 60 (January): 537–59.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>.
- Malafronte, R. S., M. T. Marrelli, and O. Marinotti. 1999. “Analysis of ITS2 DNA Sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae).” *Journal of Medical Entomology* 36 (5): 631–34. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.5.631>.
- Manguin, S., R. C. Wilkerson, J. E. Conn, Y. Rubio-Palis, J. A. Danoff-Burg, and D. R. Roberts. 1999. “Population Structure of the Primary Malaria Vector in South America, *Anopheles darlingi*, Using Isozyme, Random Amplified Polymorphic DNA, Internal Transcribed Spacer 2, and Morphologic Markers.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60 (3): 364–76.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.364>.
- Marinotti, O., G. C. Cerqueira, L. G. P. de Almeida, M. I. T. Ferro, E. L. Da Silva Loreto, and A. Zaha. 2013. “The Genome of *Anopheles darlingi*, the Main Neotropical Malaria Vector.” *Nucleic Acids Research* 41 (15): 7387–7400.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt484>.
- Meteo France. Site Web. “CLIMAT ANTILLES GUYANE - Informations, Normales et Statistiques Sur Le Climat En Antilles (Guadeloupe, Martinique) et Guyane.” Site Web. <http://www.meteofrance.gp/climat/antilles-guyane>.
- Mirabello, L., and J. E. Conn. 2006. “Molecular Population Genetics of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* in Central and South America.” *Heredity* 96 (4): 311–21. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800805>.
- Mirabello, L., J. H. Vineis, S. P. Yanoviak, V. M. Scarpassa, M. M. Póvoa, N. Padilla, N. L. Achee, and J. E. Conn. 2008. “Microsatellite Data Suggest Significant Population Structure and Differentiation within the Malaria Vector *Anopheles darlingi* in Central and South America.” *BMC Ecology* 8 (March): 3.
<https://doi.org/10.1186/1472-6785-8-3>.

