

**UNIVERSITE DE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

**Discipline: Biologie des organismes
Formation doctorale : Parasitologie
Ecole doctorale : Biologie Intégrative**

Présentée et soutenue publiquement

par

DIABATE Abdoulaye

Le 30 Janvier 2003

Titre :

LE PALUDISME AU BURKINA FASO :

**ETUDE DE LA TRANSMISSION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA
RESISTANCE D'*ANOPHELES GAMBIAE* SL AUX PYRETHRINOIDES**

JURY

M. JB. GODELLE, Professeur, Université Montpellier II,
M. JM. HOUGARD, Directeur de Recherche IRD, Montpellier,
M. P. GUILLET, Directeur de Recherche, OMS/Génève ,
Mme J. HEMINGWAY, Professeur LSTM Liverpool,
M. F. CHANDRE, Chargé de Recherche IRD, CPR/Bouaké,
M. T. BALDET, Chargé de Recherche, Coopération Française
Centre Muraz/Bobo-Dioulasso

Président
Directeur de Thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le cadre des activités de recherches menées à l'IRSS/Centre Muraz (Burkina Faso) et au Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier. Il a bénéficié de l'appui financier du Multilatéral Initiative on Malaria (MIM) et de l'IRD que je tiens à remercier. Je remercie également les ministères de la recherche et de la santé de mon pays pour leur soutien logistique.

Je remercie la Direction du Département Soutien et Formation de l'IRD pour avoir financièrement soutenu mes déplacements durant ces trois ans dans mon laboratoire d'accueil à Montpellier

Je remercie les Directeurs sortant et entrant, Messieurs Van de Perre Phillip et Hien S. Rogier du Centre Muraz pour avoir mis à ma disposition les moyens techniques et logistiques pendant tout le temps qu'ont duré ces travaux.

Je remercie les Délégués général et régional de l'IRSS pour toutes ces facilités administratives dont j'ai bénéficié durant mes déplacements

Dans l'aboutissement normal de toute œuvre, il y a l'argent et il y a les hommes. Ils sont nombreux ceux qui m'ont prêté une oreille attentive et qui se sont réellement investis afin que ce travail voit le jour. Que leur dire ?

A M. BALDET Thierry, entomologiste médical de la Coopération Française en poste au Centre Muraz à Bobo-Dioulasso. Vous avez été pour moi plus qu'un encadrant. Un frère. Ces six années éducatives que vous avez passées avec nous ont laissé une marque indélébile. J'ai amplement bénéficié de vos conseils et critiques tant au niveau professionnel que privé. Votre soutien a été inestimable pour la réalisation de ce travail. Je me fais l'écho de la voix de tous les membres de l'unité Parasito/Entomologie du Centre Muraz pour vous souhaiter plein succès dans les nouvelles tâches qui vous attendent.

A M. Jean Marc HOUGARD, mon Directeur de thèse et responsable du LIN/IRD-Montpellier. Je vous suis infiniment gré de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et d'avoir accepté de diriger ce travail. Vos qualités de chercheur m'ont permis de bénéficier largement de votre expérience dans le domaine de la lutte antivectorielle. Malgré vos multiples tâches, vous avez toujours su être là à toutes les étapes de ce travail. Vous avez su insuffler en moi une énergie constructive qui tient tant de votre dynamisme que de vos qualités humaines. Vous avez été un Directeur exceptionnel. Je n'ai d'autres mots pour vous remercier que ceux inventés par les hommes, mais mon cœur exprime plus.

A M. Chandre Fabrice, entomologiste médical de l'IRD en poste au CPR de Bouaké. J'ai fait mes premiers pas dans le domaine de la résistance aux insecticides à vos côtés. J'ai énormément reçu de vous. Votre esprit critique et la rigueur méthodologique dans le

travail m'ont beaucoup aidé à concrétiser ce travail. Vous avez été le fer de lance du réseau résistance que nous avons bâti ensemble en Afrique de l'Ouest. Les discussions fructueuses que nous avons eu au sein de ce réseau m'ont été d'un apport certain dans la réalisation de ce travail. Merci pour ces nuits blanches que vous avez passées à lire ce manuscrit malgré vos occupations.

A M Akogbeto Martin. Vous avez été le coordonnateur du réseau résistance au sein duquel j'ai énormément appris pendant ces dernières années. Vous êtes un aîné qui éclaire le chemin et nous avons besoin de votre longue expérience pour nous construire.

A M Godelle Bernard. Merci d'avoir accepté de lire mon travail et d'être le président du jury qui va sanctionner ce travail

A Mme Brengues Cécile et M Kengne Pierre. Vos conseils pratiques pour les aspects techniques de mon travail m'ont été très utiles. Je ne saurai jamais vous remercier assez de votre constante disponibilité et votre esprit de convivialité. Les discussions que nous avons souvent tenues m'ont permis de trouver une bonne adéquation entre les aspects techniques de laboratoire et le côté pratique du terrain. Votre participation a été décisive pour la réalisation de ce travail.

A M Guillet Pierre et Mme Hemingway Janet. Vous m'avez tous deux accueilli dans votre laboratoire respectivement en 1998 et en 2000. Je n'oublierai jamais ces instants magnifiques. Outre vos grandes qualités de chercheur, j'ai beaucoup aimé votre esprit convivial et chaleureux. Les échanges que nous avons pu avoir par la suite ont été un atout majeur pour la suite de mes études. Je vous suis particulièrement reconnaissant d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

A Messieurs Guiguemdé TR et Ouédraogo JB. Vous avez été les premiers à m'accorder votre confiance en m'acceptant dans votre laboratoire pour une thèse de troisième cycle. Cette confiance constitua un gage essentiel de motivation et d'encouragement. Vos qualités de chercheurs et humaines sont à la base d'une véritable synergie qui s'est installée entre nous au cours de ces années.

A Messieurs Fontenille Didier, Simard Frédéric, Carnevale Pierre, Hervé Jean Pierre et Darriet Frédéric. Pour toutes ces discussions édifiantes que nous n'avons eu de cesse à tenir dans le cadre du réseau Anophèles d'Afrique. Vos critiques et suggestions ont été un atout précieux dans la finalisation de ce travail. Je remercie particulièrement Ms Fontenille et Simard pour s'être impliqués de près à ce travail.

A tous mes collègues du LIN, Corbel Vincent, Cohuet Anna, Aman Zeinab, Duchon Stéphane, Finot Luc, Marie Claude, Myriam, pour vos encouragements et aide. J'ai eu un énorme plaisir à partager ces moments formidables avec vous.

A Dabiré Roch et Toé Léa. Pour votre assistance au quotidien à travers vos encouragements et soutiens. Je remercie particulièrement Dabiré Roch pour s'être

pleinement investis dans ce travail et c'est avec beaucoup de reconnaissance que je te témoigne mon amitié.

A Ouari Ali, Sanou Mamourou, Sanou Souleymane, Traoré Dominique, Zoungana Sougrinoma, Kabrou Tahirou, Ouattara Abdoulaye, Millogo Niama et Tamboula. Votre participation active à la réalisation des travaux de terrain a été un gage essentiel pour la réalisation de ce travail.

A Rouamba Jérémie dont le soutien a été très bénéfique dans la réalisation de toutes les cartes figurant dans ce document.

A tous mes collègues, aînés, Tinto Halidou, Traoré Maminata, Sorgho Herman, Diallo Hama, le major Bakary, El' adji Tamboula, Zampa Odile, Tantie Natogoma. Pour votre bienveillance et esprit convivial depuis six ans déjà que nous travaillons ensemble.

A Manigart Olivier, Sanou Oumar, Diane. Pour avoir gracieusement mis à notre disposition votre plateau technique.

A tous les habitants des sites d'étude pour leur coopération et leur accueil fraternel.

Enfin, à tous ceux qui de loin ou de près ont participé à ce travail. A tous je dis MERCI.

SOMMAIRE

I INTRODUCTION	1
RAPPELS ET GENERALITES	4
2.1 Le paludisme au Burkina Faso	5
2.2 Le cycle sporogonique du parasite chez l'anophèle	5
2.3 Les vecteurs du paludisme en Afrique	7
2.3.1 Le complexe <i>Anopheles gambiae</i>	8
2.3.2 biologie et répartition géographique	8
2.4 Les insecticides	10
2.4.1 Les insecticides organochlorés	11
2.4.2 Les insecticides organophosphorés	11
2.4.3 Les carbamates	12
2.4.4 Les pyréthriinoïdes	12
2.4.5 Les autres insecticides chimiques	13
2.4.6 Les insecticides d'origine biologique	13
2.4.7 Les agents de lutte biologique	14
2.5 Les méthodes de lutte antivectorielle	14
2.5.1 La lutte anti-larvaire	14
2.5.2 Stratégies de lutte contre les stades adultes	15
2.6 Les mécanismes de résistance aux insecticides	16
2.6.1 La résistance métabolique	16
2.6.2 La résistance par modification de la cible	18
2.6.3 Les mécanismes secondaires de la résistance	19
III LA TRANSMISSION DU PALUDISME EN ZONE DE SAVANE HUMIDE AU SUD-OUEST DU BURKINA FASO	20
3.1 Présentation de l'étude	20
3.1.1 Description des sites d'étude	20
3.1.2 La récolte et le traitement des moustiques	21
3.2 Résultats	24
3.2.1 La transmission dans les hydroaménagements agricoles de la Vallée du Kou	24
3.2.1.1 Composition de la faune culicidienne	24

3.2.1.2 Densités vectorielles	25
3.2.1.3 Variation mensuelle des densités agressives	26
3.2.1.4 Variation mensuelle du taux de parturité	28
3.2.1.5 Variation mensuelle de l'indice sporozoïtique	33
3.2.1.6 Taux d'inoculation entomologique	33
3.2.2 La transmission en milieu urbain de Bobo-Dioulasso	38
3.2.2.1 Composition de la faune culicidienne	38
3.2.2.2 Densités vectorielles	39
3.2.2.3 Variation mensuelle des densités agressives	40
3.2.2.4 Variation mensuelle du taux de parturité	40
3.2.2.5 Indice sporozoïtique	41
3.2.2.6 Taux d'inoculation entomologique	41
3.2.3 La transmission dans les villages de savane arborée : Léna et Toussian	46
3.2.3.1 Composition de la faune anophélienne	46
3.2.3.2 Densités vectorielles	47
3.2.3.3 Variation mensuelle des densités agressives	47
3.2.3.4 Variation mensuelle du taux de parturité	48
3.2.3.5 Indice sporozoïtique	52
3.2.3.6 Taux d'inoculation entomologique	52
3.2.4 Le Suivi de la transmission à Léna sur trois années consécutives	55
3.2.4.1 Composition de la faune vectrice	55
3.2.4.2 Taux d'endophagie des trois espèces vectrices	57
3.2.4.3 Variation mensuelle des densités vectrices	57
3.2.4.4 Variation annuelle du taux d'inoculation entomologique	58
3.3 Discussion	62
IV ETUDE DE LA RESISTANCE AUX INSECTICIDES	67
4.1 Présentation de l'étude	67
4.1.1 Les sites d'étude	67
4.1.2 La collecte et le traitement des moustiques et les tests insecticides en tubes OMS	69
4.1.3 Diagnostic des espèces et formes moléculaires du complexe <i>An. gambiae</i> et mise en évidence de la mutation kdr	72
4.1.4 Séquençage de l'intron en amont du gène du Canal Sodium	72

4.2 Résultats	73
4.2.1 Répartition géographique de la résistance au Burkina Faso	73
4.2.1.1 Mortalité au test OMS	73
4.2.1.2 Diagnostic d'espèces et formes moléculaires du complexe <i>An. gambiae</i>	74
4.2.1.3 Distribution de la mutation kdr au sein des populations échantillonnées	79
4.2.2 Répartition de la résistance suivant l'utilisation des insecticides	82
4.2.2.1 Suivi de la résistance dans les zones urbaine cotonnière et à cultures vivrières	83
4.2.2.2 Suivi de la résistance dans les périmètres rizicoles	86
4.2.3 Variabilité temporelle de la résistance	91
4.2.4 Etude des événements d'introgession au sein du complexe <i>An. gambiae</i>	94
4.3. Discussion	99
V CONCLUSION	104
VI BIBLIOGRAPHIE	
VII PUBLICATIONS	

Liste des Annexes

- Article 1- Baldet T, Diabaté A & Guiguemdé TR (2003). Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama) Burkina Faso. *Cahier santé* : accepté
- Article 2- Chandre F, Brengues C, Dossou Yovo J, Manguin S, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P & Guillet P (1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west africa and futher evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* **41** : 319-322.
- Article 3- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Darriet F, Brengues C, Guiguemdé TR, Guillet P, Hemingway J, Small GJ & Hougard JM, (2002). The role of agricultural use of insecticides in *An. gambiae* sl resistance to pyrethroids in Burkina Faso (West Africa). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: sous presse.
- Article 4- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Dabiré R, Ido K, Guiguemdé TR & Hougard JM (2001). Sensibilité aux pyréthriinoïdes d'*Anopheles gambiae* sl dans les hydro-aménagements au Burkina Faso : implications opérationnelles dans la lutte contre le paludisme. *Hydro-aménagements et système de production-Impact Social, Economique et Environnemental*. Editions Karthala : accepté
- Article 5- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Guiguemdé TR, Guillet P, Hemingway J & Hougard JM (2002). First report of the Kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. Short note dans *Parassitologia*: sous presse.
- Article 6- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Dabiré KR, Kengne P, Simard F, Guiguemdé TR, Guillet P, Hemingway J & Hougard JM (2002). Kdr mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera, Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. *Journal of Medical Entomology*: sous presse.
- Article 7- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Dabiré KR, Simard F, Ouédraogo JB, Guillet P, & Hougard JM (2002). The kdr mutation detected in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. Short note dans *American Mosquitoes Control Association*: soumis

I INTRODUCTION

De toutes les affections parasitaires, le paludisme est la maladie à laquelle l'humanité paie le plus lourd tribut. Pourtant c'est depuis la fin du 19^{ème} siècle que cette maladie a été décrite au laboratoire et que le rôle vecteur du moustique a été établi, suite aux travaux de Charles Louis Alphonse Laveran d'une part et de Ronald Ross d'autre part (Bruce-Chwatt, 1988, Danis et Mouchet, 1991). Ces données devaient être confirmées plus tard, précisant le rôle des femelles du moustique du genre *Anopheles* dans la transmission des quatre espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme chez l'homme. La maladie sévit à l'état endémique dans près de 100 pays et plus de 2,4 milliards de personnes y sont encore exposées au risque. On estime l'incidence de la maladie dans le monde à 300-500 millions de cas cliniques. Entre 1,1 et 2,7 millions d'individus en meurent chaque année dont 90% proviennent de l'Afrique au Sud du Sahara (WHO, 1998a, Trigg et Kondrachine, 1998). À cela, s'ajoute le fardeau économique dont le coût direct et indirect dans le monde est passé de 800 millions de dollars américains en 1987 à près de 2 200 millions en 1998 (Trigg et Kondrachine, 1998).

Dans les années 1950, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait défini une stratégie d'éradication de la maladie qui a obtenu, dans les zones de paludisme stable, des résultats très limités. Aussi la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme privilégie désormais le contrôle de la maladie (diminution de la mortalité et de la morbidité palustres) en s'appuyant sur 4 éléments techniques :

- assurer un diagnostic précoce et un traitement rapide des cas ;
- planifier et mettre en œuvre des mesures de prévention sélective et durable portant notamment sur la lutte antivectorielle ;
- déceler précocement, contenir ou prévenir les épidémies ;
- renforcer les moyens locaux en matière de recherche fondamentale et appliquée.

L'un des obstacles majeurs à la mise en œuvre de moyens de luttés fiables et efficaces réside dans l'extrême variabilité des profils épidémiologiques de la maladie ainsi que dans le manque cruel de moyens dans les pays les plus touchés. Au plan de la

recherche, la biologie des vecteurs et du parasite, les facteurs anthropiques ainsi que la complexité de leurs relations les uns avec les autres nécessitent des investigations supplémentaires. La résistance du parasite aux antimalariques est désormais un fait en Afrique, ce qui pose de plus en plus de problèmes pour trouver un traitement efficace. Le vaccin en est toujours au stade de la recherche et de nouvelles méthodes de lutte moins coûteuses sont nécessaires.

Le volet entomologique est une composante importante de la lutte antipaludique. Un programme ambitieux d'éradication du paludisme dans les années 1950 en Europe du Sud a conduit à des résultats spectaculaires (Coluzzi, 1992), à porter au compte d'une stratégie de lutte intégrée prenant en compte :

- l'amélioration de l'habitat ;
- la séparation des habitats hommes/animaux ;
- la lutte antivectorielle ;
- l'accès aux soins ;
- la prise en charge systématique des cas.

La lutte antivectorielle par l'utilisation des Matériaux Imprégnés d'Insecticide (MII) a montré ces dix dernières années qu'on pouvait en Afrique réduire la morbidité palustre de 50 à 60% et la mortalité générale de 20% (Alonso *et al.*, 1991, Alonso *et al.*, 1993, D'Alessandro *et al.*, 1995, Binka *et al.*, 1996). Cette méthode de lutte basée sur la participation active des communautés présente un rapport coût/efficacité théoriquement supportable par les communautés. L'OMS recommande d'ailleurs aux états d'intégrer leur utilisation dans les plans nationaux de lutte contre le paludisme. Si cette méthode permet d'espérer qu'environ 500 000 enfants africains pourraient être sauvés chaque année, sa vulgarisation reste cependant confrontée à des problèmes de faisabilité au plan opérationnel. Se pose également le problème de la résistance des vecteurs aux insecticides.

La résistance d'*An. gambiae* est apparue en Afrique de l'Ouest dès les premiers traitements à la dieldrine (Mouchet, 1988). Elle semble avoir été largement induite par les traitements agricoles et concerne l'Afrique (même si la lutte antivectorielle contre le

paludisme peut avoir contribué ici ou là à l'augmentation de la résistance chez *Anopheles gambiae*). Pour le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le premier cas de résistance en Afrique a été signalé en 1967, soit environ 7 ans après l'arrêt des campagnes pilotes (Hamon and Garrett-Jones, 1963, Hamon *et al.*, 1968). Là encore, il s'agit d'une résistance induite par l'utilisation massive du DDT sur le coton. Cette résistance ne concerne que l'Afrique de l'Ouest. En Afrique du Sud, à Madagascar, et dans d'autres régions du monde (Thaïlande, Amérique du Sud) malgré des décennies d'utilisation continue du DDT en pulvérisation intradomiciliaire, aucune baisse de sensibilité bien documentée n'a été observée jusqu'à ce jour. En l'absence d'une surveillance régulière, des données récentes sur le statut de sensibilité d'*An. gambiae* aux organophosphorés (OP) et aux carbamates font cruellement défaut, néanmoins des foyers de résistance au carbosulfan ont été reportés récemment en Côte d'Ivoire (N'guessan *et al.*, sous presse). Ces insecticides, quoique gardant pour la plupart leur efficacité, ne peuvent malheureusement pas être utilisés sur les moustiquaires. Seuls les pyréthrinoïdes sont utilisés en imprégnation parce qu'ils sont peu toxiques, exercent un effet excito-répulsif et agissent très rapidement en assommant le moustique. À cela s'ajoute leur coût faible aux doses d'utilisation. Cependant des cas de résistance à ces insecticides ont été reportés chez *An. gambiae* s.l. et chez *An. funestus* en Afrique de l'Ouest, de l'Est et du Sud (Elissa *et al.*, 1993, Chandre *et al.*, 1999, Diabaté, 1999, Ranson *et al.*, 2000a, Hargreaves *et al.*, 2000). Des études complémentaires en cases expérimentales ont cependant montré qu'en dépit de ce fort niveau de résistance, les moustiquaires imprégnées restent toujours efficaces sur le terrain (Darriet *et al.*, 1999., Carnevale Com. pers) en Afrique de l'Ouest.

La résistance aux insecticides est un caractère héréditaire dont l'évolution dans les populations d'insectes repose sur la sélection d'allèles apparus soit par mutation spontanée, soit par migration. Pour envisager une gestion de la résistance, il est indispensable de connaître la nature des mécanismes impliqués, leur mode de transmission et de dispersion dans les populations d'insectes et d'évaluer l'importance des facteurs qui concourent à son apparition et à son extension sur le terrain.

Sur le plan de la transmission du paludisme, de nombreuses études longitudinales et pluridisciplinaires ont mis en évidence la complexité du système vectoriel impliqué dans la zone afrotropicale (Hamon *et al.*, 1956, Coluzzi, 1984, Mouchet *et al.*, 1993). Dans la grande majorité des cas, plusieurs espèces transmettent le parasite en même temps ou de façon alternée au cours de l'année. L'écosystème étant sujet à de constantes modifications, cela peut avoir un impact considérable sur la compétence vectorielle des espèces déjà présentes, mais aussi recomposer la dynamique de la faune anophélienne du milieu. Cinq espèces sont considérées comme vecteurs d'importance majeure sur le continent africain. Bien connaître ces populations vectorielles et définir leurs interrelations est primordial pour mieux comprendre les mécanismes de la transmission et, ainsi, pouvoir agir de manière efficace.

C'est sur la base de ces objectifs que nous avons étudié la transmission du paludisme dans trois écosystèmes différents au Sud-Ouest du Burkina Faso et la résistance d'*An. gambiae* s.l. aux pyréthrinoïdes.

Nous allons présenter dans un premier temps quelques généralités sur les vecteurs du paludisme en général et le complexe *An. gambiae* en particulier, mais aussi sur les insecticides et les mécanismes de résistance développés par les vecteurs vis-à-vis des ces molécules. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats de nos recherches d'abord sur la dynamique de la transmission dans les 3 écosystèmes, puis sur la répartition géographique et les variations spatio-temporelles de la résistance aux pyréthrinoïdes. Et enfin, un dernier chapitre sera consacré à l'analyse des phénomènes d'introgession des gènes de résistance au sein du complexe *An. gambiae*.

II RAPPELS ET GENERALITES

2.1 Le paludisme au Burkina Faso

Le Burkina Faso est un pays intertropical à caractère soudano-sahélien nettement marqué et couvre une superficie de 274 000 km² avec une population estimée à 10 millions d'habitants. Le découpage de l'année en saison se caractérise par l'alternance d'une saison sèche dont la longueur varie de 8 mois au nord à 6 mois au sud et d'une saison humide ou

hivernage, de mai à octobre au sud, de juin à septembre au nord, avec des inter-saisons plus ou moins marquées (Laclavère *et al.*, 1993). Le pays se divise en 3 régions climatiques (**figure. 1**)

- La zone soudanienne au Sud avec 900 – 1 300 mm de précipitations cumulées sur 6 mois de l'année.
- La zone soudano-sahélienne au Centre recevant 600-900 mm de précipitations par an.
- La zone sahélienne au Nord plus sèche avec moins de 600 mm de précipitations.

Les températures mensuelles moyennes se situent entre 25°C et 35°C et les extrêmes se rencontrent généralement au Nord du pays avec un maximum pouvant atteindre par moments 45°C (Laclavère *et al.*, 1993).

Le paludisme constitue un problème de santé majeur au Burkina Faso avec plus de 700 000 cas notifiés par an. C'est un pays à endémicité palustre avec toutefois une forte variation dans le nombre de cas relevés dont le gradient décroissant va du Sud vers le Nord. La transmission est assurée par trois vecteurs (*An. gambiae* s.s, *An. arabiensis*, *An. funestus* et dans une moindre mesure *An. nili*) essentiellement de juin à décembre. Cependant il faut signaler que la durée et l'intensité de la transmission est sujette à variations compte tenu de la spécificité climato-écologique des régions. De trois mois au Nord, elle peut s'étaler sur toute l'année dans les hydroaménagements agricoles au Sud avec un pic aux mois d'août et de septembre.

2.2 Cycle sporogonique du parasite chez l'anophèle

Seule la femelle du genre *Anopheles* est susceptible de transmettre le paludisme à l'homme. Elle s'infecte à la faveur d'un repas de sang pris sur un sujet infesté porteur de gamétocytes. Elle absorbe différents stades du parasite. Les éléments asexués, trophozoïtes et schizontes seront tous digérés. Seuls les gamétocytes poursuivront leur développement. Dans les 20 minutes qui suivent le repas de sang, ceux-ci évoluent rapidement en micro et macro-gamètes. La fusion des gamètes complémentaires donne un zygote mobile qui prend le nom d'ookinète (oeuf mobile). L'ookinète à l'intérieur duquel a lieu la réduction chromosomique par méiose, traverse la paroi de l'estomac et forme sur sa face externe un

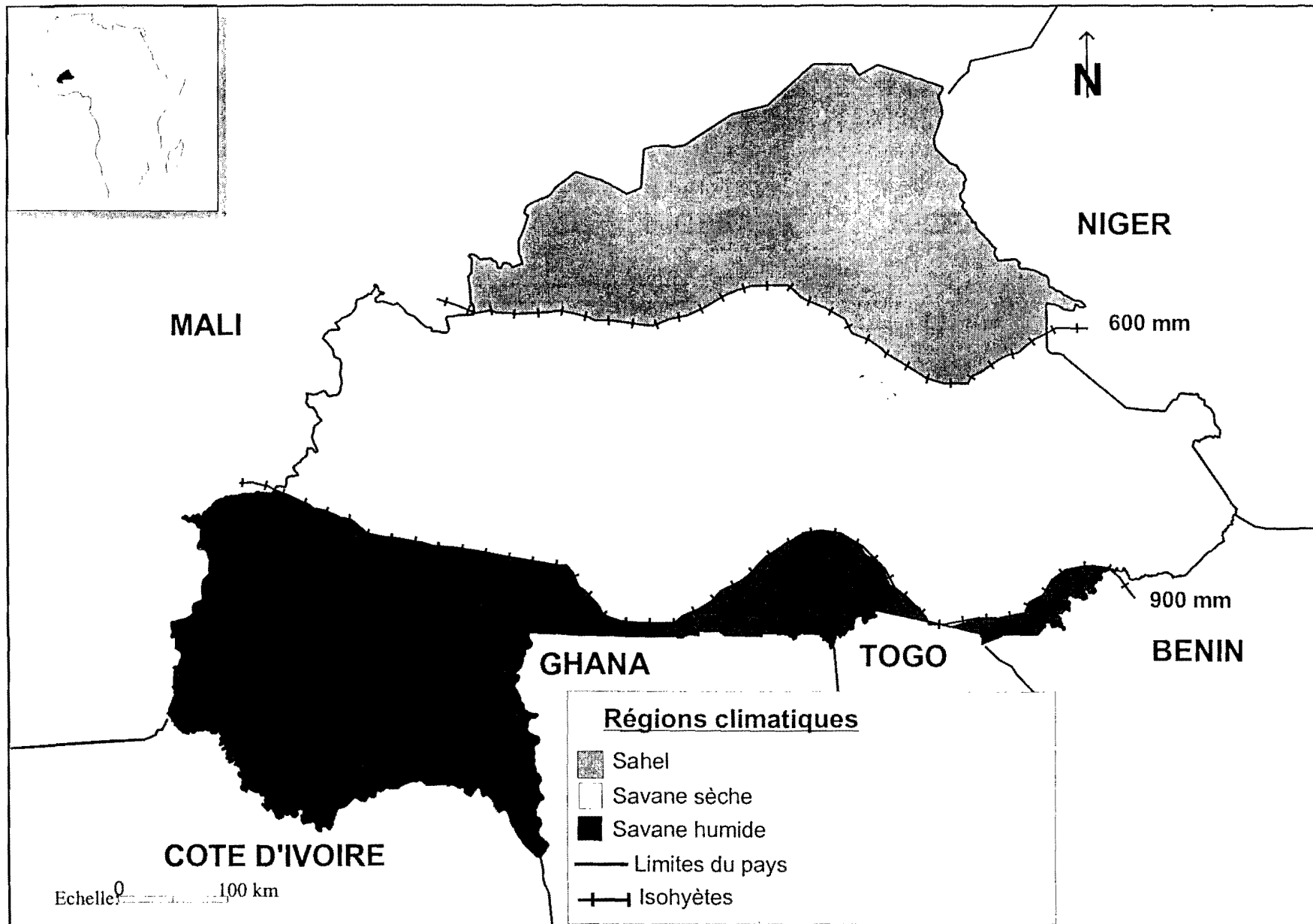


Figure 1: Régions climatiques du Burkina Faso

oocyste dont l'évolution aboutira aux sporozoïtes. Ces derniers par leur mouvement, fragilisent la membrane de l'oocyste qui cède et les libère dans l'hémolymphe. Ils gagneront par la suite préférentiellement les glandes salivaires dans lesquelles ils pourront s'incorporer. Ils seront injectés lors du prochain repas de sang, faisant ainsi démarrer le cycle sporo-gamogonique chez l'homme. Le cycle sporogonique du *Plasmodium* chez le vecteur dure environ 10 à 25 jours et ce en fonction de l'espèce plasmodiale et de la température.

2.3 Les vecteurs du paludisme en Afrique

Les moustiques constituent le groupe de vecteurs le plus important en médecine humaine. Ils assurent la transmission du paludisme, des filarioses lymphatiques, des arboviroses telles que la fièvre jaune, la dengue et des encéphalites arbovirales (Rodhain et Perez, 1985). De nombreuses espèces, n'interviennent pas dans la transmission d'agents pathogènes, mais constituent une nuisance considérable. Il existe 3 200 espèces de moustiques appartenant à 37 genres différents. Seul le genre *Anopheles* assure la transmission du paludisme. On en compte environ 400 espèces, mais seulement une soixantaine d'entre elles peuvent être considérées comme vecteurs et une trentaine comme de bons vecteurs (Rodhain et Perez, 1985). Les exigences écologiques des vecteurs déterminent les lieux de transmission palustre .

De nombreuses études ont été réalisées sur la systématique, la biologie et le rôle vecteur des anophèles en Afrique. Toutes ces études ont mis en évidence la complexité du système vectoriel (Hamon *et al.*, 1956, Coluzzi 1984, Mouchet *et al.*, 1993, Fontenille et Lochouart, 1999) et ont montré que le paludisme était transmis par cinq vecteurs majeurs : *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. Toutefois, huit ou neuf autres espèces d'anophèles sont considérées comme des vecteurs secondaires ou locaux. C'est le cas d'*An. mascarensis* à Madagascar (Fontenille et Campbell, 1992). Dans de très nombreuses régions, plusieurs espèces sont en sympatrie et transmettent le paludisme en même temps ou de façon alternée.

2.3.1 Le complexe *Anopheles gambiae*

En dépit de son importance dans la transmission du paludisme en Afrique subsaharienne, de nombreuses inconnues persistent sur l'identification précise des espèces du complexe *An. gambiae*. Considéré à l'origine comme une seule espèce, on compte de nos jours sept espèces morphologiquement identiques au stade adulte dont les croisements interspécifiques en laboratoire donnent lieu à des mâles stériles (White, 1974, Hunt *et al.*, 1998). Il s'agit de :

- *An. gambiae* s.s. Giles, 1902
- *An. arabiensis* Patton, 1904
- *An. bwambae* White, 1985
- *An. melas* Theobald, 1903
- *An. merus* Doenitz, 1902
- *An. quadriannulatus* Theobald A, 1911
- *An. quadriannulatus* B, Hunt *et al.*, 1998

2.3.2 Biologie et répartition géographique

Les anophèles sont des insectes holométaboles dont le cycle de développement est marqué par une phase préimaginale aquatique (oeufs, larves, nymphes) et une phase adulte aérienne (imago). La durée de développement larvaire est très variable. *An. gambiae* s.l. accomplit son développement larvaire en moins de 10 jours dans les collections d'eaux stagnantes, temporaires, peu profondes, ensoleillées, faiblement chargées en matières organiques et où la température de l'eau dépasse 30°C (Christie, 1959). D'autres espèces, comme *An. funestus*, accomplissent leur cycle en 20 ou 30 jours dans des collections d'eau plus profondes, bordées de végétation aquatique. La biologie de l'adulte est orientée avant tout vers la fonction de reproduction. La femelle n'est fécondée qu'une fois dans sa vie

mais les mâles peuvent féconder plusieurs femelles (Craig, 1967). Le cycle de maturation des ovocytes qui débute avec le repas de sang et qui se termine avec la ponte est dénommé *cycle gonotrophique*.

La répartition géographique de ces espèces est liée à des contraintes climato-écologiques. Globalement, *An. gambiae* occupe majoritairement la zone de forêt et de savanes humide et sèche. Cette espèce vit en sympatrie avec *An. arabiensis* dans la quasi totalité de la savane afro-tropicale non méridionale. Les deux espèces d'*An. quadriannulatus* sont rencontrées en Ethiopie et dans l'Est de l'Afrique méridionale. Les larves de ces quatre espèces vivent en eau douce. Quant aux trois autres espèces, *An. melas* et *An. merus* vivent à l'état larvaire en eau saumâtre, respectivement sur le littoral Ouest et Est de l'Afrique et les larves d'*An. bwambae* vivent dans les sources d'eau minérale de la forêt de Semliki en Ouganda (White, 1985). Ces trois dernières espèces sont allopatriques, mais vivent en sympatrie à la fois avec *An. gambiae* et/ou *An. arabiensis* (Bryan *et al.*, 1987). Chacune de ces espèces est manifestement protégée par d'efficaces mécanismes d'isolement reproductif. Ces mécanismes ne sont pas encore formellement identifiés, mais sont certainement liés à des composantes éthologiques, agissant avant la copulation (Coluzzi *et al.*, 1985).

De ces sept espèces, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont les vecteurs les plus importants. Les analyses cytogénétiques portant sur le caryotype d'inversion chromosomique, en particulier les inversions sur le bras droit du chromosome 2 (2R), ont montré que *An. gambiae* s.s. est constituée de plusieurs sous-populations non panmictiques (Coluzzi *et al.*, 1985, Petrarca *et al.*, 1987, Touré *et al.*, 1994). C'est seulement au début des années 1980 que cette complexité taxonomique a été mise en évidence en Afrique de l'Ouest: les populations de certains caryotypes sur le terrain sont rarement en équilibre de Hardy-Weinberg dû à un déficit systématique d'hybrides. Aussi *An. gambiae* s.s. a été démantelé en cinq unités

appelées formes chromosomiques (Bamako, Bissau, Forêt, Mopti et Savane) réparties en Afrique de l'Ouest suivant des paramètres éco-éthologiques (Coluzzi *et al* 1985). Bien qu'aucune différence morphologique ni de barrières reproductives en laboratoire n'aient été observées, certains auteurs estiment que les résultats de la cytogénétique donnent la preuve d'une spéciation avancée entre ces cinq unités taxonomiques (Bryan *et al.*, 1982, Coluzzi *et al.*, 1985, Touré *et al.*, 1983, 1994, 1998). Le marqueur moléculaire (PCR-RFLP) développé pour cette espèce par Favia *et al* (1997 ; 2001) a finalement démembré ces cinq unités taxonomiques en deux groupes distincts appelés formes moléculaires M et S. Cependant, il faut signaler qu'une bonne correspondance entre les deux outils de diagnostic n'a été observée pour le moment qu'au Burkina Faso et au Mali, zones de savane tropicale humide et sèche (della Torre *et al.*, 2001).

Au Burkina Faso, deux formes chromosomiques, Mopti et Savane, sont rencontrées. Elles correspondent respectivement aux formes moléculaires M et S et coexistent en proportions variables selon les conditions climatiques et écologiques du milieu (della Torre *et al.*, 2001 ; Robert, 1989).

2.4 Les insecticides

De nombreuses molécules sont utilisées de nos jours pour combattre les vecteurs de maladie et les nuisants mais aussi et surtout les ravageurs des cultures. Ces molécules sont principalement regroupées en quatre grandes familles chimiques:

2.4.1 Les insecticides organochlorés

Le vocable organochlorés se réfère aux molécules comme le DDT et ses analogues, le lindane et les cyclodiènes, ainsi subdivisés au regard de leur structure chimique et de leur mode d'action.

Les organochlorés tuent généralement par contact mais peuvent aussi agir par absorption et dans quelques cas comme des fumigants. La plupart de ces composés agissent sur le système nerveux. Le lindane et les cyclodiènes agissent sur le système nerveux central en inhibant les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), tandis que le DDT agit à la fois sur le système nerveux périphérique et central en modifiant les caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant (CNaVdp). De par son mode d'action, le DDT exerce sur les insectes un effet rapide, parfois réversible, appelé effet « Knock Down » (effet KD). Bien que les organochlorés aient été largement utilisés dans les années 50-60 dans les programmes de contrôle du paludisme, ils ont été progressivement délaissés à cause de leur accumulation dans les chaînes trophiques. Le DDT s'accumule dans les tissus adipeux en raison de sa solubilité dans les graisses.

2.4.2 Les insecticides organophosphorés

Les premiers insecticides organophosphorés ont été mis au point en Allemagne pendant la seconde guerre mondiale. De nombreuses molécules ont été synthétisées depuis et leur nombre est désormais très important. Ils peuvent être classés en deux grands sous-groupes: les insecticides **exothérapeutiques** (le parathion, le malathion etc...), qui pénètrent directement dans l'organisme des insectes par des voies diverses et les insecticides **endothérapeutiques ou systémiques** qui ont la particularité de pénétrer dans les végétaux et d'y circuler avec la sève en subissant parfois des modifications et en rendant ces végétaux toxiques pour les insectes qui les consomment. C'est la forme oxydée de ces pesticides qui se fixe sur l'acétylcholinestérase. Cette enzyme dégrade l'acétylcholine, qui agit comme neuromédiateur des synapses cholinergiques. La fixation des organophosphorés sur l'acétylcholinestérase entraîne l'accumulation d'acétylcholine dans la jonction synaptique.

Lorsque sa concentration devient trop forte, les récepteurs de l'acétylcholine se bloquent en position ouverte, entraînant la paralysie puis la mort de l'insecte.

2.4.3 Les carbamates

Les carbamates, tout comme les organophosphorés, sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. À la différence des organophosphorés, ils agissent directement sans oxydation préalable. Leur coût de production et leur toxicité vis-à-vis des mammifères sont souvent plus élevés. Ils sont donc moins utilisés en santé publique.

2.4.4 Les pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs du chrysanthème, *Chrysanthemum cinerariaefolium*. À l'origine, c'est une plante commerciale cultivée dans de nombreux pays, tant en zones tropicales que tempérées. Ses extraits exercent, comme le DDT, un effet KD. Ils n'ont cependant aucune stabilité et se dégradent rapidement au contact de la lumière. Ainsi ils ont été longtemps utilisés comme ingrédients dans la constitution des bombes aérosols utilisées à usage domestique contre les insectes nuisants.

L'identification des pyréthrines naturelles a permis la synthèse de composés ayant des effets insecticides plus marqués et une meilleure stabilité. Ces insecticides sont classés en deux groupes selon qu'ils possèdent un groupement cyané en position α de la liaison ester (groupe II : deltaméthrine, lambda-cyhalothrine...) ou non (groupe I : perméthrine). Les pyréthriinoïdes ont un large spectre d'action sur les insectes. Ils sont actifs contre tous les stades de développement, larves comme adultes. Tout comme le DDT, ils agissent à la fois sur le système nerveux périphérique et central en modifiant les caractéristiques électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant CNaVdp. Ces canaux une fois activés (i.e. en position ouverte), entraînent un flux d'ions Sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation de la membrane cellulaire ne dure que quelques millisecondes et le canal revient spontanément à l'état de repos (i. e. fermé). Elle provoque l'activation des CNaVdp

situés à proximité et de proche en proche, engendre une vague de dépolarisation assurant la propagation de l'influx nerveux (Chapman, 1969).

2.4.5 Les autres insecticides chimiques

On peut citer les régulateurs de croissance qui sont des analogues d'hormones d'insectes tels que les juvénoïdes (méthoprène, pyriproxyfen) et les ecdysoïdes (diflubenzuron). Ces molécules empêchent le développement normal des larves, soit en inhibant la nymphose soit en bloquant la synthèse de la chitine.

De nouvelles molécules d'insecticides sont à l'essai :

- les néo-nicotinoïdes (imidacloprid, acetamiprid) qui sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ils agissent par ingestion, ont un large spectre d'action et sont très peu toxiques pour les mammifères.
- les « METIs » (Mitochondrial Electron Transport Inhibitors). Ces molécules inhibent la respiration mitochondriale en bloquant le transport des électrons dans la mitochondrie. Elles agissent par contact et par ingestion sur les hémiptères et les lépidoptères.
- les fiproles, tel que le fipronil, agissent par contact et par ingestion sur les récepteurs GABA au même titre que les cyclodiènes tel que la dieldrine. La résistance généralisée à la dieldrine chez la plupart des populations de moustiques sur le terrain offre très peu de perspectives à l'utilisation des fiproles.

2.4.6 Les insecticides d'origine biologique

Ce sont des molécules provenant d'agents biologiques qui agissent efficacement sur certaines espèces de vecteurs. Les plus utilisées en entomologie médicale sont les toxines bactériennes produites par *Bacillus thuringiensis israelensis* (B.t.i) et *B. sphaericus*. Ces bactéries sporogènes synthétisent des toxines entomopathogènes puissantes et stables. Elles résistent assez bien à un stockage prolongé même en milieu tropical. Les toxines agissent au niveau de l'intestin des larves. Elles ne deviennent efficaces que lorsqu'elles sont ingérées, n'ont aucun effet par contact et sont très sélectives. Contrairement au *B. sphaericus* qui ne synthétise qu'une seule protéine toxique, le *B.t.i* en synthétise cinq. Il a

été utilisé efficacement pendant 20 ans en Afrique pour lutter contre les simulies, vecteurs de l'onchocercose. Le problème cependant reste à trouver une meilleure formulation pour leur application contre les moustiques dans les conditions tropicales en Afrique.

D'autres insecticides d'origine biologique comme les produits de fermentation tels que les avermectines et les naturalytes, sont issues des champignons de sol. Elles ont un spectre large d'action et agissent par contact et par ingestion.

2.4.7 Les agents de lutte biologique

Un grand nombre d'agents biologiques sont recensés sur le terrain. Cela inclut les prédateurs comme les poissons larvivores, les Toxorynchites, les parasites tels que certains champignons et des virus. Efficaces dans des conditions expérimentales, ces agents ont donné à des rares exceptions près des résultats peu encourageants sur le terrain.

2.5 Les méthodes de lutte antivectorielle

La lutte contre les vecteurs de maladies fait appel à des stratégies très diverses en raison de la multiplicité des espèces qui affichent des comportements variables. De nombreuses méthodes sont utilisées pour lutter contre les moustiques, mais toutes n'ont pas le même impact. L'efficacité et la sélectivité d'une stratégie tiennent compte à la fois de la bio-écologie, du comportement des espèces cibles et du contexte épidémiologique de la transmission (WHO, 1995). En fonction des outils et de la stratégie adoptés, cette lutte peut s'appliquer à différents niveaux :

2.5.1 La lutte anti-larvaire

Cette méthode est difficile à mettre en pratique dans le cadre du paludisme. Elle n'est envisageable que lorsque les principaux gîtes larvaires sont en nombre limités, repérables et facilement accessibles. Cela concerne essentiellement les zones urbaines et péri-urbaines où le téméphos a été le principal larvicide utilisé (Carnevale et Mouchet, 1990). À cela s'ajoutent des méthodes alternatives qui ont une efficacité circonscrite et nécessite une bonne connaissance de la biologie et du comportement de l'insecte dans son milieu

(poissons larvivores, champignons, *Bacillus sphaericus*...) (WHO 1984, Sinègre *et al.*, 1993, Baldet, 1995). Les mesures d'assainissement avec élimination des gîtes larvaires s'appliquent surtout aux genres *Culex* et *Aedes* en milieu urbain, mais les municipalités manquent assez souvent de moyens et on note le plus souvent une faible participation des communautés.

2.5.2 Stratégies de lutte contre les stades adultes

Cette méthode s'applique principalement à trois niveaux : la pulvérisation intradomiciliaire, la protection individuelle/collective et la lutte génétique. La pulvérisation intradomiciliaire avec un insecticide rémanent a été longtemps la principale méthode de lutte antivectorielle en matière de paludisme, car bien adaptée aux vecteurs qui ont, pour la plupart, un comportement endophile. On constate cependant, à l'exception de certains pays (comme l'Afrique du Sud, Madagascar et des zones d'épidémie palustre) un abandon progressif de cette méthode au profit d'une nouvelle stratégie combinant l'effet chimique d'une molécule d'insecticide (en l'occurrence un pyréthrianoïde) à la barrière physique de la moustiquaire. Ces MII (matériaux imprégnés d'insecticides) ont connu un grand intérêt depuis 1990 suite aux premiers essais réalisés dans des cases expérimentales au Burkina Faso (Darriet *et al.*, 1984, Carnevale *et al.*, 1988, Darriet, 1991). De multiples études réalisées ultérieurement à grande échelle ont permis de montrer que cet outil était à même de réduire la morbidité et la mortalité palustres (Alonso *et al.*, 1991 et 1993, D'Alessandro *et al.*, 1995, Binka *et al.*, 1996). Les MII diminuent le contact homme-vecteur en repoussant ou en tuant les moustiques qui tentent d'atteindre leur appât (Ranque *et al.*, 1984; Lines *et al.*, 1985 ; Snow *et al.*, 1987 ; Graves *et al.*, 1987 ; Robert *et al.*, 1989 ; Robert et Carnevale, 1991 ; Karch *et al.*, 1993 ; Beach *et al.*, 1993 ; Diabaté, 1995). Cela relève du fait que les moustiques qui transmettent le paludisme piquent la nuit et ont, pour la plupart, un comportement endophile. Une revue de synthèse sur ce sujet a été publiée par Sexton en 1994.

La troisième stratégie de lutte contre les stades adultes relève de la génétique. Les recherches sur le génome du moustique sont en plein essor et la manipulation génétique

des vecteurs pour en altérer par exemple la capacité vectorielle ouvre des perspectives intéressantes (Crampton *et al.*, 1990 ; Kidwell et Ribeiro, 1992 ; Aldous, 1993 ; Collins, 1994 ; Collins *et al.*, 1994 ; Curtis, 1994 ; Collins et James, 1996). Les fondements de cette lutte pour le contrôle des vecteurs ont été établis par LaChance et Knippling (1962), Craig (1963), Knippling *et al.*, (1968), Whitten et Pal (1974), Whitten et Foster (1975), Waterhouse *et al.*, (1976) et Curtis (1985). Son principe repose sur la diffusion d'un ou de plusieurs gènes bloquant le développement du parasite au sein des populations naturelles.

2.6 Les mécanismes de résistance aux insecticides

Le terme résistance a été défini par l'OMS comme « la faculté chez une souche d'un organisme donné à tolérer les doses d'un produit toxique qui tue la majorité des individus d'une population normale de la même espèce ».

Tous les êtres vivants possèdent des mécanismes de défense qui les protègent contre les effets néfastes de substances exogènes. Si une substance toxique entre dans un organisme plus rapidement qu'elle ne peut être éliminée, elle s'accumule au niveau de son site d'action jusqu'à atteindre une concentration létale.

Les mécanismes de résistance peuvent être classés en trois catégories:

- La résistance métabolique
- La modification de la cible
- Les mécanismes secondaires de la résistance.

2.6.1 La résistance métabolique

La résistance métabolique correspond à un accroissement des processus de dégradation qui interviennent dans le métabolisme normal des insecticides. Cette résistance est le résultat soit d'une modification de la structure de l'enzyme, ce qui accroît ses capacités catalytiques soit d'une augmentation de la quantité d'enzymes produites. Elles dégradent les insecticides en molécules non toxiques ou moins toxiques et sont subdivisées en trois catégories.