- Moreno, M., M. P. Saavedra, S. A. Bickersmith, C. Prussing, A. Michalski, C. Tong Rios, J. M. Vinez, and J. E. Conn. 2017. "Intensive Trapping of Blood-Fed *Anopheles darlingi* in Amazonian Peru Reveals Unexpectedly High Proportions of Avian Blood-Meals." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (2): e0005337. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005337>.
- Mosnier, E., I. Dusfour, G. Lacour, R. Saldanha, A. Guidez, M. S. Gomes, A. Sanna, et al. 2020. "Resurgence Risk for Malaria, and the Characterization of a Recent Outbreak in an Amazonian Border Area between French Guiana and Brazil." *BMC Infectious Diseases* 20 (1): 373. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05086-4>.
- "Mosquito Taxonomic Inventory." n.d. Accessed September 4, 2020. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>.
- Mouchet, J., M. Nadire-Galliot, F. Gay, J. P. Poman, L. Lepelletier, J. Claustre, and S. Bellony. 1989. "[Malaria in Guiana. II. The characteristics of different foci and antimalarial control]." *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique Et De Ses Filiales* 82 (3): 393–405.
- Moutinho, P. R., L. H. S. Gil, R. B. Cruz, and P. E. M. Ribolla. 2011. "Population Dynamics, Structure and Behavior of *Anopheles darlingi* in a Rural Settlement in the Amazon Rainforest of Acre, Brazil." *Malaria Journal* 10 (1): 174. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-174>.
- Musset, L., S. Pelleau, R. Girod, V. Ardillon, L. Carvalho, I. Dusfour, M. S. M. Gomes, F. Djossou, and E. Legrand. 2014. "Malaria on the Guiana Shield: A Review of the Situation in French Guiana." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (5): 525–33.
- Mwanga, E. P., H. S. Ngowo, S. A. Mapua, A. S. Mmbando, E. W. Kaindo, K. Kifungo, and F. O. Okumu. 2019. "Evaluation of an Ultraviolet LED Trap for Catching *Anopheles* and *Culex* Mosquitoes in South-Eastern Tanzania." *Parasites & Vectors* 12 (1): 418. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3673-7>.
- Nanfack Minkeu, F., and K. D. Vernick. 2018. "A Systematic Review of the Natural Virome of *Anopheles* Mosquitoes." *Viruses* 10 (5): 222. <https://doi.org/10.3390/v10050222>.
- Naranjo-Díaz, N., J. E. Conn, and M. M. Correa. 2016. "Behavior and Population Structure of *Anopheles darlingi* in Colombia." *Infection, Genetics and Evolution* 39 (April): 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.004>.
- Nauta, M. J., and F. J. Weissing. 1996. "Constraints on Allele Size at Microsatellite Loci: Implications for Genetic Differentiation." *Genetics* 143 (2): 1021–32.
- Orjuela, L. I., J. A. Morales, M. L. Ahumada, J. F. Rios, J. J. González, J. Yañez, A. Rosales, et al. 2018. "Insecticide Resistance and Its Intensity in Populations of Malaria Vectors in Colombia." *BioMed Research International* 2018: 9163543. <https://doi.org/10.1155/2018/9163543>.
- Pajot, F.-X., F. Le Pont, J.-F. Molez, and N. Dégallier. 1977. "Agressivité d'*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae) en Guyane française." *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie* 15 (1): 15–22.
- Pan American Health Organization, WHO. 1996. "Status of Malaria Programs in the Americas: XLIV Report." <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/26634>.
- Pedro, P. M., and M. A. M. Sallum. 2009. "Spatial Expansion and Population Structure of the Neotropical Malaria Vector, *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)." *Biological Journal of the Linnean Society* 97 (4): 854–66. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01226.x>.
- Pereira Lima, J. B., M. G. Rosa-Freitas, C. M. Rodvalho, F. Santos, and R. Lourenço-de-Oliveira. 2014. "Is There an Efficient Trap or Collection Method for Sampling *Anopheles darlingi* and Other Malaria Vectors That Can Describe the Essential Parameters Affecting Transmission Dynamics as Effectively as Human Landing Catches? - A Review." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (5): 685–705.