- Les estérases

Les estérases sont des enzymes qui coupent les liaisons esters. Elles sont impliquées dans la résistance aux organophosphorés et à un degré moindre dans la résistance aux pyréthriinoïdes. Plusieurs estérases de résistance ont été révélées par électrophorèse chez les moustiques, notamment *Culex pipiens*. La classification de ces estérases en types A ou B repose sur leur capacité à hydrolyser de façon préférentielle l'un ou l'autre substrat: l'acétate d' α -naphthyle ou l'acétate de β -naphthyle. Chez *C. quinquefasciatus*, on a mis en évidence une surproduction d'estérase B1 en parallèle à l'augmentation de la résistance au chlorpyrifos. La base génétique de cette grande activité estérasique est une amplification génique ou copie multiple du gène codant pour l'enzyme (Mouchès *et al.*, 1986, Soderlund et Bloomquist, 1990, Devonshire et Field, 1991). Ce renforcement d'un mécanisme de défense naturel a un coût pour l'insecte. Ainsi chez *C. quinquefasciatus* les estérases surproduites peuvent représenter jusqu'à 30% des protéines totales de l'insecte (Mouchès *et al.*, 1986).

- Les oxydases

Les oxydases sont impliquées dans la résistance à plusieurs groupes d'insecticides. Il s'agit là de phénomènes métaboliques encore relativement mal connus pour ce qui concerne leur implication dans la résistance aux insecticides. L'action de ces oxydases donne lieu à la formation de sous produits plus solubles dans l'eau pouvant être facilement excrétés. Le rôle de ces oxydases à fonction mixte peut être détecté en utilisant un synergiste inhibiteur, le piperonyl butoxide en association avec l'insecticide dans les essais biologiques.

- Les glutathion S-transférases (GST)

Ce sont des enzymes qui conjuguent des insecticides avec la forme réduite du glutathion formant ainsi des métabolites moins toxiques. La DDT-ase en est l'exemple

typique. Elle intervient spécifiquement dans la dégradation du DDT. Chez *Ae. aegypti*, les gènes de deux familles (GST1 et GST2) ont été clonés (Grant and Matsumura, 1988). Chez *An. gambiae* s.l, sept GST différentes ont été identifiées (Prapanthadara *et al.*, 1995).

2.6.2 La résistance par modification de la cible

Les mutations au niveau de la cible de l'insecticide s'accompagnent souvent de phénomènes de résistance croisée. Ces modifications ont été observées au niveau des récepteurs ou des enzymes du système nerveux. De telles résistances sont dues à une baisse d'affinité du site d'action vis à vis de l'insecticide. En général les sites d'action chez l'insecte sont l'acétylcholinestérase, les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique et le canal sodium.

- L'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase (AChE) met fin à la transmission synaptique en catalysant l'hydrolyse du neurotransmetteur, l'acétylcholine. Les organophosphorés et les carbamates sont des neurotoxines. Ils inactivent cette enzyme par phosphorylation de la sérine au niveau du site d'action. L'accumulation d'acétylcholine dans la jonction intersynaptique entraîne l'arrêt de la transmission des impulsions nerveuses et la mort de l'insecte. Plusieurs insectes ont développé une résistance à ces composés par mutation de leur acétylcholinestérase. L'AChE des individus résistants est moins sensible à l'action inhibitrice de ces insecticides que celle des individus sensibles (Hama, 1983; Oppenoorth, 1985; Soderlund and Bloomquist, 1990, Mutero *et al.*, 1994). Cela a été mis en évidence chez certaines espèces de moustiques telles que *C. pipiens*, *An. albimanus* (Hemingway and Georghiou, 1983), *An. nigerrimus* (Hemingway *et al.*, 1986) et *An. sacharovi* (Hemingway *et al.*, 1992). Chez *Drosophila melanogaster*, quatre sites de mutation ont été relevés sur le gène de l'AChE. Ce gène a été récemment décrit chez *An. gambiae* s.l. en Côte d'Ivoire (N'Guessan *et al.*, sous presse).

- Les récepteurs GABA (gamma-aminobutyric acid)

Les organochlorés du groupe des cyclodiènes ont leur site d'action au niveau des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique du système nerveux central. Une seule mutation ponctuelle sur des récepteurs GABA est responsable de la résistance aux cyclodiènes chez plusieurs espèces d'insectes. Tout comme dans le cas de l'AChE, cette mutation entraîne une modification structurale du site d'action réduisant ainsi la fixation des cyclodiènes.

- Le canal sodium

L'exposition d'une souche sensible d'insectes au DDT ou à un pyréthrianoïde entraîne une paralysie très rapide (effet knock down). Ces insecticides agissent au niveau des canaux sodium voltage-dépendant (CNaVdp) de la membrane nerveuse en perturbant le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses. Cette résistance est due, chez les moustiques, à une mutation ponctuelle dans le sixième segment du domaine II du gène codant pour le canal sodium. La mise en évidence d'une résistance croisée au DDT et aux pyréthrianoïdes est en général une bonne indication de l'implication de cette mutation dans la résistance, du moins si aucun mécanisme de détoxification n'est mis en évidence. La mutation codant pour cette résistance est appelé gène kdr (knock down resistance).

2.6.3 Les mécanismes secondaires de la résistance

Il s'agit de mécanismes peu communs dont l'efficacité est relativement moindre, comme la pénétration réduite de l'insecticide à travers la cuticule de l'insecte et les comportements d'évitement. Ces mécanismes, moins étudiés, interviennent souvent en synergie avec les mécanismes précédents.

III LA TRANSMISSION DU PALUDISME EN ZONE DE SAVANE HUMIDE AU SUD-OUEST DU BURKINA FASO

3.1 Présentation de l'étude

La transmission du paludisme a été étudiée dans trois écosystèmes en savane arborée au Sud-Ouest du Burkina Faso (figure 2). Il s'agit de la zone rizicole de la Vallée du Kou, de la zone urbaine de Bobo-Dioulasso et des villages traditionnels de savane, Léna et Toussiana, où les modifications anthropiques de l'environnement sont moindres. La dynamique des espèces vectrices majeures ainsi que leur part respective dans la transmission ont été évaluées sur une année complète.

3.1.1. Description des sites d'étude

La zone rizicole de la Vallée du Kou est située à une trentaine de kilomètres au nord de Bobo-Dioulasso. Aménagée en 1972, elle s'étend sur 1 200 ha entre 4°24'42'' de longitude Ouest et 11°23'14'' de latitude Nord et regroupe 7 villages avec une population estimée à 8 447 habitants. Les paysans pratiquent deux campagnes de riz dans l'année et l'agriculture occupe 96% de la population active. La rizière est avant tout un plan d'eau peu profond en constante évolution. Après la mise en eau des parcelles et pendant les 2 ou 3 semaines qui suivent le repiquage, elle offre des possibilités considérables de développement aux anophèles. En Afrique de l'Ouest, c'est la forme M d'*An. gambiae* qui en profite. Ses larves utilisent la rizière dès sa mise en eau et pendant le repiquage des jeunes pousses de riz jusqu'à ce que leur croissance fasse obstacle aux rayons du soleil. Deux sites d'étude ont été retenus dans cette localité : un site dénommé, VK5, situé au plein cœur des périmètres rizicoles et un deuxième site, VK7, excentré à l'interface de la riziculture et du coton.

La ville de Bobo-Dioulasso compte environ 400 000 habitants. C'est une agglomération en constant accroissement issue de l'extension d'un village qui a constitué le noyau de base. Elle est située entre 4°17'30 de longitude Ouest et 11°10'41'' de latitude Nord. À l'instar de la plupart des centres urbains, elle offre une multitude de gîtes larvaires en rapport avec la nature usée des eaux, pour le développement de *Cx. quinquefasciatus*, principale cause de nuisance en ville. D'autres types de gîtes favorables au développement des anophèles existent dans les quartiers périphériques. Ces quartiers, pour la plupart en

chantier, sont parsemés de grandes carrières d'emprunt de terre favorables au développement des larves d'anophèles. Le vecteur urbain de *Plasmodium* pratiquement exclusif est *An. gambiae*. Il est le seul à y s'adapter et à s'y maintenir (Hamon *et al.*, 1956, Chinery, 1984). L'étude de la transmission a été réalisée au centre et en périphérie de la ville respectivement dans les quartiers de Dioulasso ba et de Kuinima.

Les localités de Léna et Toussiana situées dans la zone soudannienne sont des villages traditionnels de savane où la transmission du paludisme est saisonnière longue. Elles se caractérisent respectivement par 3°53'43'' de longitude Ouest et 11°18'17'' de latitude Nord et 4°37'54'' de longitude Ouest et 10°49'26'' de latitude Nord. Des multitudes de gîtes (fosses d'emprunt, mares temporaires...) dépendant des eaux de pluies favorisent le développement d'*An. gambiae* si qui assure la majeure partie de la transmission à Toussiana. Un important marigot dans le village de Léna favorise le développement d'*An. funestus* qui joue ainsi un rôle majeur dans la transmission du paludisme dans cette localité. L'agriculture occupe globalement la majorité de la population dans les deux villages et le paludisme comme dans les autres localités est la première cause de consultation dans les formations sanitaires. La population est estimée à 2 336 habitants à Léna et 4 479 à Toussiana.

Des animaux domestiques, bœufs, moutons, chèvres et porcs sont présent dans tous les sites d'étude et vivent souvent dans des enclos à proximité des maisons d'habitation.

3.1.2 La récolte et le traitement des moustiques

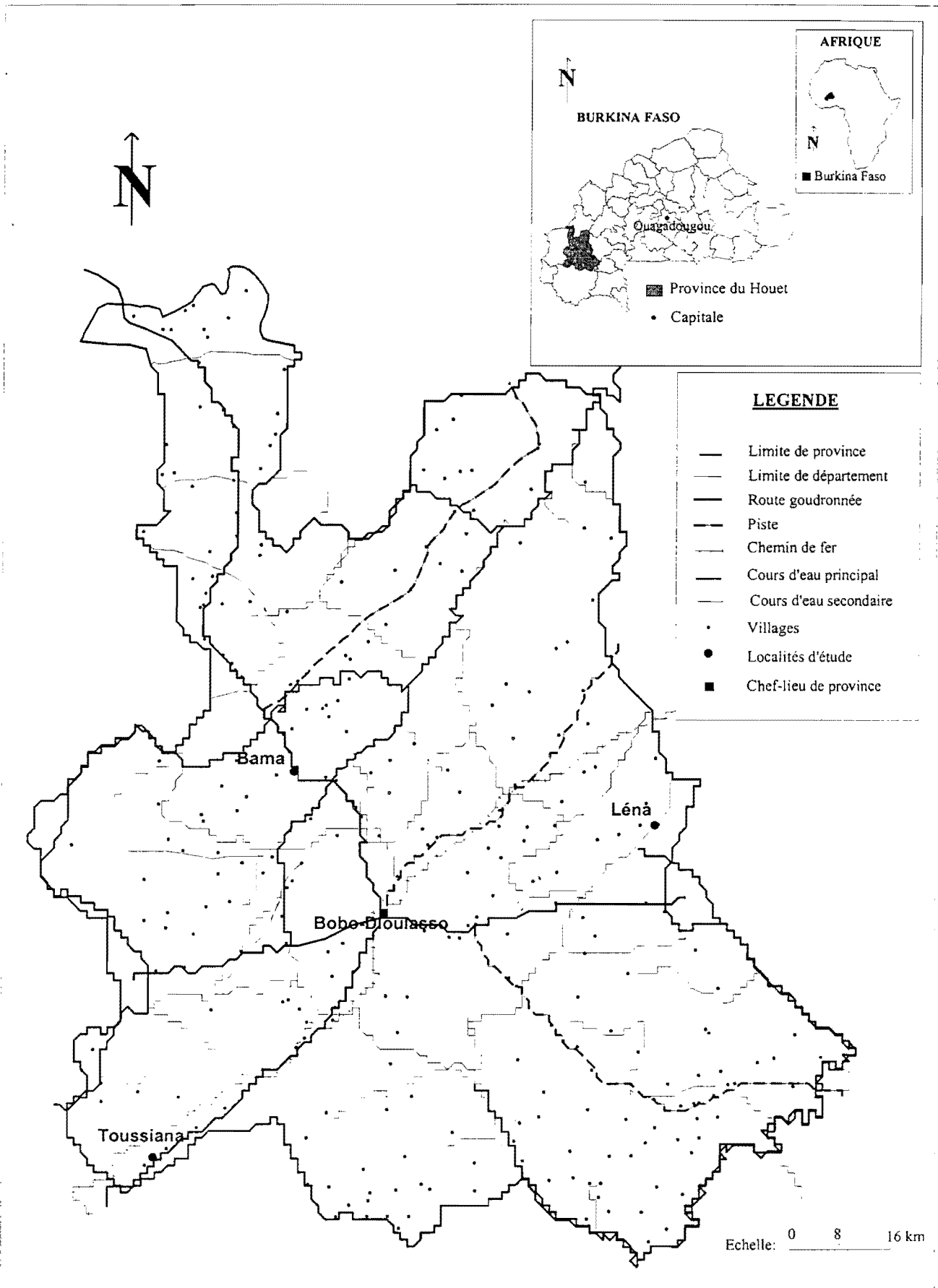
L'échantillonnage des moustiques a été fait par capture manuelle sur sujets humains. La jambe dénudée, le sujet volontaire, muni de tubes à hémolyse et d'une lampe torche, capture les moustiques qui viennent à lui. Dans chaque site d'étude, la collecte des moustiques a lieu à l'intérieur et à l'extérieur de quatre maisons dispersées dans le village (intérieur, extérieur) et deux équipes de huit personnes se relaient de 18h à 6h du matin. À raison de deux séances de capture par mois, ces sujets volontaires ont travaillé pendant 24 nuits dans chaque site d'étude de Mars 1999 à Février 2000, soit un total de 384 nuit-hommes. Les moustiques collectés sont stockés dans des sacs par tranche horaire et ramenés le lendemain matin au niveau de la station d'étude pour être dénombrés. Les vecteurs du *Plasmodium* ayant une activité préférentiellement nocturne, cette technique de

capture présente l'avantage de collecter les femelles agressives anthropophiles (piquant préférentiellement l'homme), endophages (piquant à l'intérieur des maisons) ou exophages (piquant à l'extérieur des maisons).

Après la séance de capture, les moustiques sont identifiés sous loupe binoculaire à l'aide des clés de détermination taxonomique basées sur les critères morphologiques (Gillies et de Meillon, 1968, Gillies et Coetzee, 1987). Ces moustiques sont ensuite dénombrés par tranche horaire et seuls les vecteurs du paludisme sont conservés (*An. gambiae* sl, *An. funestus* et *An. nili*). Les densités d'*An. gambiae* sl étant très élevées, on prélève pour chaque point de capture un échantillon de 50 femelles réparties dans les différentes tranches horaires pour la dissection des ovaires afin de déterminer le taux de parturité (Detinova, 1962). Quant à *An. funestus* et *An. nili*, toutes les femelles capturées sont disséquées. De retour au laboratoire, les moustiques disséqués sont analysés pour mesurer le taux d'infestation et par suite le niveau de la transmission.

L'indice sporozoïtique est un paramètre entomologique très important dans l'épidémiologie du paludisme. Il exprime la proportion de moustiques infestants dans une population donnée. Autrefois estimé par la dissection des glandes salivaires, ce paramètre est déterminé aujourd'hui grâce à une technique immunologique développée par Zavala *et al.*, (1982) et affinée plus tard par Burkot *et al.*, (1984) et Wirtz *et al.*, (1987). Elle est basée sur la détection dans la tête et thorax des moustiques de l'antigène circumsporozoïtique (CS) exprimé à la surface membranaire des sporozoïtes des *Plasmodium* par test ELISA en sandwich (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) grâce à des anticorps monoclonaux.

En raison de la spécificité du site de Léna, deux années supplémentaires de suivi de la transmission y ont été réalisés. Les maisons de captures sont restées les mêmes et les moustiques récoltés ont été exactement traités comme précédemment décrit. En revanche la période des captures a été réduite à six mois (de juillet à décembre) car la première année d'étude avait indiqué que seule cette période de l'année était productive en moustiques.



J ROUAMBA

FIGURE 2 : PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE

3.2 RESULTATS

3.2.1 La transmission dans les hydroaménagements agricoles de la Vallée du Kou (cf article n°1).

L'accroissement démographique et les irrégularités de la production agricole en Afrique incitent depuis plusieurs décennies au développement d'aménagements hydrauliques. De façon générale, sur le plan écologique, ces aménagements entraînent des modifications de l'écosystème, favorisant ainsi la prolifération de certains vecteurs de maladies infectieuses transmissibles, liées à l'eau. Les rizières font partie de ces zones agricoles dont l'aménagement peut avoir des répercussions au plan entomologique et particulièrement épidémiologique suivant la situation locale et le niveau de stabilité du paludisme. Elles occasionnent une pullulation de moustiques, notamment des anophèles vecteurs du paludisme. Au cours de notre étude, qui a duré de Mars 1999 à Février 2000, la dynamique de la faune culicidienne et le niveau de transmission ont été mesurés dans deux quartiers central (VK5) et périphérique (VK7) de la Vallée du Kou. Ces deux sites se caractérisent par l'abondance et la diversité de gîtes larvaires. Dans le quartier central, les casiers rizicoles constituent les principaux gîtes larvaires. Outre les casiers rizicoles, le quartier périphérique de VK7 se distingue par des flaques temporaires liées aux précipitations. La source Kou, un affluent de la Comoé, permet de pratiquer une culture de contre saison de Janvier à Juin. Les casiers rizicoles sont pratiquement en eau en permanence favorisant ainsi la reproduction des moustiques tout au long de l'année.

3.2.1.1 Composition de la faune culicidienne

Le nombre total de piqûres de moustiques reçues par homme en une année à VK5 a été estimé à 63 871 à l'intérieur des maisons contre 60 360 à l'extérieur (tableau 1). Une grosse part de cette agressivité est due au genre *Anopheles* qui représente 81,6% des captures contre 18,4% pour les *Mansonia*, *Culex* et *Aedes* confondus. La même observation est faite à l'extérieur des maisons avec 75,3% de piqûres assurées par le genre *Anopheles*. *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* sont les espèces dominantes. Les autres espèces

anophéliennes (*An. nili*, *An. pharoensis*, *An. coustani*, *An. squamosus*, *An. ziemanni*, *An. rufipes*) n'ont pas été prises en compte dans la suite des analyses, soit qu'elles étaient en nombre négligeable, soit qu'elles ne sont pas vectrices. La dynamique de cette faune anophélienne est fonction du cycle du riz, les espèces se succédant de la mise en eau des parcelles à la montaison jusqu'à l'épiaison et maturation. À VK7, le quartier périphérique, une répartition similaire de la faune culicidienne a été observé avec cependant une baisse des effectifs (tableau 1). Au total, 36 459 piqûres de moustiques sont reçues par homme dans l'année à l'intérieur des maisons, soit un peu plus de la moitié en comparaison des effectifs du quartier central VK5. La population anophélienne représente 93,1% du total de l'effectif. *Mansonia*, *Culex* et *Aedes* sont en très faible proportion (6,9%) dans ce quartier par rapport à VK5 où ils représentaient 18,4%. La disponibilité des gîtes et l'emplacement périphérique de ce quartier par rapport aux périmètres rizicoles expliquent cette différence. Les mêmes espèces d'anophèles sont également rencontrées dans ce site avec 90,8% pour *An. gambiae* s.l. et 3,7% pour *An. funestus*. À l'extérieur, le même schéma est obtenu avec toutefois une plus grande représentativité des *Mansonia*, *Culex* et *Aedes* (25%).

3.2.1.2 Densités vectorielles

La densité vectorielle agressive à VK5 a été estimée en moyenne à 125,2 piqûres/homme/nuit pour *An. gambiae* s.l. et 3,8 p/h/n pour *An. funestus*. Le rôle d'*An. nili* est insignifiant avec 0,06 p/h/n (tableau 2). Des valeurs du même ordre sont obtenues à l'extérieur à l'exception d'*An. nili* qui pique deux à trois fois plus qu'à l'intérieur. Ce moustique a donc une tendance plutôt exophage, contrairement aux deux autres qui piquent plus fréquemment à l'intérieur des maisons. La densité agressive reste comparable à VK7 pour *An. nili* et *An. funestus*, cependant elle est en baisse pour *An. gambiae* s.l..

Tableau 1 : Nombre total de piqûres reçues par homme à la Vallée du Kou de Mars 1999 à Février 2000.

Villages		ANOPHELINAE			CULICINAE	TOTAL
		<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>An. funestus</i>	Autres		
VK5	Intérieur	43 296	1 324	7 492	11 759	63 871
	Extérieur	35 216	922	9 297	14 925	60 360
VK7	Intérieur	29 715	1 207	3 021	3 723	36 459
	Extérieur	22 654	687	2 369	8 611	34 321

Tableau 2 : Densités vectorielles moyennes par habitant et par nuit à la Vallée du Kou de Mars 1999 à Février 2000

		Intérieur (n*)	Extérieur (n)
VK5	<i>An. gambiae</i> s.l.	125,17	101,83
	<i>An. funestus</i>	3,83	2,54
	<i>An. nili</i>	0,06	0,13
VK7	<i>An. gambiae</i> s.l.	81,45	62,07
	<i>An. funestus</i>	3,36	1,90
	<i>An. nili</i>	0,06	0,17

*n= nombre de piqûres/homme/nuit

3.2.1.3 Variation mensuelle des densités agressives

Deux pics de densité agressives d'*An. gambiae* s.l. sont notés dans les deux sites d'étude. Le premier en saison sèche, en mars, et le second pendant la saison des pluies en juillet. À VK5, le quartier central, ces densités sont respectivement de 209,8 p/h/n et de 314,3 p/h/n (figure 3). La densité aggressive la plus faible a été observée en janvier, soit 8,8 p/h/n. À VK7, le quartier périphérique, les moyennes obtenues sont plus faibles avec 2,1

p/h/n en janvier et 219 p/h/n en mars, densité la plus élevée. L'évolution mensuelle des densités agressives reflète l'alternance des saisons. Plus de 70% des effectifs sont observés de juin à novembre, période de saison de pluies (figure 4). Le second pic observé courant mars, pleine saison sèche, résulte de l'irrigation des parcelles pour la culture de contre saison. La dynamique des densités agressives est fonction de la pluviométrie et des phases de culture du riz. Les deux pics de densité enregistrés sont observés pendant la mise en eau des parcelles et le repiquage des plants de riz. Passée cette phase, les densités moyennes sont en nette régression pendant la saison sèche. En effet, de la montaison à la maturation, les plants de riz forment un couvert végétal qui fait obstacle aux rayons de soleil et créent un biotope peu favorable à la reproduction d'*An. gambiae* s.l.. Cet effet est moins perceptible pendant la saison des pluies, car aux gîtes des casiers rizicoles, s'ajoutent les gîtes naturels. La non synchronisation des cultures du riz joue également un rôle important dans la pullulation quasi-permanente des moustiques pendant la saison des pluies. Les coopératives villageoises étant éclatées, les paysans, faute d'encadrement, pratiquent d'autres activités de sorte que les travaux dans les périmètres aménagés ne sont jamais synchrones. De ce fait, les casiers rizicoles, à différents niveaux de développement, offrent des lieux de reproduction aux moustiques.

Quant à *An. funestus*, les effectifs sont nettement moindres avec une dynamique saisonnière très marquée (figure 5). Les densités sont pratiquement nulles du début jusqu'à la mi-saison des pluies. *An. funestus* est présent d'octobre à avril et affiche son pic de densité entre novembre et janvier (15,50 p/h/n à VK5 et 8,8 p/h/n à VK7). Les pics de densité de cette espèce s'observent au moment où *An. gambiae* s.l. est en nette régression. Il est peu probable, vu les faibles densités obtenues, que les casiers rizicoles soient un milieu de reproduction favorable à l'écologie d'*An. funestus*. Cette espèce se développe sans doute dans les gîtes naturels classiques en dehors des casiers rizicoles et exploiterait les canaux d'irrigation en terre mal entretenus.

3.2.1.4 Variation mensuelle du taux de parturité

Le taux de parturité moyen à l'intérieur des habitations d'*An. gambiae* s.l. a été de 20,9% (n= 1008) à VK5 et 39% (n= 1661) à VK7 (tableau 3). La différence entre ces deux indices est très hautement significative avec un $\chi^2 = 94,54$ pour $p << 0,05$. Des valeurs similaires (17,8% à VK5 et 36,8% à VK7) sont observées avec les femelles capturées à l'extérieur des habitations et la différence est très significative ($\chi^2 = 100,11$ et $p << 0,05$). Cette différence est probablement due à la plus grande proximité de VK5 du lieu d'émergence des femelles. L'évolution mensuelle du taux de parturité affiche deux pics qui sont en relation inverse avec les pics de densités (figure 3). L'un est observé en début saison des pluies pendant le mois de mai (81,3% à VK5 et 89,3% à VK7) et l'autre à la sortie de la saison des pluies en janvier (87,5% à VK5 et 85,7% à VK7). Cette variation est en rapport étroit avec les cycles du riz et la disponibilité des gîtes larvaires. Au plus fort de la densité pendant la mise en eau des parcelles, la population d'anophèles est essentiellement constituée de jeunes femelles, alors qu'au moment de la récolte du riz, les casiers sont à sec et la productivité des gîtes réduite, concourant au vieillissement de la population.

Les taux moyens de parturité sont nettement plus élevés chez *An. funestus* avec des valeurs de 70,3% à VK5 et 93,2% à VK7 (tableau 3). La différence observée est très significative ($\chi^2 = 25,42$ et $p << 0,05$). Il en est de même des taux enregistrés sur les femelles capturées à l'extérieur ($\chi^2 = 5,17$ et $p = 0,02$). Ces forts taux de parturité observés chez *An. funestus* s'expliquent par un nombre limité de gîtes de reproduction favorables à ce moustique d'où un faible renouvellement des populations.

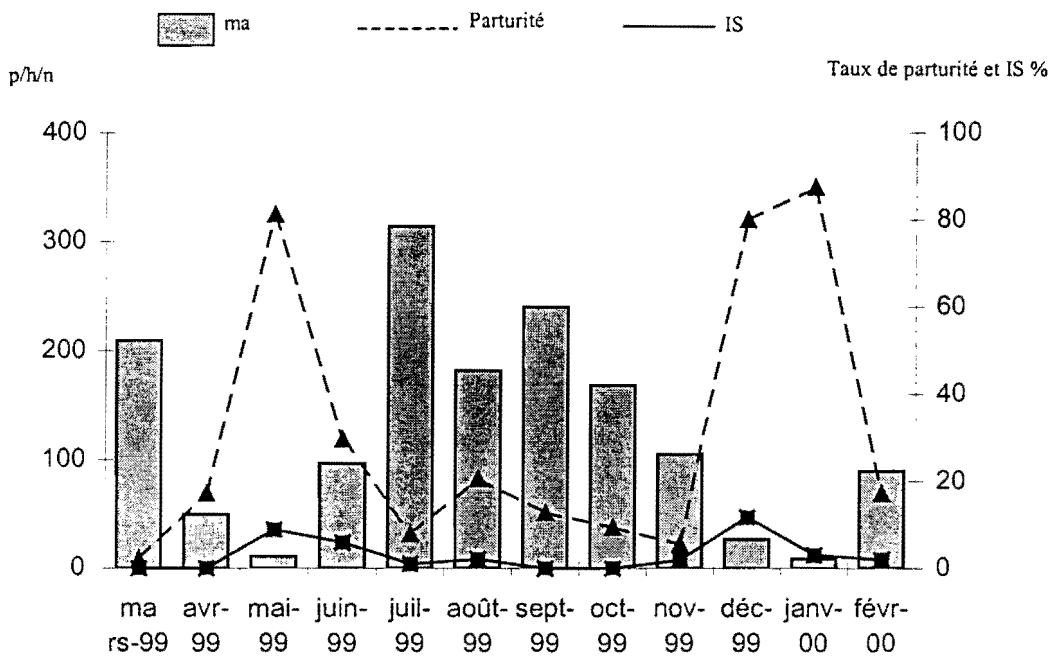


Figure 3a: Variations mensuelles de la densité agressive (ma) du taux de parturité et de l'indice sporozoïtique d'*Anopheles gambiae* s.l. à VK5 à l'intérieur des maisons

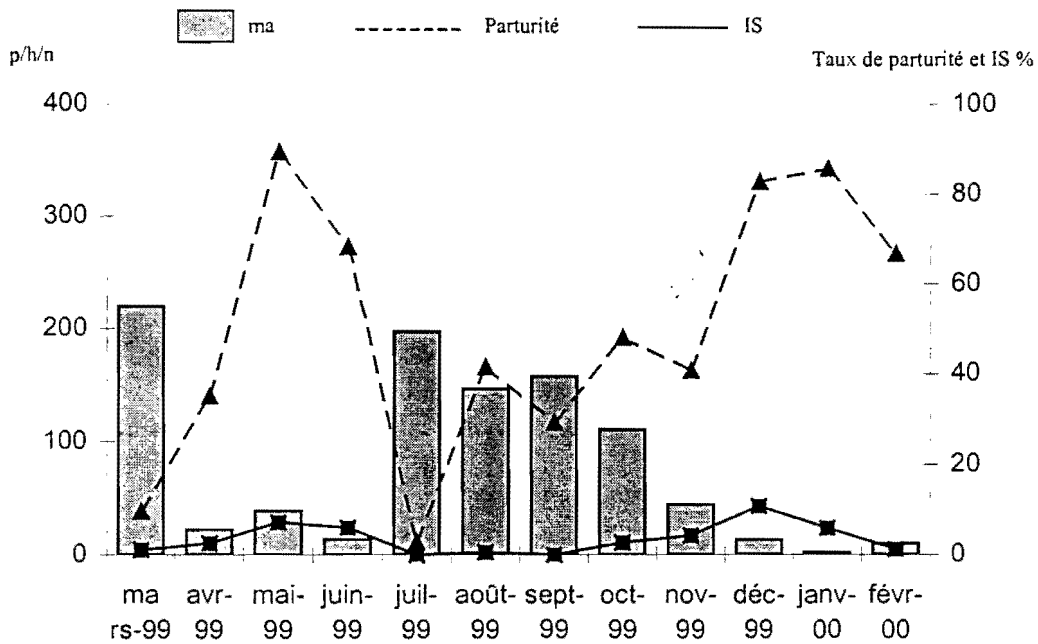


Figure 3b: Variations mensuelles de la densité agressive (ma) du taux de parturité et de l'indice sporozoïtique d'*Anopheles gambiae* s.l. à VK7 à l'intérieur des maisons

p/h/n= piqûres/homme/nuit

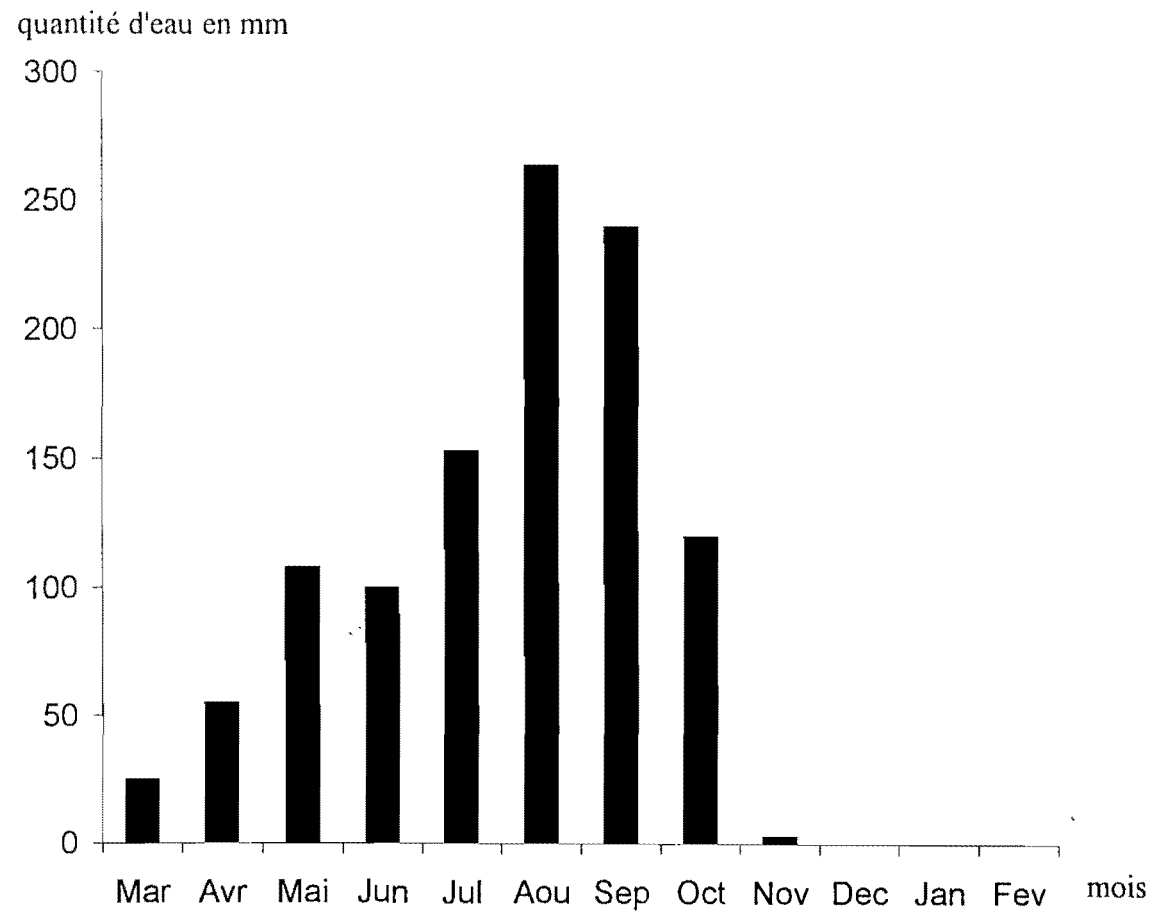


Figure 4: Répartition mensuelle de la pluviométrie de mars-99 à fév-00

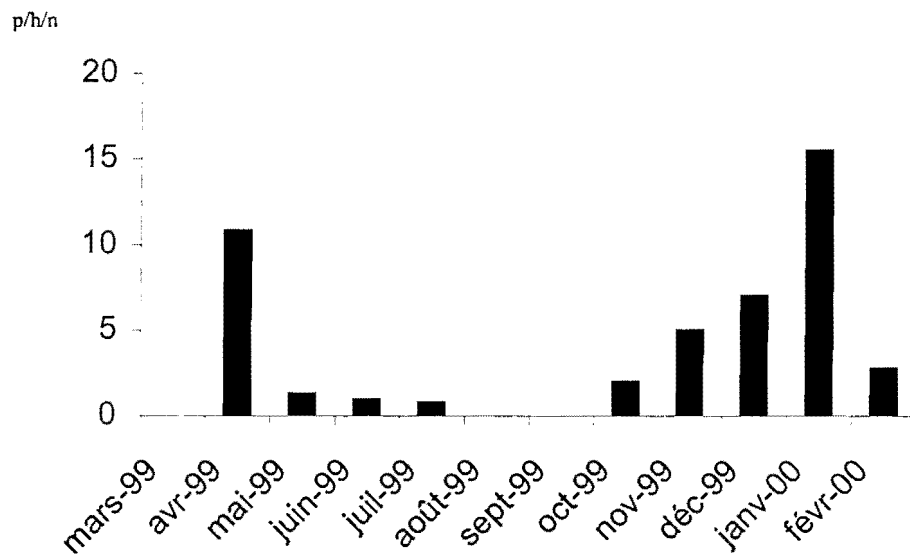


Figure 5a: Variation mensuelle de la densité agressive (ma) d'*Anopheles funestus* à VK5 à l'intérieur des maisons

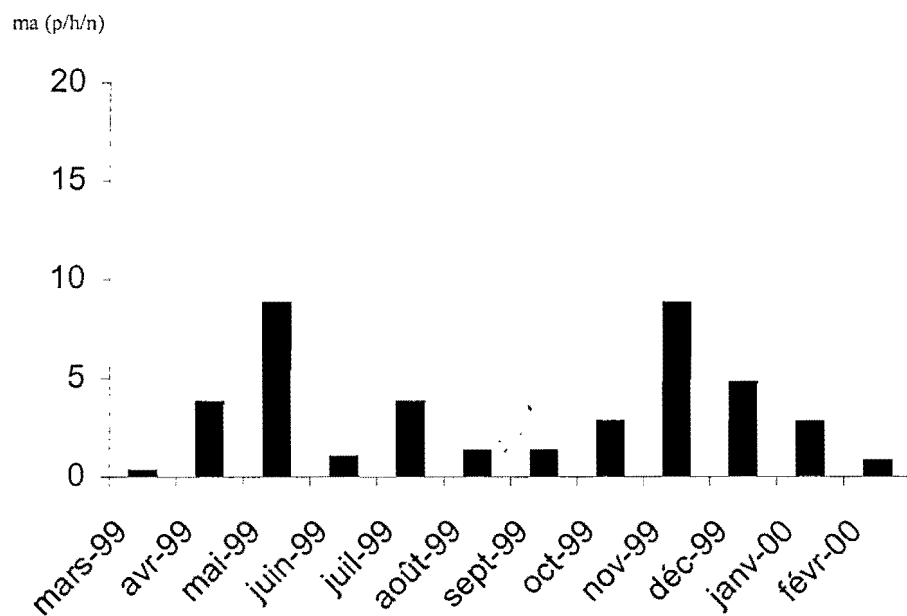


Figure 5b: Variation mensuelle de la densité agressive (ma) d'*Anopheles funestus* à VK7 à l'intérieur des maisons

p/h/n= piqûres/homme/nuit

Tableau 3: Taux de parturité de la population anophélienne circulant à la Vallée du kou de Mars 1999-Février 2000

		INTERIEUR				EXTERIEUR			
Moustiques	Villages	P= nombre de moustiques pares	B= P+N	TP= P/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2 p	P= nombre de moustiques pares	B= P+N	TP= P/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2 p
<i>Anopheles gambiae s.l</i>	VK5	211	1 008	20,9 (18,4-23,4)	94,5 <10 ⁻⁶	164	923	17,8 (15,3-20,2)	100,10 <10 ⁻⁶
	VK7	648	1 661	39,0 (36,5-41,4)		566	1 538	36,8 (34,4-39,2)	
<i>Anopheles funestus</i>	VK5	97	138	70,3 (63,1-77,5)	25,4 <10 ⁻⁶	63	79	79,80 (70,9-88,6)	5,2 0,023
	VK7	137	147	93,2 (89,1-97,3)		80	87	92 (86,3-97,7)	

P= femelles pares

N= femelles nullipares

TP=Taux de Parturité

3.2.1.5 Variation mensuelle de l'indice sporozoïtique

Au total 2 669 femelles d'*An. gambiae* s.l. ont été testées par ELISA dans les deux quartiers avec un taux moyen d'infestation à *Plasmodium falciparum* de 2,8% à VK5 et de 2,9% à VK7 (tableau 4). Les deux valeurs sont quasi-identiques ($\chi^2=0,03$ et $p=0,86$) malgré une différence significative observée entre les taux de parturité (tableau 3). Des taux d'infestation semblables ont été obtenus sur les femelles capturées à l'extérieur ($\chi^2=1,70$ et $p=0,19$). La variation mensuelle de l'indice d'infestation présente deux pics qui sont en relation inverse avec les pics de densité. Ces pics s'observent, l'un au début de la saison des pluies (mai-juin) quand les casiers rizicoles sont à sec au moment de la récolte du riz et l'autre en fin de saison de pluies (décembre-janvier) au moment de la deuxième récolte du riz (figure 3). Les plus faibles taux ont été obtenus de juillet-novembre, période de fortes densités due à une importante productivité des gîtes larvaires générant des femelles néonates.

Des taux d'infestation à *Plasmodium falciparum* nettement plus élevés chez *An. funestus* ont été obtenus dans les deux quartiers, la différence par rapport au taux observé chez *An. gambiae* étant très significative ($\chi^2=8,21$ et $p=0,004$). Toutefois ces valeurs ne diffèrent pas significativement entre les deux quartiers, ni à l'intérieur ($\chi^2=1,25$ et $p=0,26$), ni à l'extérieur ($\chi^2=0,05$ et $p=0,82$) des habitations (tableau 4).

3.2.1.6 Taux d'inoculation entomologique

Au total un homme reçoit potentiellement 697 piqûres infectées réparties dans l'année à VK5 et 515 à VK7 (tableau 5). Une grande partie de cette transmission est assurée par *An. gambiae* s.l. dans l'ensemble des deux sites (645/pi/h/an, soit 93% à VK5 et 435/pi/h/an, soit 84% à VK7), *An. funestus* intervenant pour moins de 20% de la transmission. Comparé aux valeurs de la transmission obtenues en 1985 (Robert *et al.*, 1985) dans les mêmes sites d'étude (50 piqûres infectantes/homme/an), le taux d'inoculation actuel est 10 fois supérieur (tableau 5) et est à porter au compte d'une augmentation des densités vectorielles (2 fois) et de l'indice d'infestation (7 fois). La transmission est étalée sur toute l'année avec une allure bimodale (figure 6). Le premier

pic s'observant aux mois de juin (à VK5) et de mai (à VK7) et le second apparaissant en décembre (à VK5) et Octobre (à VK7). Le premier pic de transmission d'*An. funestus* s'observe au même moment que celui d'*An. gambiae* s.l., le second par contre est légèrement décalé à l'image des courbes des densités vectorielles.

Tableau 4: Indice sporozoïtique (IS) de la population anophélienne circulant à la Vallée du kou de Mars 1999-Février 2000

Moustiques	Villages	INTERIEUR				EXTERIEUR			
		n=nombre de moustiques CS-positifs	B = P+N	IS= n/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2 p	n= nombre de moustiques CS-positifs	B= P+N	IS= n/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2 p
<i>Anopheles gambiae s.l</i>	VK5	28	1 008	2,8 (1,8-3,8)	0,03 0,87	17	923	1,8 (1,0-2,70)	1,70 0,19
	VK7	48	1 661	2,9 (2,1-3,7)		41	1 538	2,7 (1,9-3,5)	
<i>Anopheles funestus</i>	VK5	6	138	4,4 (1,0-7,8)	1,25 0,26	3	79	3,8 (0,8-10,7)	0,05 0,823
	VK7	11	147	7,48 (3,2-11,7)		5	87	5,8 (0,9-10,6)	

IS=indice sporozoïtique

B=P+N:somme des femelles pares et nullipares, seules les femelles pares ont été testées par ELISA

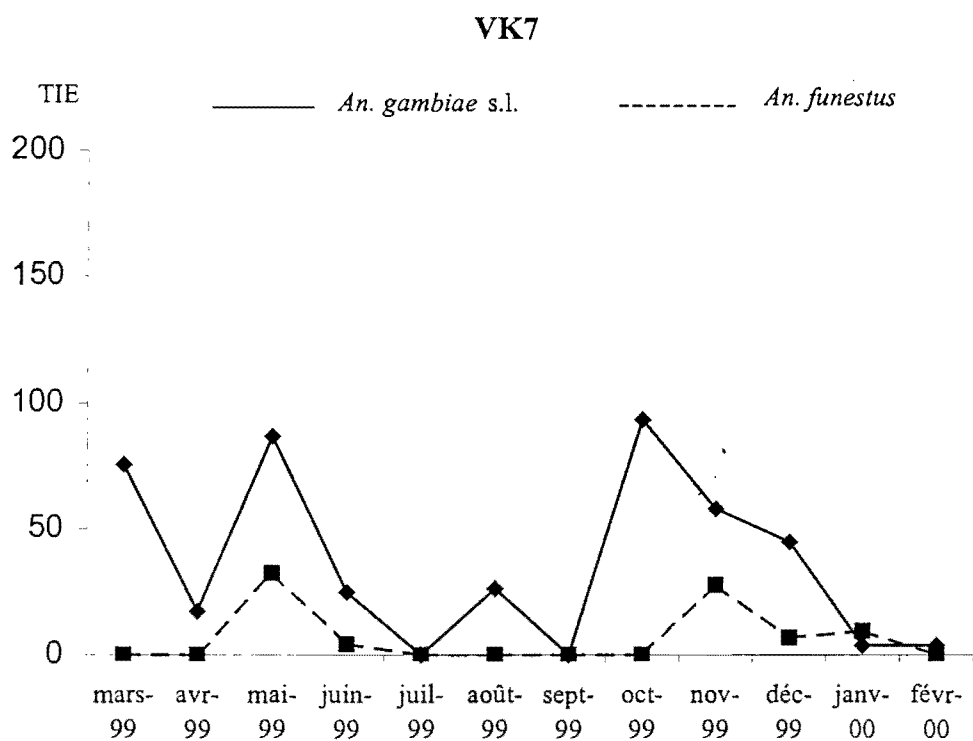
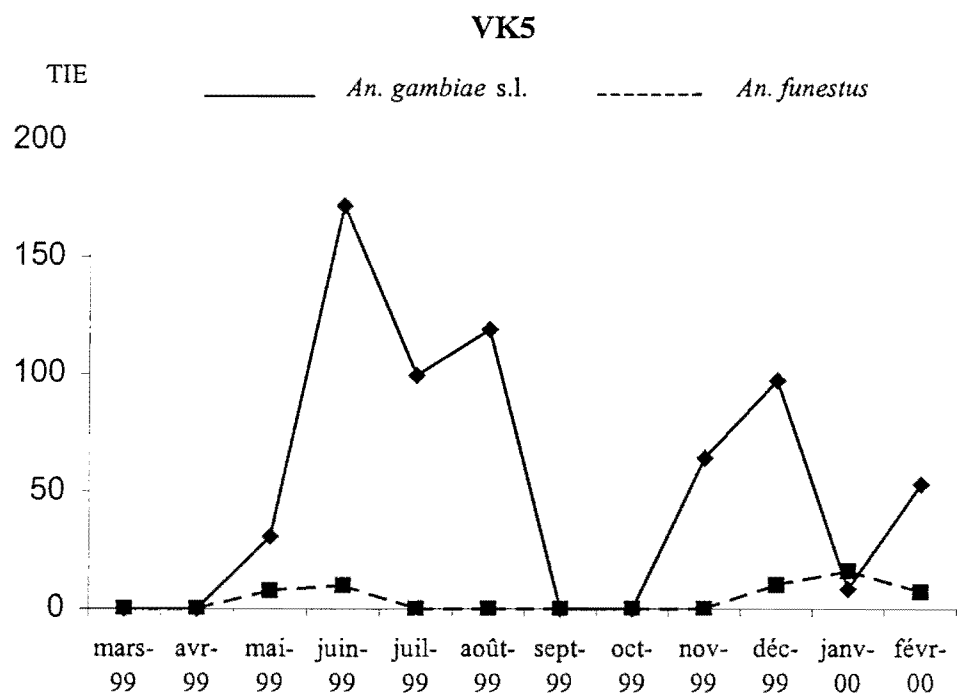


Figure 6: Variation mensuelle du taux d'inoculation entomologique (TIE) à l'intérieur des maisons pour un homme non protégé de Mars-99 à Février 00 à la Vallée du Kou

**Tableau 5: Taux d'Inoculation Entomologique (TIE) annuel à la Vallée du Kou
de Mars 199-Février 2000**

Villages	Moustiques	Intérieur		Extérieur	
		TIE*	TOTAL	TIE	TOTAL
VK5	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	645 93%	697	253 90%	280
	<i>Anopheles funestus</i>	52 7%		27 10%	
VK7	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	435 84%	515	317 92%	343
	<i>Anopheles funestus</i>	80 16%		26 8%	

*Taux d'inoculation entomologique et les pourcentages se rapportent à la participation de chaque espèce à la transmission

3.2.2. La transmission en milieu urbain de Bobo-Dioulasso

Le processus d'urbanisation est en plein essor dans les pays en voie de développement. C'est un phénomène qui modifie profondément les milieux écologiques et les modes de vie d'une grande partie de l'humanité. Les problèmes sanitaires rencontrés sont souvent spécifiques et dépendent largement de l'insuffisance des structures sanitaires qui tardent à se mettre en place. L'ampleur du paludisme dans ce milieu dépend à la fois du contexte épidémiologique où la ville se situe et de la structure propre de la cité. Dans une ville bâtie autour d'un noyau structuré, on observe une diminution de la transmission et des indices parasitaires de la périphérie vers le centre. En général le niveau de transmission y est faible par suite d'une modification anthropique du milieu défavorable à la reproduction des vecteurs. La dernière étude de la transmission du paludisme à Bobo-Dioulasso remonte à 1986. Par la présente étude nous cherchons à réactualiser les données sur la transmission dans un contexte d'urbanisation anarchique où la chloroquinorésistance est en hausse constante. Les suivis entomologiques se sont déroulés sur une année complète (mars-99 à février-00) dans deux quartiers de la ville. Le premier, Dioulassoba est situé au cœur de la ville et est caractérisé par une rivière, le Houet, qui le traverse du sud au nord et reste en eau toute l'année. C'est un quartier historique, non lotis, construit en banco qui abrite environ 8 000 habitants. Le deuxième quartier, Kuinima en périphérie, est situé à la limite sud-est de la ville. Il est caractérisé par la présence des fosses d'emprunt de terre pour la confection des briques, et de nombreuses petites flaques peu profondes et ensoleillées.