- Petit-Sinturel, M., L. Carvalho, A. Andrieu, and V. Ardillon. 2016. "Situation Du Paludisme En Guyane Française En 2016" *CIRE Antilles Guyane*. BVS n°2. (2016 juin-septembre); 6-10.
- Pommier de Santi, V., A. Dia, A. Adde, G. Hyvert, J. Galant, M. Mazevet, C. Nguyen, et al. 2016a. "Malaria in French Guiana Linked to Illegal Gold Mining." *Emerging Infectious Diseases* 22 (2): 344–46. <https://doi.org/10.3201/eid2202.151292>.
- Pommier de Santi, V., F. Djossou, N. Barthes, H. Bogreau, G. Hyvert, C. Nguyen, S. Pelleau, et al. 2016b. "Malaria Hyperendemicity and Risk for Artemisinin Resistance among Illegal Gold Miners, French Guiana." *Emerging Infectious Diseases* 22 (5): 903–6. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151957>.
- Pommier de Santi, V., I. Dusfour, E. de Parseval, B. Lespinet, C. Nguyen, P. Gaborit, R. Carinci, G. Hyvert, R. Girod, and S. Briolant. 2017. "Risk of Daytime Transmission of Malaria in the French Guiana Rain Forest." *Medecine et Sante Tropicales* 27 (1): 111–12. <https://doi.org/10.1684/mst.2017.0659>.
- Prado, C. C., L. A. Alvarado-Cabrera, P. A. Camargo-Ayala, D. Garzon-Ospina, M. Camargo, S. C. Soto-De Leon, J. R. Cubides, C. T. Celis-Giraldo, M. E. Patarroyo, and M. A. Patarroyo. 2019. "Behavior and Abundance of *Anopheles darlingi* in Communities Living in the Colombian Amazon Riverside." *PloS One* 14 (3): e0213335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213335>.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. "Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data." *Genetics* 155 (2): 945–59.
- Prussing, C., K. J. Emerson, S. A. Bickersmith, M. A. M. Sallum, and J. E. Conn. 2019. "Minimal Genetic Differentiation of the Malaria Vector *Nyssorhynchus darlingi* Associated with Forest Cover Level in Amazonian Brazil." *PloS One* 14 (11): e0225005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225005>.
- Prussing, C., M. Moreno, M. P. Saavedra, S. A. Bickersmith, D. Gamboa, F. Alava, C. D. Schlichting, K. J. Emerson, J. M. Vinetz, and J. E. Conn. 2018. "Decreasing Proportion of *Anopheles Darlingi* Biting Outdoors between Long-Lasting Insecticidal Net Distributions in Peri-Iquitos, Amazonian Peru." *Malaria Journal* 17 (1): 86. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2234-4>.
- Puritz, J. B., M. V. Matz, R. J. Toonen, J. N. Weber, D. I. Bolnick, and C. E. Bird. 2014. "Demystifying the RAD Fad." *Molecular Ecology* 23 (24): 5937–42. <https://doi.org/10.1111/mec.12965>.
- Roberts, D. R., W. D. Alecrim, A. M. Tavares, and K. M. McNeill. 1983. "Field Observations on the Gonotrophic Cycle of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)." *Journal of Medical Entomology* 20 (2): 189–92. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.2.189>.
- Roberts, D. R., S. Manguin, E. Rejmankova, R. Andre, R. E. Harbach, E. Vanzie, S. Hakre, and J. Polanco. 2002. "Spatial Distribution of Adult *Anopheles darlingi* and *Anopheles albimanus* in Relation to Riparian Habitats in Belize, Central America." *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology* 27 (1): 21–30.
- Root, F. M. 1926. "Studies on Brazilian Mosquitoes. I. The Anophelines of the *Nyssorhynchus* Group." *American Journal of Epidemiology* 6 (5): 684–717. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120038>.
- Rosas-Aguirre, A., D. Gamboa, P. Manrique, J. E. Conn, M. Moreno, A. G. Lescano, J. F. Sanchez, et al. 2016. "Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95 (6 Suppl): 133–44. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0268>.
- Rosas-Aguirre, A., N. Speybroeck, A. Llanos-Cuentas, A. Rosanas-Urgell, G. Carrasco-Escobar, Hugo Rodriguez, Dionicia Gamboa, et al. 2015. "Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey." *PloS One* 10 (9): e0137458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137458>.