3.2.2.1 La composition de la faune culicidienne

Le nombre de piqûres de moustiques reçues par homme est fortement variable selon que l'on se trouve dans le quartier central ou périphérique. Ainsi de 3 295 p/h/an à Kuinima périphérique, ce chiffre est de 23 239 p/h/an à Dioulassoba central, soit 7 fois la valeur de Kuinima (tableau 6). La faune anophélienne est en très faible proportion avec seulement 8,5% des effectifs totaux et comprend trois espèces dont *An. gambiae* s.l. occupe la première place (92%). *Cx. quinquefasciatus* est l'espèce majoritaire en milieu urbain avec 94% du total des piqûres. Cette espèce non vectrice est abondante dans le

quartier central (98%) où les gîtes pollués à ciel ouvert abondent alors qu'à Kuinima elle ne représente plus que 51% des piqûres.

Tableau 6 : Nombre total de piqûres reçues par homme à Bobo-Dioulasso de Mars 1999 à Février 2000.

Quartiers		<i>ANOPHELINAE</i>			<i>CULICINAE</i>	TOTAL
		<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>An. funestus</i>	Autres		
Dioulassoba	Intérieur	811	0	0	22 428	23 239
	Extérieur	915	0	16	17 447	18 378
Kuinima	Intérieur	1 025	47	77	2 146	3 295
	Extérieur	1 206	0	8	2 058	3 272

3.2.2.2 Densités vectorielles

La densité vectorielle agressive moyenne à l'intérieur des maisons est très faible avec 2,3 p/h/n à Dioulassoba et 2,9 à Kuinima et est essentiellement due à *An. gambiae* s.l. (tableau 7). L'environnement est très peu favorable à *An. funestus* et *An. nili* qui sont pratiquement introuvables dans les habitations et n'ont donc pas été pris en compte dans l'évaluation du niveau de transmission. La même densité vectorielle est enregistrée à l'extérieur des habitations.

Tableau 7 : Densités vectorielles moyennes par habitant et par nuit à Bobo-Dioulasso de Mars 1999 à Février 2000

		Intérieur	Extérieur
Dioulassoba	<i>An. gambiae</i> s.l.	2,30	2,60
	<i>An. funestus</i>	0	0
	<i>An. nili</i>	0	0
Kuinima	<i>An. gambiae</i> s.l.	2,80	3,30
	<i>An. funestus</i>	0,1	0
	<i>An. nili</i>	0	0

3.2.2.3 Variation mensuelle des densités agressives

La variation mensuelle de la densité agressive présente une allure unimodale dans les deux quartiers avec toutefois un pic très étalé dans le quartier central (Dioulassoba) dont la valeur maximale enregistrée en septembre est de 5,5 p/h/n (figure 7). La présence de la rivière dans ce quartier en est la cause. De nombreuses petites flaques issues de la décrue de l'affluent ou des activités de maraîchage sur la berge du Houet offrent des gîtes de reproduction aux populations d'anophèles. La densité la plus faible a été enregistrée en mai, soit 0,8 p/h/n. À Kuinima toute la faune vectrice a été capturée pendant la saison des pluies de juin-octobre avec un pic de 21,5 p/h/n en septembre. Les gîtes classiques à *An. gambiae* s'assèchent avec la fin de la saison des pluies et ne permettent plus à ce moustique de se reproduire.

3.2.2.4 Variation mensuelle du taux de parturité

Compte tenu de la densité vectorielle faible, très peu de femelles ont pu être disséquées. Au total 322 femelles ont été disséquées donnant un taux moyen de parturité comparable dans les deux quartiers avec 82% à Dioulassoba et 80% à Kuinima ($\chi^2=0,09$ et $p=0,76$. Tableau 8). Des valeurs identiques ont été obtenues avec des captures de l'extérieur soit 80% à Dioulassoba et 78% à Kuinima ($\chi^2=0,09$ et $p=0,76$). Les valeurs mensuelles du taux de parturité dans le quartier central oscille entre 80 et 90%. Des valeurs

similaires sont observés à Kuinima où le taux de parturité n'a pu être mesuré que sur 3 mois. La baisse importante de la parturité observée au mois d'août à Dioulassoba s'explique par le nombre faible de femelles disséquées.

3.2.2.5 Indice sporozoïtique

Au total 322 moustiques ont été testés par ELISA dans les deux quartiers. Le taux moyen d'infestation était comparable d'un site à un autre avec 7,8% à Dioulassoba et 7,1% à Kuinima ($\chi^2=0,03$ et $p=0,858$ tableau 9). Des valeurs similaires sont également obtenues avec les captures extérieures et là encore la différence observée n'est pas significative ($\chi^2=0,04$ et $p=0,836$).

3.2.2.6 Taux d'inoculation entomologique

Le taux d'inoculation entomologique est de 57 piqûres infectantes/homme/an à Dioulassoba et de 63 pi/h/an à Kuinima à l'intérieur des habitations. Un homme dormant à l'extérieur reçoit presque autant de piqûres avec 49 piqûres infectantes à Dioulassoba et 60 piqûres à l'extérieur. La courbe mensuelle de transmission est bimodale dans le quartier central avec un maximum de 13 piqûres infectantes enregistrées en novembre (figure 8). Aucune piqûre infectante n'a été décelée de décembre à mars malgré la présence d'une faune résiduelle à la faveur du marigot dans le quartier. À Kuinima, la transmission a été observée pendant deux mois, avec un pic de 48 piqûres infectantes en septembre.

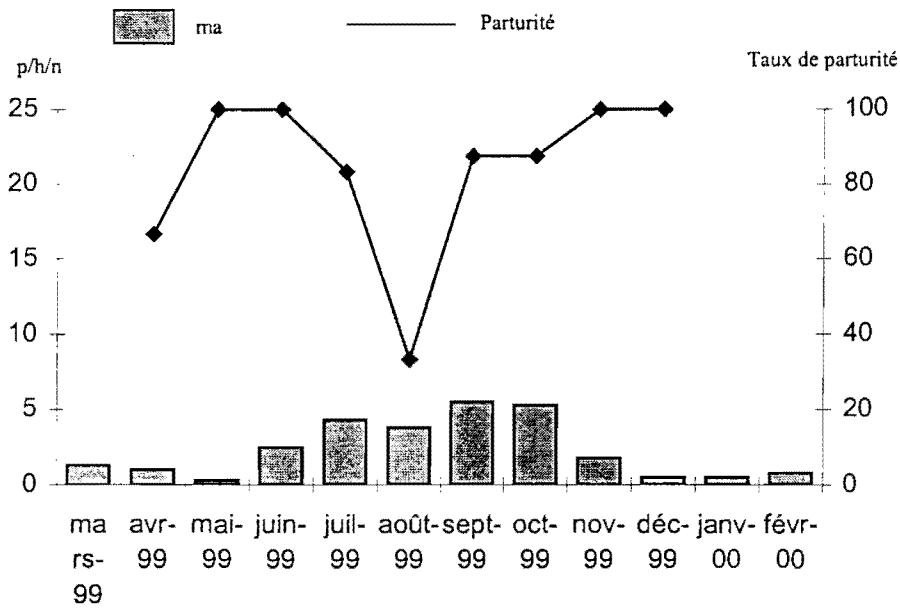


Figure 7a: Variations mensuelles de la densité agressive (ma) et de la parturité d'*Anopheles gambiae* sl à Dioulasso ba

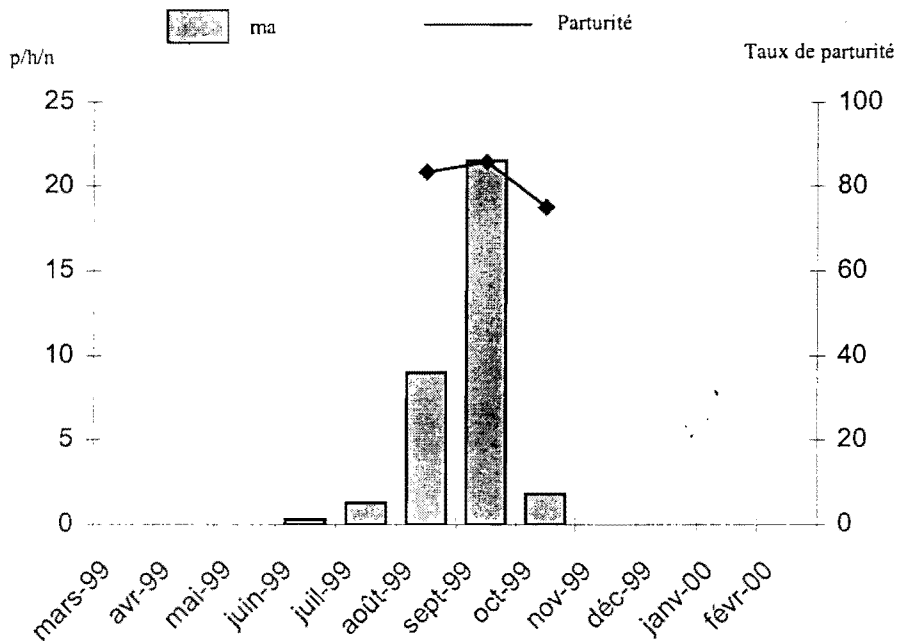


Figure 7b: Variations mensuelles de la densité agressive (ma) et de la parturité d'*Anopheles gambiae* sl à Kuinima

p/h/n= piqûres/homme/nuit

Tableau 8: Taux de parturité de la population anophélienne circulant à Bobo-Dioulasso de Mars 1999-Février 2000

		INTERIEUR					EXTERIEUR				
Moustiques	Quartier	P= nombre de moustiques pares	B= P+N	TP= P/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2	p	P= nombre de moustiques pares	B= P+N	TP= P/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2	p
<i>Anopheles gambiae s.l</i>	Dsso ba	63	77	81,8 (73,2-90,4)	0,09	0,76	74	93	79,6 (71,4-87,8)	0,09	0,76
	Kuinima	68	85	80 (71,5-88,5)			52	67	77,6 (67,6-87,6)		

P= femelles pares

N= femelles nullipares

TP= Taux de parturité

Tableau 9: Indice sporozoïtique (IS) de la population anophélienne circulant à Bobo-Dioulasso de Mars 1999-Février 2000

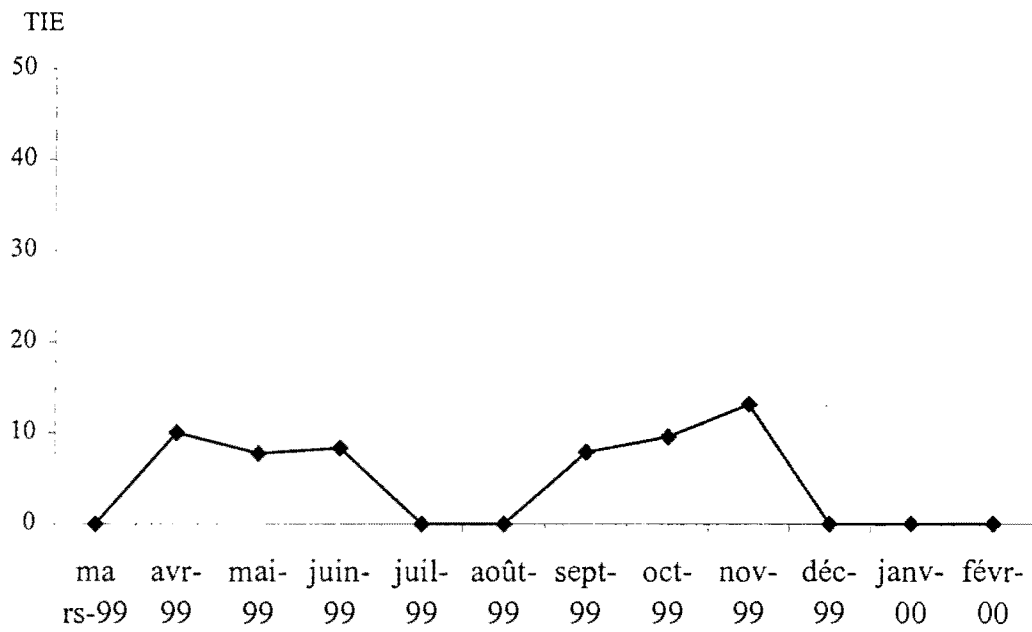
Moustiques	Villages	INTERIEUR				EXTERIEUR			
		n=nombre de moustiques CS-positifs	B=P+N	IS=n/Bx100 intervalle de confiance à 95%	χ^2 p	n=nombre de moustiques CS-positifs	B=P+N	IS=n/Bx100 intervalle de confiance à 95%	χ^{2*} p
<i>Anopheles gambiae s.l</i>	Dsso ba	6	77	7,8 (1,9-13,7)	0,03 0,860	6	93	6,5 (1,5-11,5)	0,04 0,840
	Kuinima	6	85	7,1 (1,7-12,5)		4	67	6 (1,7-14,6)	

IS=indice sporozoïtique

B=P+N:somme des femelles pares et nullipares, seules les femelles pares ont été testées par ELISA

*Chi carré corrigé de Yates en raison des effectifs faibles

Dioulassoba



Kuinima

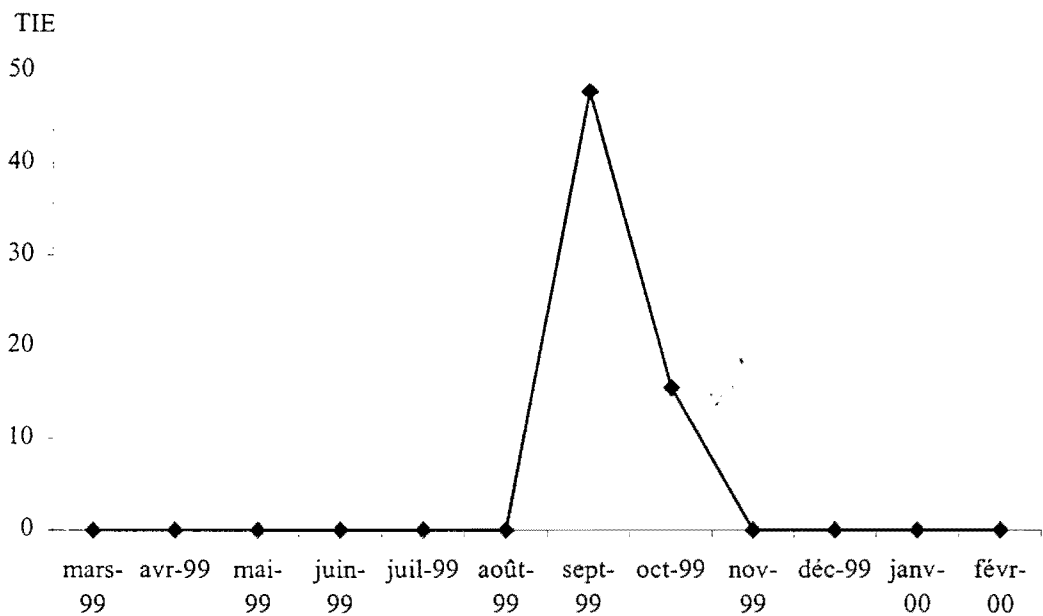


Figure 8: Variation mensuelle du taux d'inoculation entomologique (TIE) à l'intérieur des maisons pour un homme non protégé de Mars-99 à Février-00 à Bobo-Dioulasso

3.2.3 La transmission dans les villages de savane arborée : Léna et Toussiana

Les zones de savane soudanienne dont font partie nos sites d'étude sont caractérisées par l'alternance d'une saison sèche et d'une saison pluvieuse dont la longueur détermine le cycle de la transmission. Dans une région donnée où les paramètres éco-géographiques sont similaires, les niveaux de transmission peuvent varier du simple au double, par conséquent les généralisations doivent être faites avec la plus grande prudence. Treize années après la dernière étude sur le paludisme aux environs de la ville de Bobo-Dioulasso (Robert *et al.*, 1986), nous réactualisons les données sur la transmission dans deux villages caractérisés l'un (Léna) par la présence d'un marigot sub-permanent et l'autre (Toussiana) par des flaques temporaires liées aux précipitations.

3.2.3.1 La composition de la faune culicidienne

Au total 3 600 piqûres de moustiques sont reçues par homme et par an dans la localité de Léna contre 2 200 à Toussiana (tableau 10) à l'intérieur des habitations. *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* sont majoritaires avec respectivement 52% et 18%. Un nombre sensiblement égal de piqûres est reçu à l'extérieur des habitations. À l'inverse du milieu urbain où l'écologie leur est favorable, les *Culicinae* sont faiblement représentés ici avec seulement 26,90% des piqûres.

Tableau 10 : Nombre total de piqûres reçues par homme à Léna et à Toussiana de Mars 1999 à Février 2000.

Quartiers		<i>ANOPHELINAE</i>			<i>CULICINAE</i>	TOTAL
		<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>An. funestus</i>	Autres		
Léna	Intérieur	1 785	936	129	722	3 572
	Extérieur	1 911	791	237	1 125	4 064
Toussiana	Intérieur	1 220	116	19	824	2 179
	Extérieur	1 184	100	108	702	2 094

3.2.3.2 Densités vectorielles

La densité vectorielle moyenne est de 7,5 p/h/n à Léna et de 3,6 p/h/n à Toussiana réparties entre trois espèces. *An. gambiae* s.l. est majoritairement représenté avec 65,3% des densités à Léna et 69,4% à Toussiana (tableau 11). La présence du marigot sub-permanent à Léna favorise le développement d'*An. funestus* dont la densité est 8 fois supérieure à celle de Toussiana. *An. nili* est très faiblement représenté dans les deux localités si bien qu'il n'a pas été pris en compte dans l'évaluation des paramètres de la transmission. D'une manière générale les densités vectorielles observées à Léna sont 2 fois supérieures à celles de Toussiana. Des densités comparables sont obtenues à l'extérieur des habitations pour les trois espèces, ce qui signifie que les vecteurs dans ce milieu piquent aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations.

Tableau 11 : Densités vectorielles moyennes par habitant et par nuit à Léna et à Toussiana Mars 1999 à Février 2000

		Intérieur	Extérieur
Léna	<i>An. gambiae</i> s.l.	4,90	5,20
	<i>An. funestus</i>	2,50	2,10
	<i>An. nili</i>	0,10	0,10
Toussiana	<i>An. gambiae</i> s.l.	3,30	3,20
	<i>An. funestus</i>	0,30	0,30
	<i>An. nili</i>	0	0,10

3.2.3.3 Variation mensuelle des densités agressives

La courbe de la distribution mensuelle des densités d'*An. gambiae* s.l. est unimodale avec un pic de 24 piqûres/homme/nuit en septembre à Léna et 23 piqûres à Toussiana (figure 9). La quasi-totalité des moustiques a été collectée pendant la saison des pluies entre juillet et octobre avec 97% des effectifs à Léna et 98% à Toussiana. La présence du marigot sub-permanent à Léna offre une possibilité de reproduction à *An.*

gambiae en dehors de la saison des pluies et permet donc de capturer les moustiques jusqu'en janvier.

Quant à *An. funestus*, les effectifs sont nettement moindres et les densités sont pratiquement nulles de janvier jusqu'en juillet. Le pic de densité est observé à Léna en octobre avec 11 piqûres/homme/nuit et la courbe de distribution est légèrement décalée par rapport à celle d'*An. gambiae* s.l. (figure 10). Ce moustique colonise des gîtes plus profonds bordés de végétation aquatique que le marigot peut facilement fournir. À Toussiana l'écologie est peu favorable au développement d'*An. funestus* d'où les densités plus faibles oscillant entre 0 et 2 piqûres/homme/nuit.

3.2.3.4 Variation mensuelle du taux de parturité

Au total 1 165 femelles d'*An. gambiae* s.l. ont été disséquées pour la mesure de l'âge physiologique. Le taux de parturité moyen était comparable dans les deux sites d'étude tant à l'intérieur ($\chi^2=0,19$ et $p=0,66$ tableau 12) qu'à l'extérieur des habitations ($\chi^2=0,32$ et $p=0,57$). La population anophélienne est vieillissante à la fin de la saison des pluies quand les gîtes larvaires diminuent et la productivité des néonates baisse.

Quant à *An. funestus*, seulement 45 femelles ont pu être disséquées, toutes à Léna. On y observe un taux de parturité plus élevé chez les moustiques capturés à l'intérieur, mais compte tenu des effectifs réduits, la différence observée entre les deux populations n'est pas significative ($\chi^2=1,57$ et $p=0,21$).

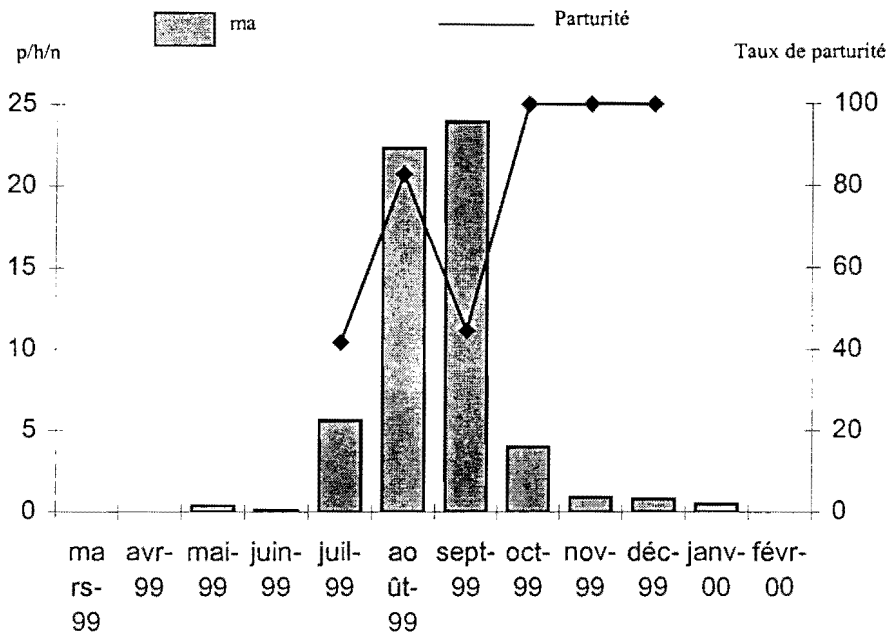


Figure 9a: Variations mensuelles de la densité agressive (ma) et de la parturité d'*Anopheles gambiae* sl à Léna

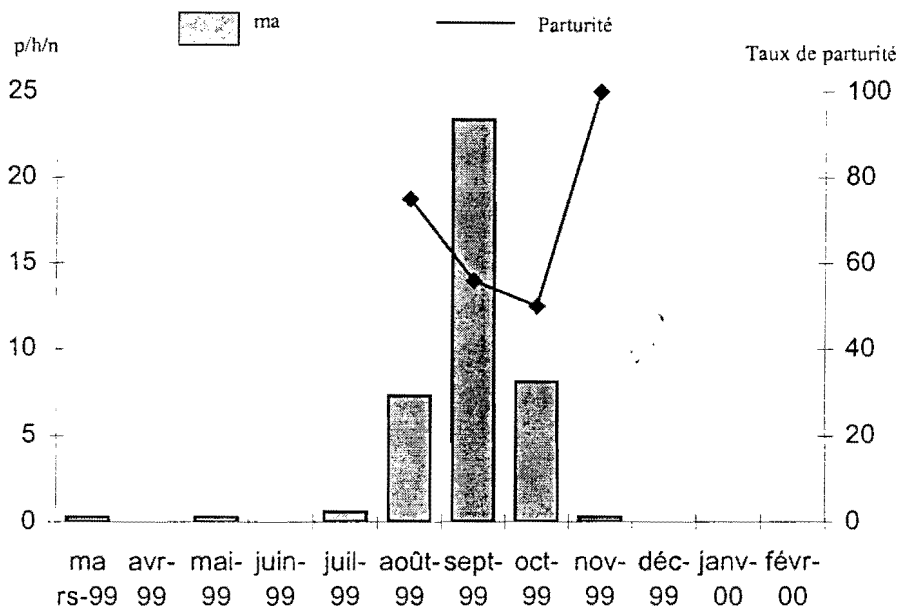


Figure 9b: Variations mensuelles de la densité agressive (ma) et de la parturité d'*Anopheles gambiae* sl à Toussiana

p/h/n= piqûres/homme/nuit

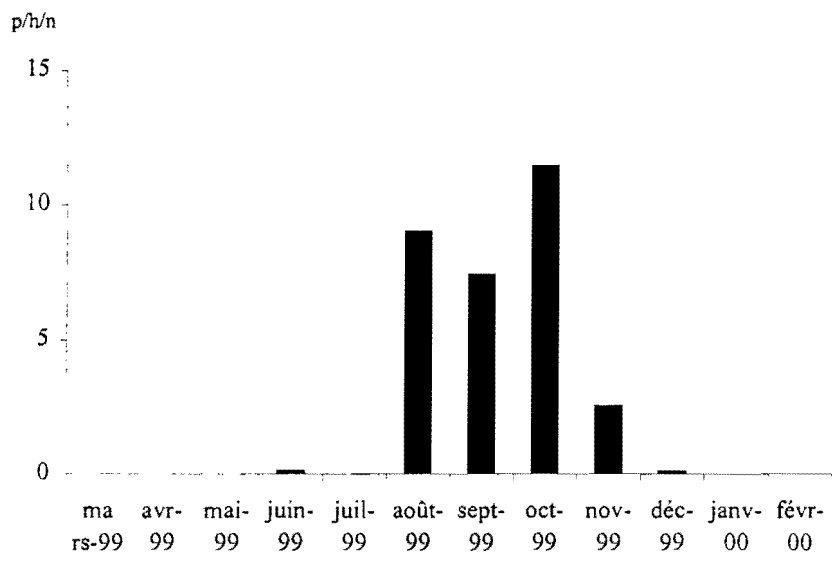


Figure 10a: Variation mensuelle de la densité agressive (ma) d'*Anopheles funestus* à Léna

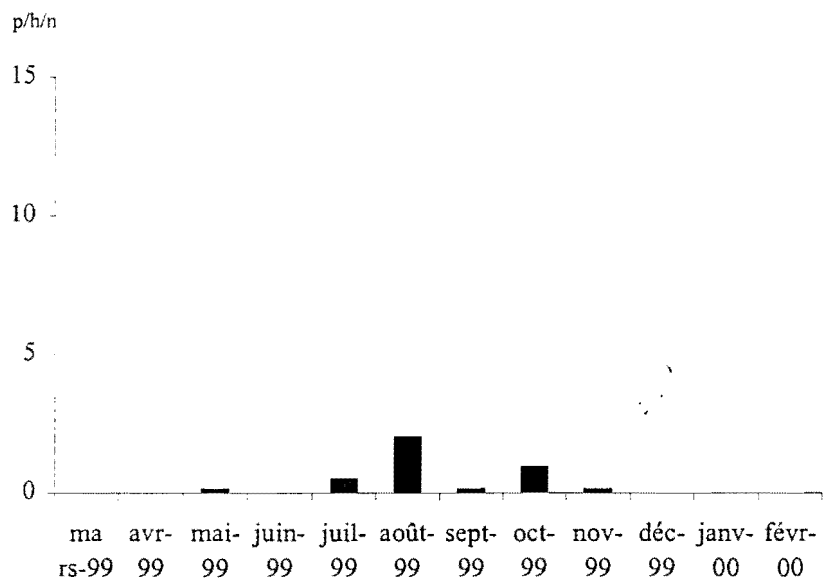


Figure 10b: Variation mensuelle de la densité agressive (ma) d'*Anopheles funestus* à Toussiana

p/h/n= piqûres/homme/nuit

Tableau 12: Taux de parturité de la population anophélienne circulant à Léna et Toussiana de Mars 1999-Février 2000

		INTERIEUR					EXTERIEUR				
Moustiques	Villages	P= nombre de moustiques pares	B=P+N	TP= P/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2	p	P= nombre de moustiques pares	B=P+N	TP= P/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2	p
<i>Anopheles gambiae s.l</i>	Léna	219	366	59,8 (54,8-64,9)	0,19	0,66	207	333	62,2 (57,0-67,4)	0,32	0,57
	Toussiana	154	265	58,1 (52,2-64,0)			120	201	59,7 (52,9-66,5)		
<i>Anopheles funestus</i>	Léna	23	31	74,2 (55,4-88,1)	-	-	7	14	50 (23,0-77,0)	-	-
	Toussiana	-	-	-			-	-	-		

P= femelles pares

N= femelles nullipares

TP=Taux de Parturité

3.2.3.5 Indice sporozoïtique

Sur les 1 165 femelles d'*An. gambiae* s.l. sur lesquelles on a recherché les sporozoïtes, 65 ont été trouvées positives à *P. falciparum* donnant un indice sporozoïtique moyen comparable dans les deux sites d'étude ($\chi^2=1,01$ et $p=0,32$ tableau 13) à l'intérieur des habitations. Des valeurs sensiblement égales ont été obtenues chez les moustiques collectés à l'extérieur ($\chi^2=3,22$ et $p=0,07$).

Le taux d'infestation moyen observé chez *An. funestus* est très élevé avec 16,1% des femelles capturées à l'intérieur des maisons et 7,1% pour celles capturées à l'extérieur. Globalement la différence d'infestation constatée entre *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* n'est pas significative ($\chi^2=3,42$ et $p=0,06$).

3.2.3.6 Taux d'inoculation entomologique

Au total 192 piqûres infectantes par homme et par an sont reçues à Léna à l'intérieur des maisons. Cette transmission est assurée par deux vecteurs à savoir *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* qui inoculent respectivement 62% et 38% des piqûres. Le taux d'inoculation entomologique annuel est de 117 piqûres infectantes à l'extérieur des maisons et *An. funestus* n'y participe plus que pour 4%. Seul *An. gambiae* s.l. assure la transmission à Toussiana, la participation d'*An. funestus* étant négligeable. Au total 60 pi/h/an sont reçues dans ce village à l'intérieur des habitations contre 47 à l'extérieur. La transmission est étalée sur six mois de juillet-décembre à Léna et seulement sur 4 mois d'août-octobre à Toussiana (figure 11).

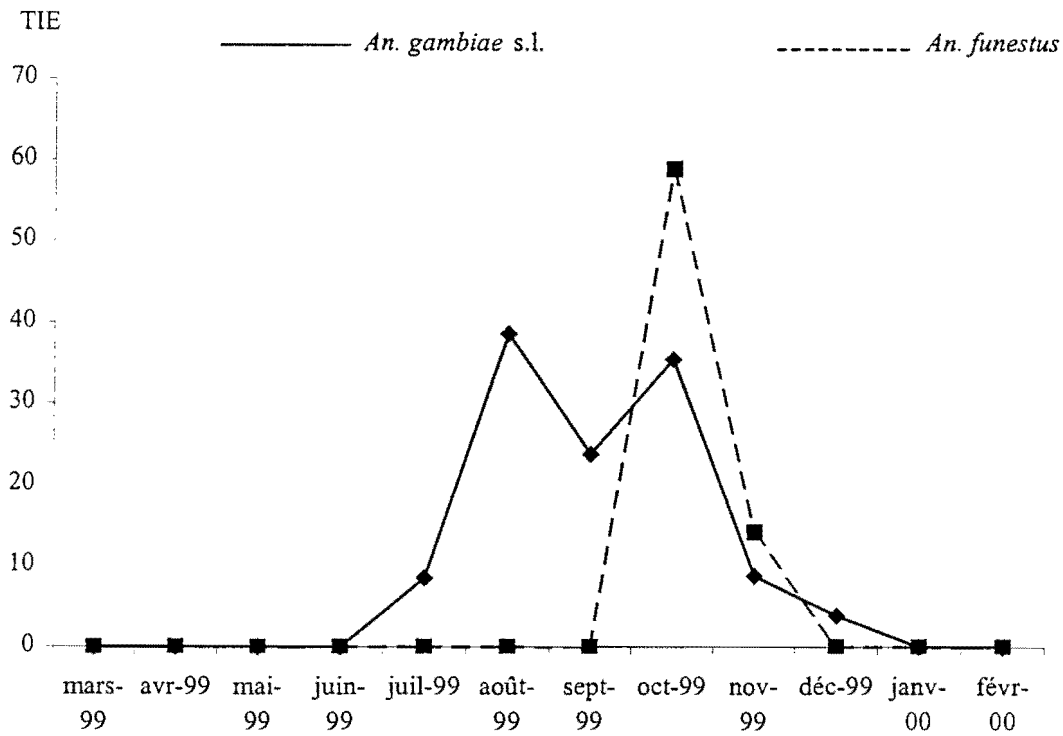
**Tableau 13: Indice sporozoïtique (IS) de la population anophélienne circulant à Léna,
Toussiana de Mars 1999-Février 2000**

Moustiques	Villages	INTERIEUR				EXTERIEUR			
		n= nombre de moustiques CS-positifs	B=P+N	IS= n/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2 p	n= nombre de moustiques CS-positifs	B=P+N	IS= n/B x 100 intervalle de confiance à 95%	χ^2 p
<i>Anopheles gambiae s.l</i>	Léna	25	366	6,8 (4,3-9,4)	1,01 0,320	19	333	5,7 (3,2-8,2)	3,22 0,07
	Toussiana	13	265	4,9 (2,3-7,5)		8	201	4	
<i>Anopheles funestus</i>	Léna	5	31	16,1 (5,45-3,7)	- -	1	14	7,1 (0,2-33,9)	- -
	Toussiana	-	-	-		-	-	-	

IS=indice sporozoïtique

B=P+N:somme des femelles pares et nullipares, seules les femelles pares ont été testées par ELISA

Léna



Toussiana

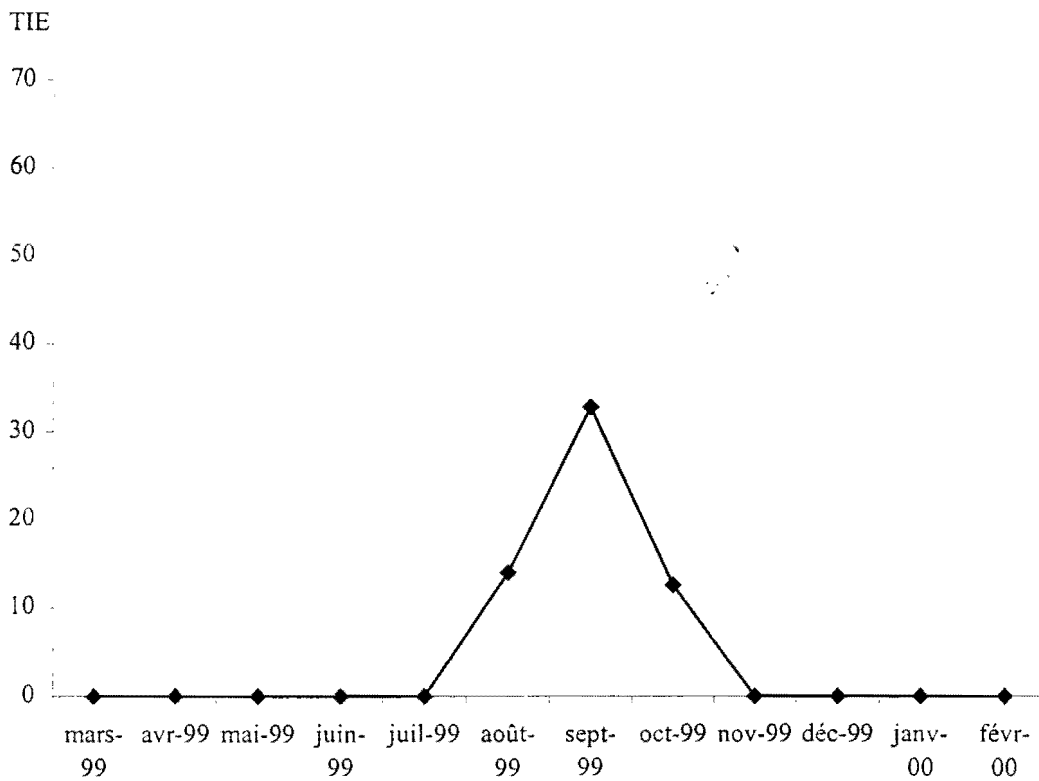


Figure 11: Variation mensuelle du taux d'inoculation entomologique (TIE) à l'intérieur des maisons pour un homme non protégé de Mars-99 à Février 00 à Léna et à Toussiana

3.2.4 Le suivi de la transmission à Léna sur trois années consécutives

La transmission du paludisme à Léna et la dynamique des espèces vectrices sont des paramètres qui sont fortement liés à l'écologie du milieu et à la pluviométrie. L'étude menée de Mars 99 à Février 00 a révélé la présence d'*An. gambiae* s.l. et d'*An. funestus* comme vecteurs essentiels dans ce village. Après la première année de travail, nous avons poursuivi nos études à Léna en raison de la participation importante d'*An. funestus* à la transmission du paludisme. Ce moustique a été très peu étudié au Burkina Faso, même s'il y occupe une place importante. Nous avons voulu comprendre la dynamique de cette espèce et son interaction avec *An. gambiae* s.l. dans un milieu favorable au développement de ces deux moustiques. C'est ainsi que les captures des moustiques se sont déroulées sur trois ans de 1999 à 2001. Si la première année d'étude s'est déroulée sur 12 mois, les deux autres en revanche ne se sont étalées que sur six mois chacune (de juillet à décembre), période en dehors de laquelle, les moustiques sont rares.

3.2.4.1 Composition de la faune vectrice

Trois vecteurs ont pu être identifiés tout au long de cette étude en des proportions fortement variables d'une année à l'autre. Au total 8 300 moustiques ont été capturés pendant les trois ans du suivi. *An. funestus* représente 59,9% de l'effectif contre 38,1% pour *An. gambiae* s.l. et seulement 2% pour *An. nili* (figure 12). *An. gambiae* s.l. représente cependant 65% des effectifs en 1999 contre seulement 34% pour *An. funestus*. À l'inverse, en 2000 et 2001, *An. funestus* est largement dominant avec respectivement 73% et 71% des effectifs contre 25% et 26% pour *An. gambiae* s.l.. *An. nili* reste numériquement faible et sa participation est négligeable dans la transmission du paludisme. L'effectif global capturé de juillet-décembre pendant les trois ans de suivi n'a pas fortement varié d'une année à une autre (2 720 en 1999, 2 869 en 2000 et 2 662 en 2001).

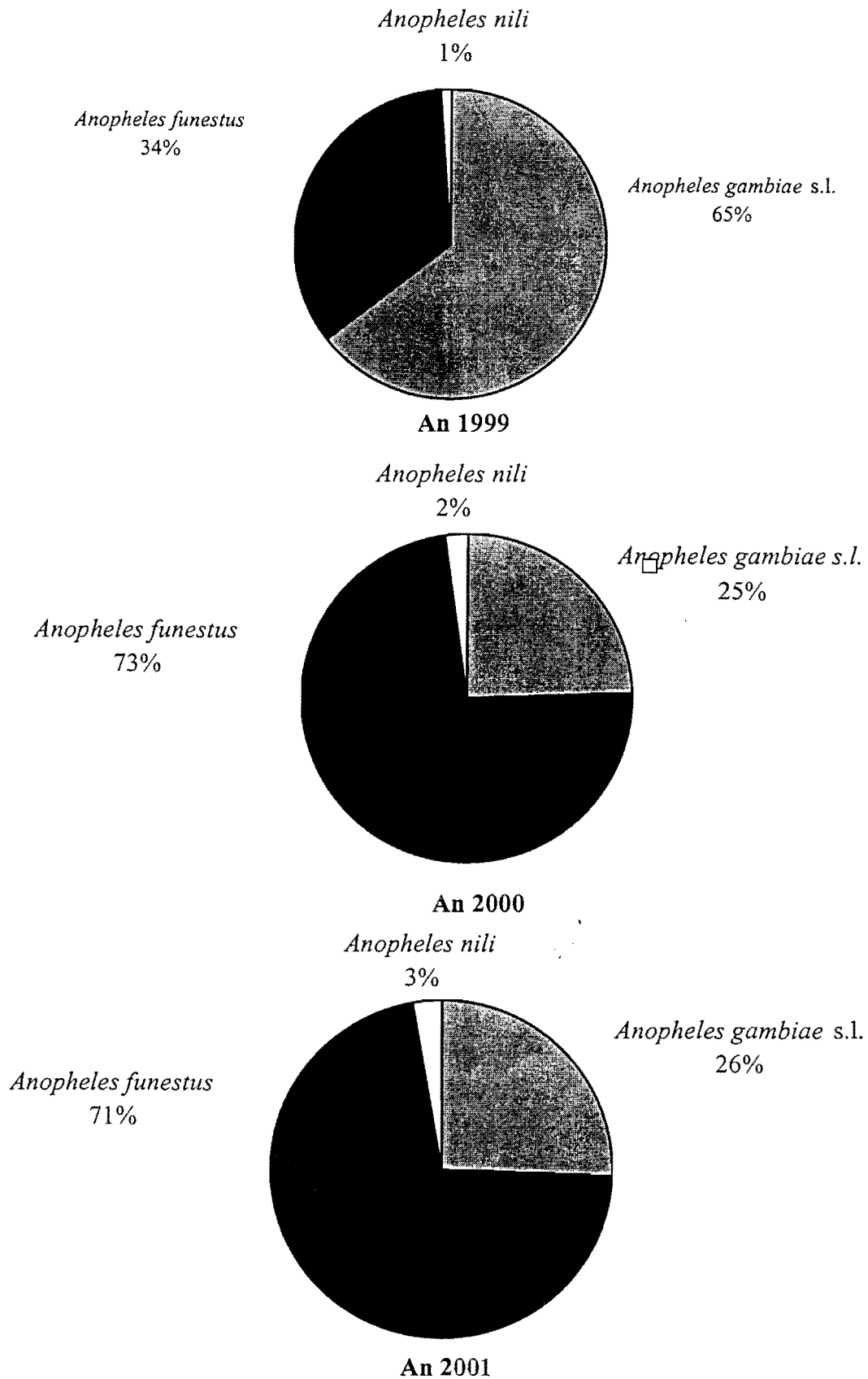


Figure 12: Répartition des espèces anophéliennes vectrices capturées à l'intérieur des maisons de 1999-2001 à Léna

3.2.4.2 Taux d'endophagie des trois espèces vectrices

Dans l'ensemble *An. funestus* et *An. gambiae* s.l. ont manifesté une tendance à l'endophagie, variable d'une année à une autre et plus marquée dans tous les cas chez *An. funestus* (tableau 14). Quant à *An. nili*, il a un comportement largement exophage avec 60% des effectifs capturés à l'extérieur des habitations.

Tableau 14 : Taux d'endophagie de trois espèces anophéliennes à Léna de 1999-2001

Année	Moustiques	Intérieur		Extérieur	
		Nombre	%	Nombre	%
1999	<i>An. gambiae</i> s.l.	459	48,4	489	51,6
	<i>An. funestus</i>	243	54,2	205	45,8
	<i>An. nili</i>	9	36,0	16	64,0
2000	<i>An. gambiae</i> s.l.	184	52,3	168	47,7
	<i>An. funestus</i>	555	57,6	409	42,4
	<i>An. nili</i>	16	48,5	17	51,5
2001	<i>An. gambiae</i> s.l.	178	53,6	154	46,4
	<i>An. funestus</i>	500	67,8	237	32,2
	<i>An. nili</i>	19	36,5	33	63,5

Le nombre de séances de capture reste identique pour les trois ans = 48 séances de capture étalées sur six mois

3.2.4.3 Variation mensuelle des densités vectorielles

Les gîtes de reproduction ne sont véritablement productifs que pendant cinq mois, de juillet à novembre. *An. gambiae* s.l. prédomine durant la première année de capture avec des effectifs supérieurs à ceux d'*An. funestus* de juillet à septembre et le pic d'*An. funestus* est observé en octobre avec 11 piqûres/homme/nuît (figure 13). *An. gambiae* s.l. a été observé jusqu'en décembre la première année. Les deux années suivantes, *An. funestus* est observé à partir du mois d'août avec un pic de densité nettement dominant en septembre (45 p/h/n en 2000 et 29 p/h/n en 2001). Les variations mensuelles des densités agressives

d'*An. gambiae* s.l. sont très similaires en 2000 et 2001 avec un maximum de 10 p/h/n contre 24 p/h/n en 1999. Il a pourtant plu pratiquement les mêmes quantités d'eau pendant les trois années avec un léger avantage en 2000 où on enregistrait 1 171 mm. Le graphique de la répartition mensuelle de la pluviométrie sur les trois années montre une distribution groupée autour des mois de juin-septembre avec 71% du volume total enregistré en 1999 contre 84% en 2000 et 79% en 2001 (figure 14). La variation de la densité agressive des deux espèces d'une année à l'autre n'est pas clairement expliquée, et tiendrait en partie à la répartition de la pluviométrie, à la disponibilité des gîtes de reproduction pour les deux espèces et la variation des facteurs climatiques (hygrométrie, température) qui n'ont hélas pas été mesurés. Le total des effectifs capturés ne varie pas énormément d'une année à une autre, mais plutôt les effectifs relatifs de chaque espèce.

3.2.4.4 Variation annuelle du taux d'inoculation entomologique

Les taux d'inoculation entomologiques obtenus à l'intérieur des habitations sont similaires pendant les première et troisième années, mais accuse une légère baisse la deuxième année. Globalement, un homme reçoit entre 171 à 192 piqûres infectantes/homme/an (tableau 15). À l'extérieur, la valeur du TIE est plus basse et enregistre son pic en 2000 avec 123 pi/h/an contre seulement 98 pi/h/an en 2001, son minimum. La participation de chacune des deux espèces à la transmission varie énormément durant les trois ans. *An. gambiae* s.l. assure 62% de la transmission la première année. Pour les deux années suivantes, *An. funestus* occupe le premier rang avec 50,3% et 64,4% les deuxième et troisième années. Ce renversement de situation fait suite à une augmentation consécutive de la densité agressive de cette espèce les deux dernières années de suivi. Cela se reflète sur l'âge physiologique de la population, qui, de 73,3% la première année, est passé par son niveau le plus bas en 2000 avec 62%, année de très forte densité. Le taux d'infestation à *P. falciparum* en a été modulé en conséquence avec seulement 5% d'infestation en 2000 contre 16% en 1999. Malgré sa forte densité en 2000 et 2001, *An. funestus* ne participe que pour moitié à la transmission à l'extérieur des habitations où le taux de parturité est relativement plus faible.