- Rosero, C. Y., G. I. Jaramillo, R. Gonzalez, and H. Cardenas. 2017. "Genetic Differentiation of Colombian Populations of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae)." *Neotropical Entomology* 46 (5): 487–98. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0488-0>.
- Rousseau, C. 2019. "Surveillance Du Paludisme, Le Point Épidémiologique — N° 01 / 2019: 1er Janvier au 31 Mars 2019." *CIRE Guyane*, 2019.
- Rozendaal, J. A. 1989. "Biting and Resting Behavior of *Anopheles darlingi* in the Suriname Rainforest." *Journal of the American Mosquito Control Association* 5 (3): 351–58.
- Saavedra, M. P., J. E. Conn, F. Alava, G. Carrasco-Escobar, C. Prussing, S. A. Bickersmith, J. L. Sangama, et al. 2019. "Higher Risk of Malaria Transmission Outdoors than Indoors by *Nyssorhynchus darlingi* in Riverine Communities in the Peruvian Amazon." *Parasites & Vectors* 12 (1): 374. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3619-0>.
- Santacoloma, L., T. Tibaduiza, M. Gutiérrrez, and H. Brochero. 2012. "[Susceptibility to insecticides of *Anopheles darlingi* Root 1840, in two locations of the departments of Santander and Caquetá, Colombia]." *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud* 32 Suppl 1 (March): 22–28. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000500004>.
- Scarpassa, V. M., and J. E. Conn. 2007. "Population Genetic Structure of the Major Malaria Vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, Using Microsatellite Markers." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (3): 319–27. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000045>.
- Service, M. W. 1977. "A Critical Review of Procedures for Sampling Populations of Adult Mosquitoes." *Bulletin of Entomological Research* 67 (03): 343–382. <https://doi.org/10.1017/S0007485300011184>.
- Shannon, R. C. 1933. *Anophelines of the Amazon Valley*. Vol. 35: 117-143. Washington, D.C.: Entomological Society of Washington, U.S. National Museum.
- Silva, F. S., B. M. Costa-Neta, M. De Sousa de Almeida, E. Carvalho de Araújo, and J. V. Castro Aguiar. 2019. "Field Performance of a Low Cost, Simple-to-Build, Non-Motorized Light-Emitting Diode (LED) Trap for Capturing Adult *Anopheles* Mosquitoes (Diptera: Culicidae)." *Acta Tropica* 190 (February): 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.014>.
- Sinka, M. E. 2013. *Global Distribution of the Dominant Vector Species of Malaria*. <http://www.intechopen.com/books/Anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/global-distribution-of-the-dominant-vector-species-of-malaria>.
- Sinka, M. E., M. J. Bangs, S. Manguin, Y. Rubio-Palis, T. Chareonviriyaphap, M. Coetzee, C. M. Mbogo, et al. 2012. "A Global Map of Dominant Malaria Vectors." *Parasites & Vectors* 5: 69. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>.
- Suarez, M. F., M. L. Quiñones, J. D. Palacios, and A. Carrillo. 1990. "First Record of DDT Resistance in *Anopheles darlingi*." *Journal of the American Mosquito Control Association* 6 (1): 72–74.
- Talaga, S., A. Dejean, I. Dusfour, P. Gaborit, R. Girod, and R. Carinci. 2015. "Updated Checklist of the Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of French Guiana." *Journal of Medical Entomology* 52 (5): 770–82. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv109>.
- Tangena, J.-A. A., P. Thammavong, A. Hiscox, S. W. Lindsay, and P. T Brey. 2015. "The Human-Baited Double Net Trap: An Alternative to Human Landing Catches for Collecting Outdoor Biting Mosquitoes in Lao PDR." *PloS One* 10 (9): e0138735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138735>.
- Tineo, E, A. Medina, C. Fallaque, L. Chávez, S. Quispe, M. Mercado, J. Zevallos, W. León, and M. Palomino. 2003. "Distribución Geográfica y Comportamiento Estacional de La Picadura Del *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root 1926 En Localidades de La Frontera Perú-Bolivia, Madre de Dios, Perú." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 20 (2): 78–83.