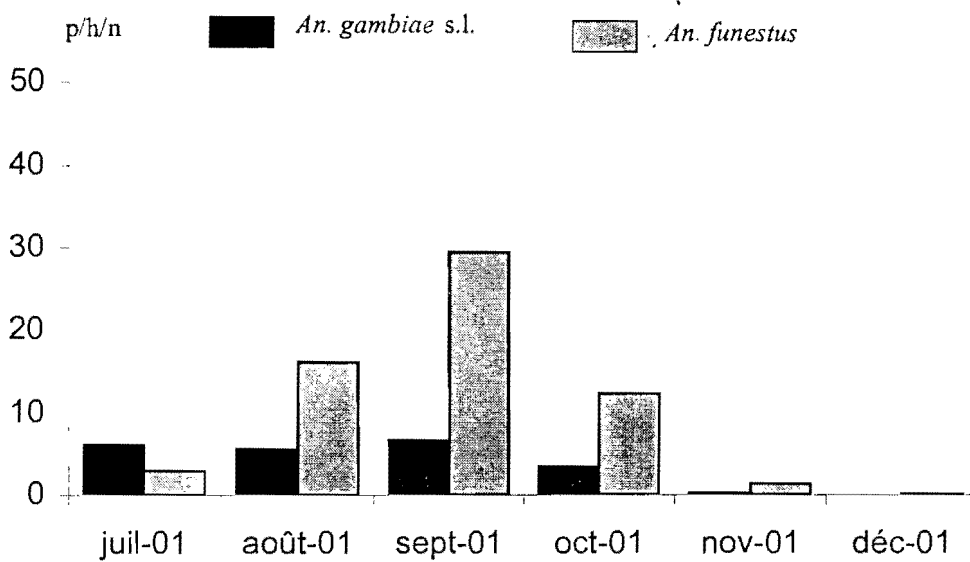
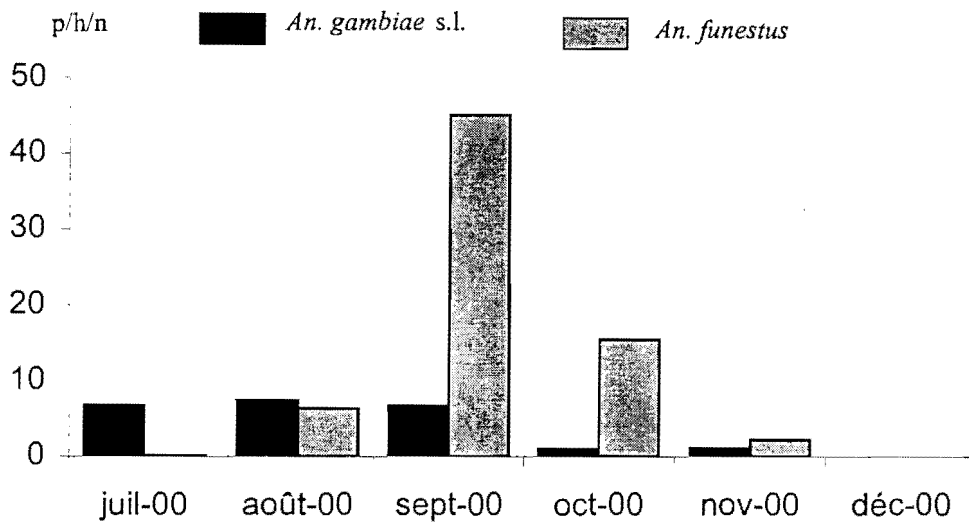
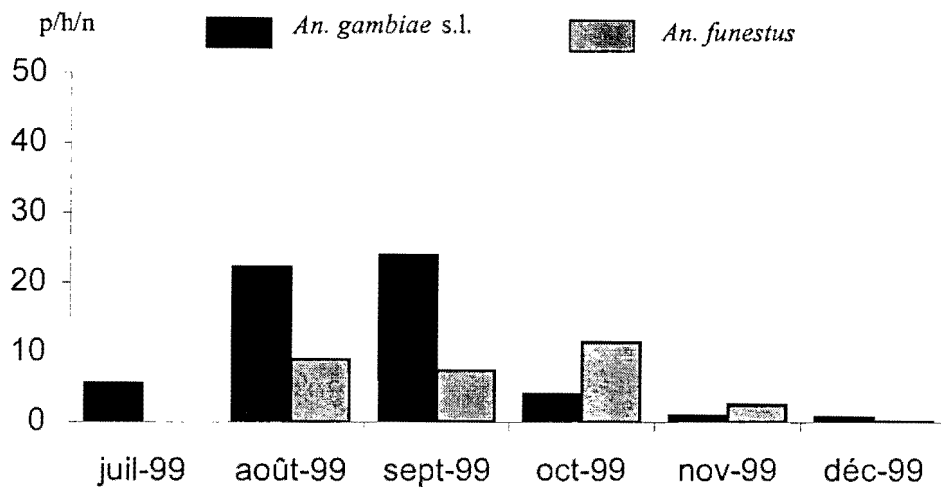


Figure 13: Variation mensuelle de la densité agressive (ma) à l'intérieur des maisons de 1999-2001 à Léna

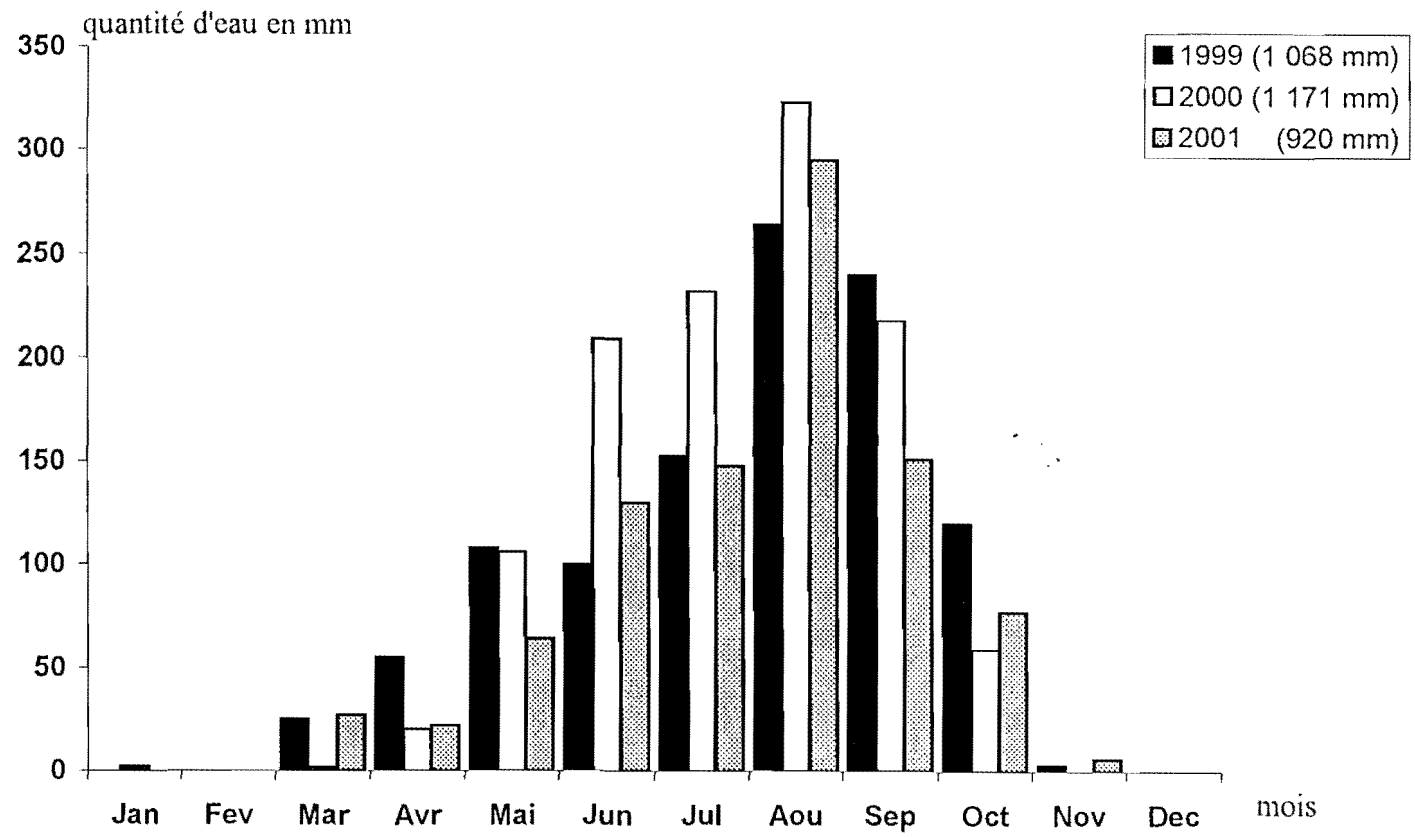


Figure 14: Pluviométrie annuelle enregistrée dans la province du Houet de 1999-2001

Tableau 15: Taux d'Inoculation Entomologique (TIE) annuel à Léna de 1999 à 2001

Année	Moustiques	INTERIEUR				EXTERIEUR			
		TP	IS	TIE	TOTAL	TP	IS	*TIE	TOTAL
1999	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	59,7%	6,8%	119 62,0%	192	62,1%	5,7%	112 96,0%	117
	<i>Anopheles funestus</i>	73,3%	16,1%	73 38,0%		50,0%	7,1%	5 4,0%	
2000	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	74,6%	12,0%	85 49,7%	171	71,0%	10,9%	70 56,9%	123
	<i>Anopheles funestus</i>	62,1%	4,8%	86 50,3%		59,6%	3,8%	53 43,1%	
2001	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	82,8%	9,8%	68 35,6%	191	74,5%	7,9%	47 48,0%	98
	<i>Anopheles funestus</i>	83,5%	6,5%	123 64,4%		77,1%	5,9%	51 52,0%	

*TIE: taux d'inoculation entomologique et les pourcentages se rapportent à la participation de chaque espèce à la transmission

TP: taux de parturité

IS: indice sporozoïtique

3.2.5 Discussion

Deux espèces vectrices majeures assurent la transmission du paludisme dans notre région d'étude avec une dynamique saisonnière marquée. *An. gambiae* s.l. est quasiment le seul vecteur dans les localités urbaine de Bobo-Dioulasso et rurale de Toussiana, alors qu'il assume la transmission conjointement avec *An. funestus* dans la zone rizicole de la Vallée du Kou et la zone rurale de Léna. Le niveau et la dynamique de la transmission du paludisme sont fortement modulés par les caractéristiques écologiques des différents sites d'étude.

A la Vallée du Kou, l'implantation du périmètre rizicole a entraîné de profondes modifications de l'habitat avec la création de nouveaux types de gîtes larvaires. En effet, aux gîtes naturels rencontrés dans les zones rurales classiques, s'ajoutent les casiers rizicoles et l'une des premières conséquences de cette modification est l'augmentation significative des densités agressives de la population vectrice. Ces densités sont fortement corrélées aux cycles du riz dont les différentes phases ont un impact sur le développement larvaire de la faune anophélienne. Plusieurs études en milieu rizicole ont montré une succession des différentes espèces anophéliennes de la mise en eau des parcelles à la récolte du riz (Snow, 1983 ; Robert *et al.*, 1988 ; Doannio *et al.*, 2002). *An. gambiae* s.l. domine de la mise en eau des parcelles au repiquage. Sa densité décline avec la réduction de l'ensoleillement au moment de la montaison du riz et elle est progressivement remplacée par *An. pharoensis* qui prédominera jusqu'au stade épiaison. La cause du déclin de cette dernière espèce n'est pas clairement identifiée, mais tiendrait à la modification du pH des gîtes larvaires (Robert *et al.*, 1988). *An. coustani* lui succède avec une réussite certaine pendant la brève période de maturité du riz et la récolte. Comparé à la zone rurale classique, le niveau de transmission relevé à la Vallée du Kou est cinq fois plus important mais cette augmentation est largement en dessous du rapport des densités vectorielles entre les deux milieux écologiques, rapport qui est de l'ordre de 19 fois. Il s'en suit donc que l'augmentation de la transmission n'est pas proportionnelle à celle de la densité vectorielle. L'implantation des périmètres irrigués pour la riziculture n'entraîne pas nécessairement une aggravation locale du paludisme (Robert *et al.*, 1985 ; Carnevale et Robert, 1987 ;

Carnevale *et al.*, 1999) notamment dans les zones de paludisme stable. La situation est par contre différente dans les zones de paludisme instable où la transmission est faible et où il a été montré que la riziculture pouvait conduire à une aggravation du paludisme (Coosemans, 1985 ; Laventure *et al.*, 1996).

Même si l'implantation de la riziculture à la Vallée du Kou, n'a pas conduit à une aggravation démesurée du risque palustre, on constate néanmoins que le niveau de transmission enregistré dans cette étude est 10 fois supérieur à celui qui a été relevé par une étude conduite dans les mêmes sites dans les années 80 (Robert *et al.*, 1985). Plusieurs raisons peuvent en être la cause. On assiste à un accroissement des densités vectorielles et des indices sporozoïtiques, une transmission plus longue à laquelle *An. funestus* joue un rôle plus important. Cela résulte d'une mauvaise organisation de la riziculture en terme de calendrier, de la gestion de l'eau et de l'entretien des canaux d'irrigation dont le dysfonctionnement profite à *An. funestus*. Ce moustique se développerait alors dans les canaux d'irrigation en terre battue, mal entretenus. La désynchronisation des travaux agricoles, avec des casiers rizicoles à différents stades de développement, permet le maintien de gîtes larvaires quasi-permanents pour *An. gambiae*. Au plan de la méthodologie, l'échantillonnage de la population vectrice au cours des deux études (Robert *et al.*, 1985 et la nôtre) reste identique mais les techniques de traitement des moustiques pour l'évaluation du taux d'infestation diffère. L'indice sporozoïtique obtenu dans notre étude (méthode ELISA) est sept fois supérieur à celui de l'étude précédente qui a utilisé l'observation directe des glandes salivaires. Une étude réalisée au Cameroun a montré que l'indice d'infestation obtenu par la méthode ELISA est 1,1-2 fois supérieur à celui de la dissection des glandes salivaires (Fontenille *et al.*, 2001). Cela n'explique que partiellement les différences observées. Des études devraient être menées afin de vérifier d'autres facteurs tel que l'anthropophilie des vecteurs que les auteurs de l'étude de 1985 jugeaient particulièrement basse. Cela était probablement lié à l'usage généralisé des moustiquaires et à un accès facile des moustiques aux hôtes alternatifs, tels que bœufs et moutons dont les enclos sont à proximité des maisons. De nos jours, bien que les moustiquaires existent, elles sont en très mauvais état et ne sont pas convenablement

utilisées (Toé, communication personnelle). Un autre élément important à prendre en compte dans l'augmentation de la transmission est la taille du réservoir humain de parasite dû à la chloroquinorésistance plus importante au moment de notre étude. Les indices gamétocytiques des habitants des villages rizières étaient particulièrement bas en 1985, comparés à ceux des villages environnant de savane (Gazin *et al.*, 1985). Il apparaît que le réservoir de parasites infectant pour les anophèles était réduit dans ce milieu. De nos jours le niveau de la chloroquinorésistance est plus élevé au Burkina Faso (Ouédraogo *et al.*, 1990 ; Guiguemdé *et al.*, 1994 ; Ouédraogo *et al.*, 1998). Ces auteurs ont noté une augmentation progressive de la chloroquinorésistance tant au niveau parasitologique que clinique au Burkina Faso de 1980 à 1990 où on a atteint 15% de résistance clinique. Cependant, ce niveau chutait à 5% une année plus tard. Il reste donc entendu que, dépendant du lieu et de l'année, la chloroquinorésistance peut fortement varier. Par ailleurs une étude d'évaluation de l'impact de la chloroquine en traitement prophylactique et thérapeutique des accès fébriles sur la transmission du paludisme a donné des résultats ambigus. Néanmoins, l'auteur (Robert, 1989) souligne qu'il y a une tendance à la diminution de la transmission due à la réduction du « réservoir de parasite » infectant pour les vecteurs. Notons enfin pour terminer qu'une étude de la transmission réalisée récemment en Côte d'Ivoire dans la plaine rizicole de Kafiné a relevé un niveau de transmission similaire au nôtre (Doannio *et al.*, 2002).

Bien que n'ayant pas déterminé spécifiquement la part de la transmission assurée par les différentes espèces du complexe *An. gambiae*, nous avons des preuves indirectes (Robert, 1989) que *An. gambiae* forme M assure au sein d'*An. gambiae* s.s. la quasi-totalité de la transmission à VK5 (quartier central). *An. gambiae* forme S intervient en association avec la forme M à VK7 (quartier périphérique). *An. arabiensis* est très faiblement représentée. Ceci a été confirmé par nos résultats obtenus dans le cadre de l'étude sur la résistance (cf chapitre IV).

En milieu urbain, *An. gambiae* s.l. est le vecteur majeur du paludisme. La forme moléculaire S d'*An. gambiae* s.s. serait dominante (cf chapitre IV sur la résistance). La

transmission est faible au regard de ce qui est observé à la Vallée du Kou, mais reste comparable à la situation de Toussiana. Les deux quartiers, central et périphérique, connaissent le même niveau de transmission, mais sa répartition dans l'année est complètement différente. Le quartier Kuinima périphérique a le même profil que les villages classiques de savane avec une transmission réduite à la saison de pluies alors qu'à Dioulassoba (central) elle est présente toute l'année. La présence du cours d'eau permanent dans ce quartier offre des gîtes de reproduction en toute saison à *An. gambiae* et explique cette transmission longue. En général le phénomène de l'urbanisation est préjudiciable à une transmission intense car la typologie des gîtes inhérente aux activités domestiques est défavorable à la reproduction des vecteurs du paludisme (Mouchet *et al.*, 1993 ; Trape et Zoulani, 1987). La situation est par contre différente dans les zones urbaines où la présence de cours d'eau favorise la reproduction d'*An. gambiae* s.l. C'est ainsi qu'une transmission intense a été relevée dans la ville de Cotonou au Bénin où la présence de mangroves offre des gîtes de reproduction à *An. gambiae* s.l. (Chippaux et Akogbeto, 1991) tout au long de l'année. Des auteurs ont également observé une augmentation des indices parasitaires de la périphérie vers le centre dans la ville de Niamey (Julvez *et al.*, 1997) où le fleuve Niger forme de multiples flaques résiduelles lors de la décrue. Ces flaques constituent des gîtes de choix pour *An. gambiae* s.l. et sont à l'origine d'une forte transmission du paludisme. Contrairement à nos résultats, une étude de la transmission conduite dans les années 80 à Bobo-Dioulasso avait donné des niveaux de transmission à la limite du décelable avec 1 piqûre infectante par homme, tous les sept ans au centre ville et 5 piqûres infectantes par an en périphérie (Robert *et al.*, 1986). Le niveau actuel de transmission enregistré dans notre étude est 400 fois plus élevé au centre ville et 17 fois plus élevé en périphérie. Cela repose à la fois sur une augmentation sensible de la densité agressive, du taux d'infestation et sur une longévité moyenne plus élevée. Signalons enfin qu'une étude conduite dans les années 60 à Bobo-Dioulasso par Coz et collaborateurs (1962) a relevé un indice d'infestation qui est 43 fois plus élevé que celui de l'étude réalisée en 1986 par Robert *et al.*, (1986).

La transmission en milieu rural de Toussiana et de Léna connaît un rythme et une intensité différents d'un village à l'autre. *An. gambiae* s.l. est le vecteur majeur à Toussiana alors qu'il est associé à *An. funestus* à Léna où on observe une succession des deux espèces. La transmission a un caractère saisonnier relié au rythme des pluies et fortement tributaire du réseau hydrographique localement présent de sorte qu'on peut passer du simple au triple d'un village à l'autre dans une même région (Hamon *et al.*, 1956). Robert *et al.*, (1985) ont enregistré une transmission de 2,5 fois supérieure entre deux villages aux environs de Bobo-Dioulasso conforme à nos données malgré la différence de méthodes utilisées pour déterminer les taux d'infestation. La différence observée entre les deux villages dans notre étude repose à la fois sur les densités vectorielles et une participation plus importante d'*An. funestus* dans la transmission. Par ailleurs la transmission ne dure que trois mois dans le village de Toussiana alors qu'elle s'étale sur six mois à Léna. Le milieu écologique avec présence d'un marigot sub-permanent à Léna favorise cette transmission plus longue en offrant différents types de gîtes larvaires au delà de la saison pluvieuse.

Un fait singulier observé dans cette localité de Léna est la forte variation de la densité agressive d'*An. funestus* durant les trois années successives de suivi entomologique. La densité agressive moyenne des deux espèces réunies reste comparable d'une année à l'autre, mais la participation respectivement de chacune des espèces à ces densités diffère largement. Fontenille *et al.*, (1997) ont observé un phénomène similaire au Sénégal. Cette forte variation dans la dynamique des deux espèces vectrices dans notre site d'étude pourrait s'expliquer par les précipitations particulièrement violentes en 2000 et 2001. Les fortes pluies ont dû lessiver les gîtes à *An. gambiae* s.l. au détriment des ceux d'*An. funestus*.

IV ETUDE DE LA RESISTANCE AUX INSECTICIDES

4.1 Présentation de l'étude

L'étude de la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT a été effectuée sur l'ensemble du territoire. Une enquête transversale pendant la saison des pluies de 1999 à 2001 dans 26 sites d'étude a permis dans un premier temps d'observer sa distribution géographique en fonction des différents contextes écologiques et climatiques (figure 15). L'étude s'est focalisée dans un deuxième temps dans la région Sud-Ouest du pays dans des sites cotonnier, rizicole, vivrier et urbain. Le choix de ces sites répond à des critères d'utilisation des insecticides pour combattre les ravageurs de cultures et les insectes nuisants. L'objectif étant de vérifier l'impact de ces traitements sur la sélection de la résistance chez *An. gambiae* s.l.. Au total onze sites d'étude ont été retenus dans cette région, mais seulement trois de ces sites ont fait l'objet d'investigations plus poussées pour suivre la dynamique spatiale et temporelle de la résistance. Les spécimens testés ont fait ultérieurement l'objet d'analyses moléculaires au laboratoire afin de déterminer la structure génétique des populations et la répartition géographique des mécanismes de résistance.

4.1.1 Les sites d'étude

L'aire cotonnière

Au cours des dix dernières années, la production cotonnière du Burkina Faso a atteint 206 660 tonnes de coton graine par an. L'essentiel de cette production est concentré sur la région Ouest du pays qui assure à elle seule 80% des tonnages de coton-graine commercialisés. Ce secteur géographique comprend plusieurs des localités de notre zone d'étude (figure 15). Cette aire s'étend sur 57 000 km² (20% du territoire national) et comptait en 1990 une population agricole d'environ 1 400 000 individus. Les dégâts occasionnés par les ravageurs sur le cotonnier sont extrêmement importants. En l'absence de traitement insecticide, les pertes de rendement au Burkina Faso peuvent atteindre localement 90% de la production certaines années et approchent 50% en moyenne sur les 7 dernières campagnes (Anonyme, 1997). Cette pression parasitaire explique que le coton

soit la culture qui à travers le monde, consomme la plus grosse quantité d'insecticides. Lors de la campagne agricole de 1996/97 au Burkina Faso, 820 000 litres d'insecticides ont été utilisés. La lutte contre les ravageurs du coton fait appel à une formulation binaire voire ternaire, c'est à dire une association de deux ou trois matières actives (pyréthrinoides et organophosphorés). Le but de cette association est non seulement d'accroître l'efficacité des traitements, mais aussi de retarder l'apparition de populations résistantes à ces insecticides qui, malheureusement, n'ont plus qu'une efficacité limitée sur les chenilles carpophages. Au Burkina Faso un calendrier de traitement insecticides du cotonnier est imposé aux paysans par l'organisme en charge de la production cotonnière (Société des Fibres et Textiles) et est en moyenne de six à huit traitements par campagne. Certains paysans peuvent dépasser ce nombre.

- Les périmètres irrigués

Les rizières occasionnent une pullulation de moustiques, en particulier des anophèles vecteurs du paludisme. Les traitements phytosanitaires dans ce secteur d'agriculture sont moins importants car les dégâts occasionnés par les parasites du riz sont limités. Les paysans appliquent les mêmes insecticides que ceux utilisés sur le coton, car nombreux sont ceux qui cultivent à la fois les deux. Il n'existe cependant pas dans ce cas de calendrier de traitement à respecter. La Vallée du Kou et les plaines du Sourou et de Bagré ont été choisies comme sites d'étude dans ce contexte agricole. En raison de l'absence d'un organisme de suivi des campagnes de traitements et de l'existence des marchés parallèles, il est impossible de connaître la quantité d'insecticides utilisée dans ce secteur.