- Ullah, M. M., A. Y. M. Al Balushi, N. R. S. Al Aliyani, B. Kalarikkal, R. I. C. Miranda, S. M. Sherif, A. S. M. Al Habsi, E. K. Al Saidi, A. Anver, and N. H. Qassem. 2020. "Imported Bancroftian Filariasis Discovered in a Patient Infected with *Plasmodium falciparum*: First Case of Concomitant Parasitism in the Al-Buraimi Governorate, Oman." *Infectious Disease Reports* 12 (1): 8304. <https://doi.org/10.4081/idr.2020.8304>.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, and P. Shipley. 2004. "Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data." *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535–38. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>.
- Vezenegho, S. B., A. Adde, P. Gaborit, R. Carinci, J. Issaly, V. Pommier de Santi, I. Dusfour, S. Briolant, and R. Girod. 2014. "Mosquito Magnet® Liberty plus Trap Baited with Octenol Confirmed Best Candidate for *Anopheles* Surveillance and Proved Promising in Predicting Risk of Malaria Transmission in French Guiana." *Malaria Journal* 13: 384. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-384>.
- Vezenegho, S. B., A. Adde, V. Pommier de Santi, J. Issaly, R. Carinci, P. Gaborit, I. Dusfour, R. Girod, and S. Briolant. 2016. "High Malaria Transmission in a Forested Malaria Focus in French Guiana: How Can Exophagic *Anopheles darlingi* Thwart Vector Control and Prevention Measures?" *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 111 (9): 561–69. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160150>.
- Vezenegho, S. B., R. Carinci, P. Gaborit, J. Issaly, I. Dusfour, S. Briolant, and R. Girod. 2015. "*Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Dynamics in Relation to Meteorological Data in a Cattle Farm Located in the Coastal Region of French Guiana: Advantage of Mosquito Magnet Trap." *Environmental Entomology* 44 (3): 454–62. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv053>.
- WHO, 2013. "Sampling Malaria Vector." In *Malaria Entomology and Vector Control - Guide for Participants - Training Module on Malaria Control*, Geneva; World Health Organization. 31.
- WHO, "World Malaria Report." 2019. Geneva; World Health Organization. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565721>.
- Wright, S. 1965. "The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating." *Evolution* 19 (3): 395–420. <https://doi.org/10.2307/2406450>.

Résumé

Cette thèse a pour but d'évaluer la structuration des populations d'*Anopheles darlingi* en Guyane. Une étude de génétique des populations sur *An. darlingi* se justifie parce que c'est un vecteur important du paludisme en Amérique du Sud et particulièrement en Guyane. Nous avons besoin de mieux connaître le vecteur afin d'espérer agir sur la transmission des plasmodies dans le cadre de la lutte antivectorielle.

Un premier axe repose sur une étude méthodologique permettant de déterminer si la méthode de capture (capture sur homme ou MosquitoMagnet[®] utilisant l'octénol ou le Lurex[™] comme attractant) ou l'heure de capture influence la structure des populations d'*An. darlingi*. Cela a permis de préciser si la capture pouvait entraîner un biais d'échantillonnage. En effet, si on capture des populations différentes d'*An. darlingi* lors de l'utilisation de pièges différents ou lorsqu'on capture à des horaires différents, il devient impossible de faire des études de structure génétique excepté avec des moustiques capturés avec le même type de piégeage et à la même heure. De même, il devient impossible de comparer plusieurs études entre elles si elles n'ont pas utilisé le même mode de capture ou le même créneau horaire.

Un second axe est dédié à l'étude, chez *An. darlingi*, de la diversité génétique des populations à l'échelle de la Guyane. L'échantillonnage a été effectué sur 14 sites en Guyane et un site au Suriname réparti selon deux différents faciès écologiques : le littoral et la forêt. Le génotypage a été obtenu pour un total de 1881 individus à l'aide 8 marqueurs microsatellites. Cette étude permet d'évaluer la structure des populations d'anophèles en Guyane. L'intérêt est de mieux connaître les populations de vecteurs du paludisme sur le territoire et donc de mieux les contrôler dans le cadre de la lutte antivectorielle.

L'étude méthodologique préliminaire a montré que les 3 types de collecte étudiés attirent et capturent les mêmes populations d'*An. darlingi*. Différentes méthodes de collectes peuvent donc être utilisées pour réaliser l'échantillonnage d'anophèles dans le cadre d'études moléculaires comme des études de structure génétique des populations. De même, l'heure de capture n'a pas été associée à des variations des populations anophéliennes.

A l'échelle de la Guyane, nous avons mis en évidence cinq sous populations de moustiques appartenant à l'espèce *An. darlingi*. Les deux premiers « clusters » regroupent tous les sites du littoral : Kourou, Matoury, Cacao, Régina, Blondin, Saint-Georges et Saut-Maripa. Les trois autres clusters forment une entité. Ils regroupent les populations de la forêt : Sikini, Camopi, Alikéné, Dagobert, Dorlin, Midenangalanti et Bois Martin. Une structuration des populations d'*An. darlingi* à l'échelle de la Guyane a donc été mise en évidence selon les deux faciès écologiques. Les sites du littoral sont probablement soumis à une diffusion passive de moustiques liée aux déplacements humains par l'unique route nationale qui traverse la Guyane d'ouest en est le long du littoral. Les populations forestières d'*An. darlingi* semblent s'être structurées par diffusion passive selon les déplacements des orpailleurs entre les sites d'orpaillage illégaux.

Les études de structure des populations d'*An. darlingi* menées dans cette thèse ont permis de combler le manque de connaissances existantes sur le sujet en Guyane. Ces études répondent à un besoin de compréhension de la dynamique des populations d'*An. darlingi*. Cette structuration doit être prise en compte lors de la conception des programmes de surveillance et de lutte antivectorielle.

Mots clefs : *Anopheles darlingi*, Amazonie, Structure génétique des populations, Microsatellites, Méthodes de collecte, Créneaux horaires de collection, Paludisme

Abstract

The aim of this thesis is to assess the populations structure of *Anopheles darlingi* in French Guiana. A population genetics study on *An. darlingi* is justified because it is an important vector of malaria in South America and particularly in French Guiana. We need to know more about this mosquito species to reduce transmission of malaria parasites by vector control.

The first approach is a methodological study designed to determine whether the capture method (Human landing catch or MosquitoMagnet® with octenol or Lurex™ as attractant) or the time of capture influences the population structure of *An. darlingi*. This step clarifies whether the collection method could lead to sampling bias. Indeed, if we capture different populations of *An. darlingi* using different trapping methods or at different times of the day, it becomes impossible to perform genetic structure studies, except with mosquitoes captured with the same type of trap and at the same time each day. Likewise, it becomes impossible to compare studies using different capture methods or different time slots.

The second objective is focused on the genetic diversity of *An. darlingi* populations in French Guiana. Sampling was carried out at 14 sites in French Guiana and one site in representing two different ecological zones: the coast and the forest. Genotyping was performed on a total of 1881 mosquitoes using 8 microsatellite markers. This study allowed to evaluate the population structure of *Anopheles* in French Guiana. The relevance of this study lies in the fact that it helps us better understand the populations of malaria vectors in the territory and therefore to improve vector control measures.

The preliminary methodological study showed that the 3 methods of mosquito collection studied attract and capture the same populations of *An. darlingi*. Different collection methods can therefore be used to carry out sampling of *Anopheles* for molecular studies including studies on population genetic structure. Likewise, the time of capture was not associated with variations in *Anopheles* populations.

In French Guiana, we have identified five sub-populations of *An. darlingi* mosquitoes. The first two “clusters” bring together all the coastal sites: Kourou, Matoury, Cacao, Régina, Blondin, Saint-Georges and Saut-Maripa. The other three clusters form a single entity, they bring together the forest populations: Sikini, Camopi, Alikéné, Dagobert, Dorlin, Midenangalanti and Bois Martin. A distinct population structure of *An. darlingi* mosquitoes has therefore been identified based on two ecological strata in French Guiana. Coastal sites are probably subject to a passive diffusion of mosquitoes associated with human travel by the only road that crosses French Guiana from West to East along the coast. The forest populations of *An. darlingi* seem to be structured by passive following the gold miners’ displacements between different illegal gold mining sites.

Population structure studies of *An. darlingi* carried out in this thesis work fill a gap in existing knowledge in the field of entomology/epidemiology in French Guiana. These studies meet the need to understand the dynamics of *An. darlingi* populations. This structure should be taken into account when designing programs of surveillance and vector control.

Keywords : *Anopheles darlingi*, Amazonia, Population genetic structure, Microsatellites, Collection methods, Time slot, Malaria