- Les sites urbains

Les insecticides chimiques jouent un rôle encore important dans la lutte contre les nuisibles en milieu urbain. Ceux-ci sont principalement utilisés en pulvérisation spatiale ou en traitement larvicide. Mais de telles méthodes de lutte pratiquées seules dans un milieu favorable à la formation et à la prolifération des gîtes larvaires nécessitent des

investissements importants en matière d'assainissement urbain et ne permettent d'obtenir que des résultats partiels et transitoires. De nos jours la lutte contre les insectes nuisibles en milieu urbain relève essentiellement du ressort des communautés. On se sert abondamment de serpentins anti-moustiques, même dans les foyers défavorisés. L'ingrédient actif est souvent un pyréthrianoïde. La fumée qui se dégage du serpentin exerce un effet de choc en même temps qu'un effet répulsif empêchant les insectes de piquer. Dans de nombreux pays, les bombes aérosols qui contiennent un ou des pyréthrianoïdes en association avec un synergiste sont utilisées en hygiène domestique. Une enquête menée par le Centre Muraz dans 3 centres urbains du Burkina Faso a recensé une vingtaine de marques de bombes aérosols et une quinzaine de serpentins contenant pour la plupart un pyréthrianoïde dans le mélange des principes actifs. Ces insecticides sont vendus dans 97% des commerces et 62% des populations utilisent soit les tortillons soit les bombes aérosols pour se protéger des piqûres de moustiques (Ouédraogo, com. pers., Toé, com. pers.).

- Les sites à cultures vivrières

Il s'agit de secteurs géographiques où les traitements insecticides sont quasi inexistant. Cette zone s'étend du plateau central jusqu'au Nord du pays où la culture vivrière et l'élevage de gros et petits ruminants sont les activités essentielles. À cela, nous avons ajouté la localité de Batié, plus au Sud-Ouest, où le climat est assez similaire à celui de la plupart des sites d'études de l'aire cotonnière. Ces cultures (maïs, mil, sorgho, igname, arachide, haricot...) pour la plupart, ne connaissent pas de dommages importants et ne nécessitent donc pas de traitements phytosanitaires. Il existe cependant aux abords des cours d'eau des cultures maraîchères qui sont traitées avec les mêmes insecticides que ceux utilisés pour le coton.

4.1.2 La collecte des moustiques et les tests insecticides en tubes OMS

L'étude a concerné *An. gambiae* s.l. et les tests de sensibilité ont lieu sur des femelles issues de larves collectées sur le terrain (OMS, 1970, OMS, 1975). *An. funestus* n'a pas été concerné par cette étude parce que ce moustique est très difficile à

échantillonner au stade larvaire et aussi parce qu'il a été trouvé sensible aux molécules testées dans une étude antérieure (Diabaté, 1999). Trois insecticides ont été utilisés aux doses diagnostiques recommandées par l'OMS. Il s'agit de la perméthrine 1%¹ (25/75 : cis/trans), du DDT 4% et de la deltaméthrine 0.05%. Ces doses diagnostiques ont été définies par l'OMS suite à une harmonisation des résultats de tests obtenus dans plusieurs laboratoires (WHO, 1998b). La dose diagnostique d'une espèce est définie comme le double de la dose capable d'induire 100% de mortalité sur une souche sensible de référence de cette espèce.

Les moustiques sont ramassés à l'état larvaire sur le terrain et transférés au laboratoire pour être élevés jusqu'au stade adulte. De jeunes femelles (2-5 jours) non gorgées issues de cet élevage sont ensuite testées. Le test consiste à mettre les moustiques par lot de 25 au contact de papiers imprégnés dans des tubes OMS pendant une heure de temps. Des conditions standards de température, hygrométrie, lumière, ventilation sont respectées pour chaque test (OMS, 1970). La lecture de l'effet Knock Down (KD) se fait à intervalles réguliers de cinq minutes la première demi heure du test, puis de dix en dix la demi heure suivante. Pour cela, on observe le "tube d'exposition" par en dessous et on compte rapidement les moustiques assommés au fond du tube par l'insecticide. Le pourcentage de moustiques KD varie en fonction du log du temps et peut faire l'objet d'une analyse probit. Les valeurs du KDT50 et du KDT95 peuvent être calculées. Elles correspondent respectivement au temps au bout duquel, 50% et 95% des moustiques sont KD. Ces valeurs permettent de comparer différents insecticides entre eux ou plusieurs souches de moustiques par rapport à un même insecticide. La lecture de la mortalité se fait 24 heures après le test. Kisumu, une souche d'*An. gambiae* sensible aux insecticides, nous a servi de souche de référence. Elle nous a été fournie par le Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN) en 1998 et est entretenue depuis cette date à l'insectarium du Centre Muraz. Des moustiques exposés dans les mêmes conditions à un papier non imprégné sont systématiquement utilisés en tant que contrôle.

¹ Les % représentent la concentration en insecticide de la solution utilisée pour imprégner les papiers OMS. 1% correspond à 366,8 mg/m².

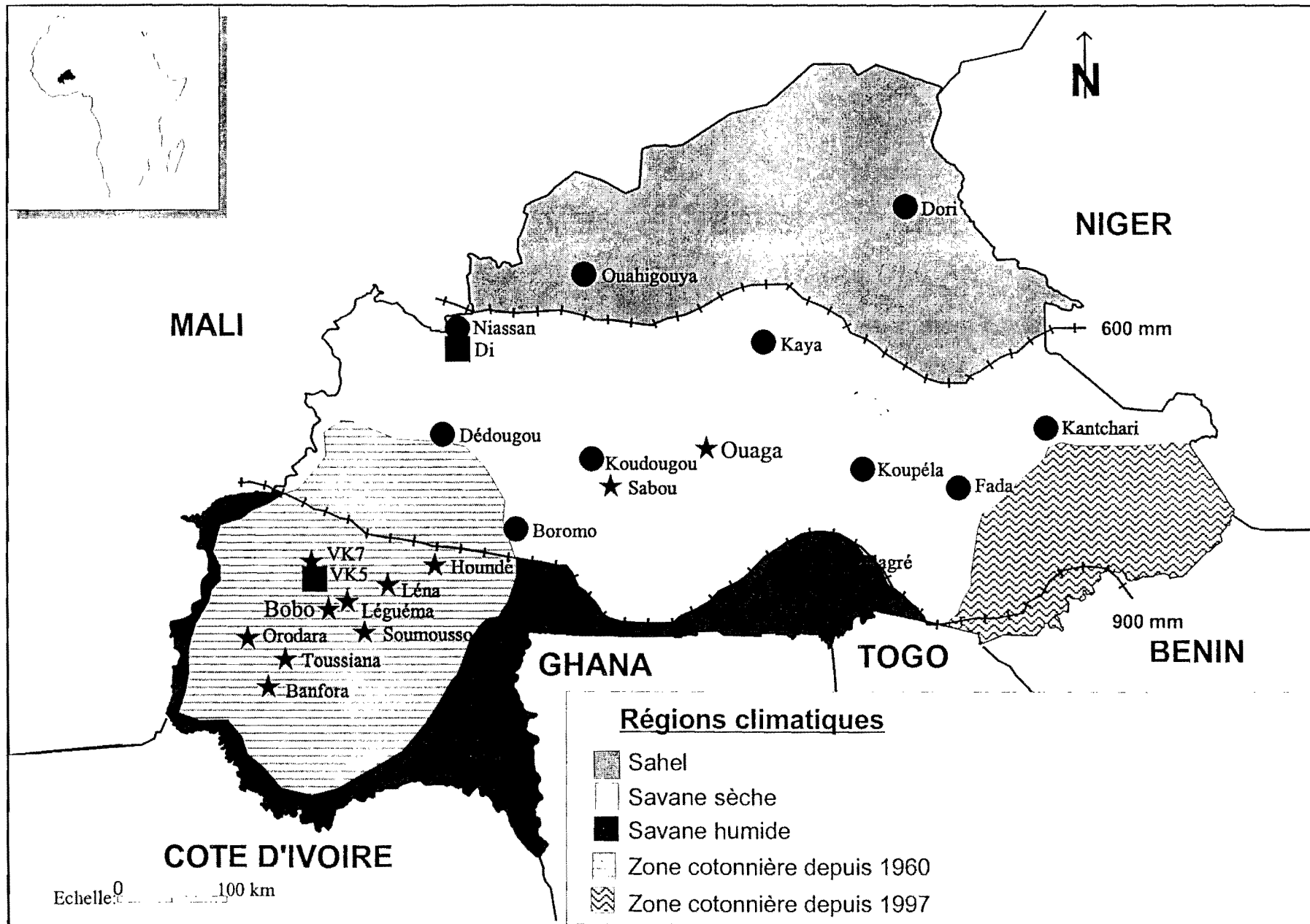


Figure 15: Sites d'étude de la résistance.

4.1.3 Diagnostic des espèces et formes moléculaires du complexe *An. gambiae* et mise en évidence de la mutation kdr.

À l'issue des tests insecticides, les moustiques sont stockés dans des microtubes et gardés à -20°C pour des analyses moléculaires afin de déterminer d'une part les espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* et d'autre part la fréquence de la mutation kdr au sein des populations et décrire la répartition spatiale et temporelle de cette mutation au sein des espèces et formes moléculaires du complexe d'espèces. Les moustiques sont broyés entier dans des tubes individuels et l'ADN est extrait à partir de ce broyât. Les réactions d'amplification sont ensuite opérées à partir de cet ADN pour identifier les espèces (Scott *et al.*, 1993), déterminer les formes moléculaires M et S (Favia *et al.*, 2001) d'*An. gambiae* s.s. et rechercher la présence de la mutation kdr (Martinez *et al.*, 1998).

4.1.4 Séquençage de l'intron en amont du gène du Canal Sodium

Le travail de séquençage est une étape qui se situe en aval de la réaction d'amplification en chaînes. Il a pour but de déterminer la séquence d'un fragment d'ADN, autrement dit de décrire l'enchaînement nucléotidique observé sur un fragment d'ADN. Ce travail intervient en général dans l'étude de la variabilité génétique entre espèces, la description d'un gène ou la recherche de marqueurs génétiques tels que les microsatellites. Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé cette technique pour comprendre l'origine de la dispersion de la mutation kdr au sein du complexe *An. gambiae*. Pour cela, nous avons travaillé sur des fragments spécifiques (intron en amont de la mutation kdr) de quelques spécimens. Les travaux ont été réalisés suivant les protocoles décrits dans Weill *et al.*, (2000) et les amplicons ont été expédiés à une société privée pour séquençage.

4.2 RESULTATS

4.2.1 Répartition géographique de la résistance au Burkina Faso (cf article n°2)

4.2.1.1 Mortalité au test OMS

Aux doses diagnostiques recommandées par l'OMS, les trois insecticides, à savoir la perméthrine 1% , le DDT 4% et la deltaméthrine 0,05% ont provoqué 100% de mortalité sur la souche sensible Kisumu. Nous avons considéré les moustiques de terrain comme résistants au DDT lorsque la mortalité était inférieure à 90%. Pour les deux autres insecticides, le seuil de mortalité en dessous duquel les moustiques ont été considérés résistants était de 95%. Au total 26 populations d'*An. gambiae* s.l. du Burkina Faso ont fait l'objet de tests de sensibilité. La résistance de ce moustique à la perméthrine est répartie dans l'ensemble du pays avec un gradient décroissant de la zone soudanienne à la zone sahélienne. Ainsi huit populations sur onze sont résistantes dans la zone soudanienne avec des mortalités variables allant de 59%, la plus faible, à 94,5% (figure 16a). Dans la zone soudano-shélienne, seulement deux populations sont résistantes à la perméthrine sur un total de huit testées (16b) avec une mortalité relativement forte (92-94%). Au Nord, zone sahélienne, seulement deux populations d'*An. gambiae* s.l. ont pu être testées. L'une est résistante avec 92% de mortalité et l'autre sensible (figure 16c).

Une résistance croisée au DDT a été observée dans plusieurs populations. Ainsi au Sud-Ouest, huit populations ont pu être testées et elles sont toutes résistantes (figure 17). Sur le plateau central, seule une population est résistante et au Nord, la population de Dori, la seule testée, est sensible.

La plupart des populations échantillonnées se sont révélées sensibles à la deltaméthrine. Seules les populations du site cotonnier de Orodara sont résistantes (figure 18).

4.2.1.2 Diagnostic d'espèces et formes moléculaires du complexe *An. gambiae*

An. gambiae s.l. est un complexe de sept espèces jumelles dont deux sont présentes au Burkina Faso : *An. arabiensis*, qui est une espèce adaptée aux régions arides et *An. gambiae* s.s., qui a été récemment scindé en deux formes moléculaires M et S. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'importance de la résistance au sein de chacun de ces taxons. Globalement, l'analyse des populations échantillonnées a confirmé la présence des deux espèces au Burkina Faso avec une nette prédominance d'*An. gambiae* s.s. (tableau 16). Au total 1 842 spécimens ont été analysés dans les trois régions bioclimatiques (soudannienne, soudano-sahélienne et sahélienne). *An. arabiensis* est présent à de faibles fréquences avec une répartition graduelle croissante depuis le Sud-Ouest, zone soudannienne, jusqu'au plateau central, zone soudano-sahélienne. Sur 232 spécimens de cette espèce, 159, soit 69%, proviennent du plateau central. Sa répartition géographique est en rapport avec la pluviométrie et tient également compte de l'écologie du milieu. Dans la partie ouest du Burkina Faso, la pluviométrie est assez forte avec une moyenne annuelle de 1 000 mm d'eau, contrairement au centre et au nord du pays où la pluviométrie annuelle enregistrée est de l'ordre de 300-800 mm. Quant aux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*, elles existent toutes deux mais affichent une répartition géographique différente.

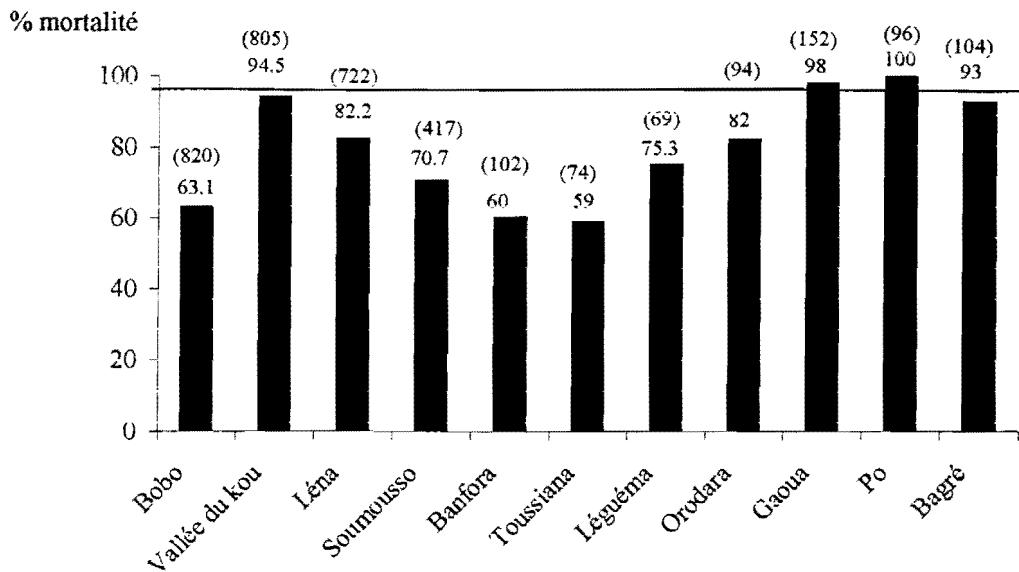


Figure 16a: Taux de mortalité à la perméthrine 1% des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone soudanienne du Burkina Faso

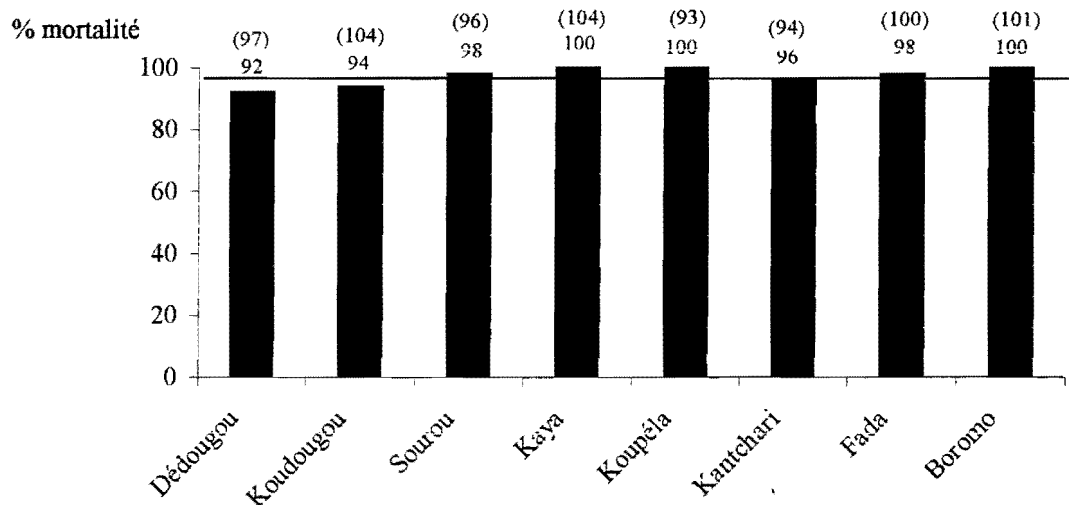


Figure 16b: Taux de mortalité à la perméthrine 1% chez des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone soudano-sahélienne du Burkina Faso

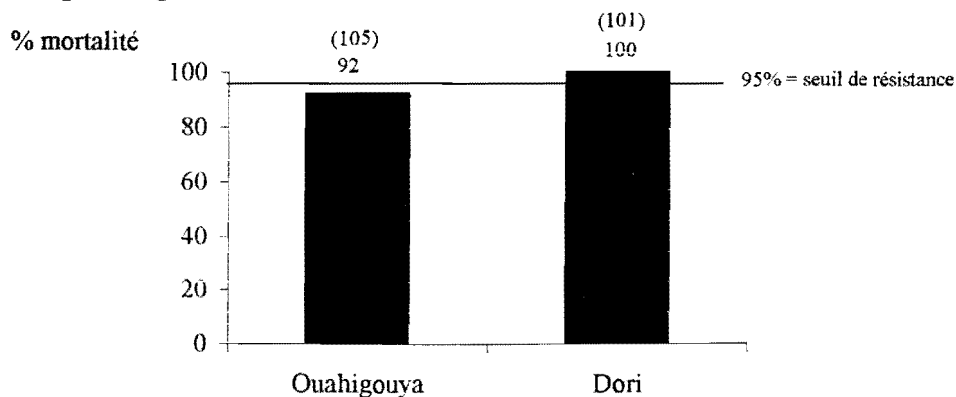


Figure 16c: Taux de mortalité à la perméthrine 1% chez des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone sahélienne du Burkina Faso

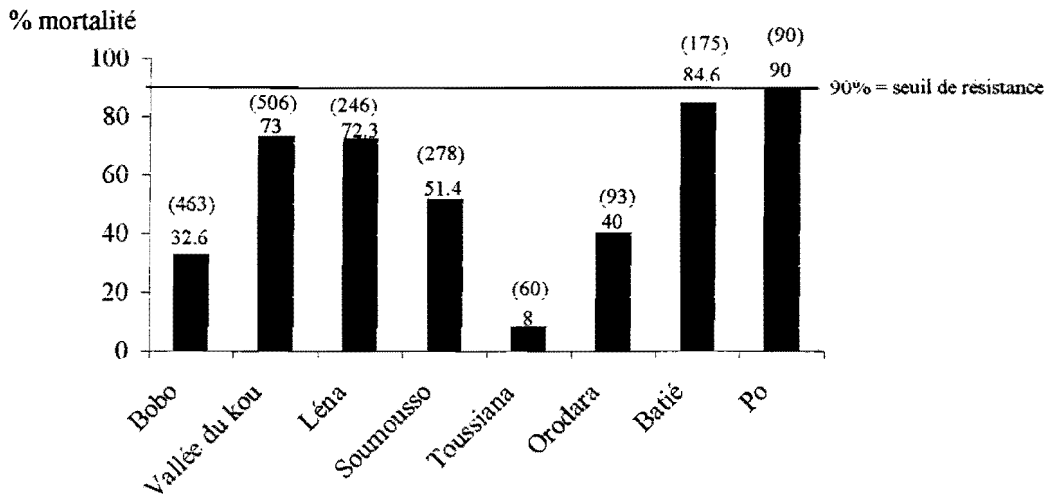


Figure 17a: Taux de mortalité au DDT 4% des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone soudanienne du Burkina Faso

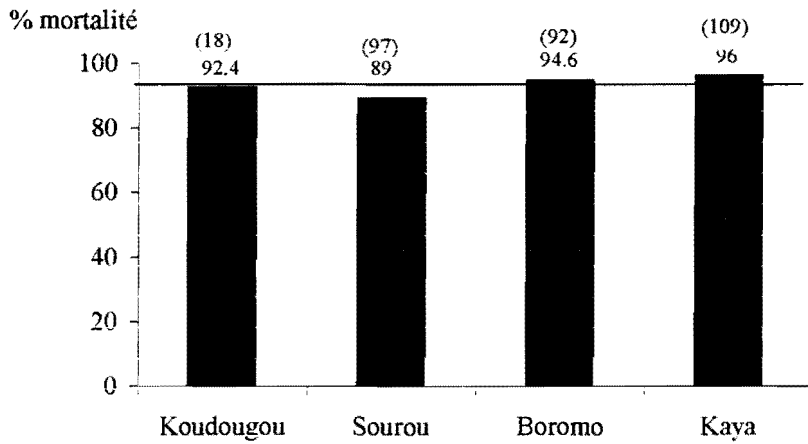


Figure 17b: Taux de mortalité au DDT 4% des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone soudano-sahélienne du Burkina Faso

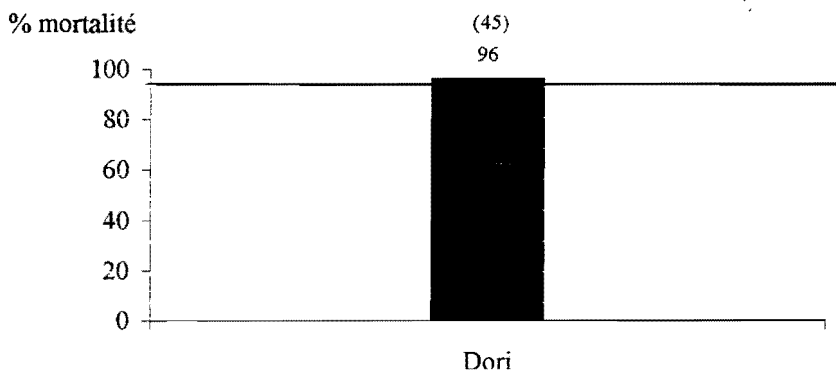


Figure 17c: Taux de mortalité au DDT 4% des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone sahélienne du Burkina Faso

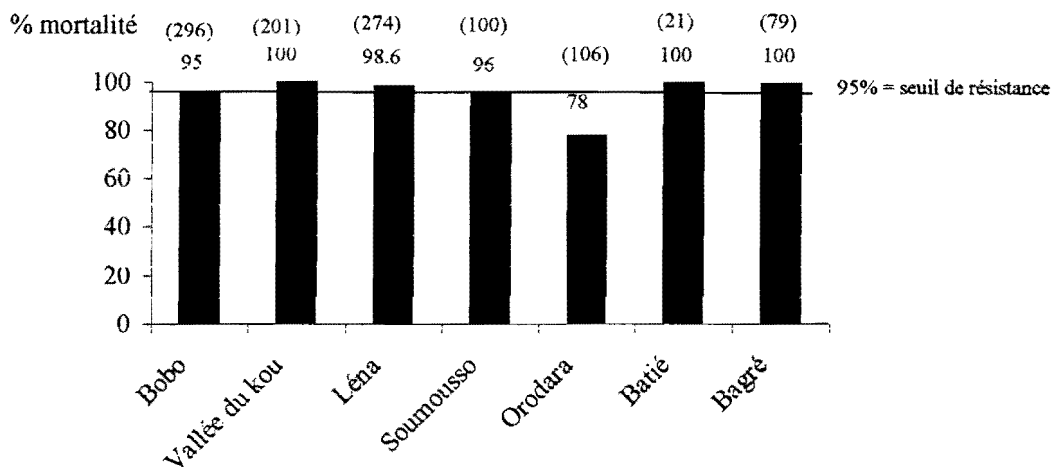


Figure 18a: Taux de mortalité à la deltaméthrine 0.05% des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone soudanienne du Burkina Faso

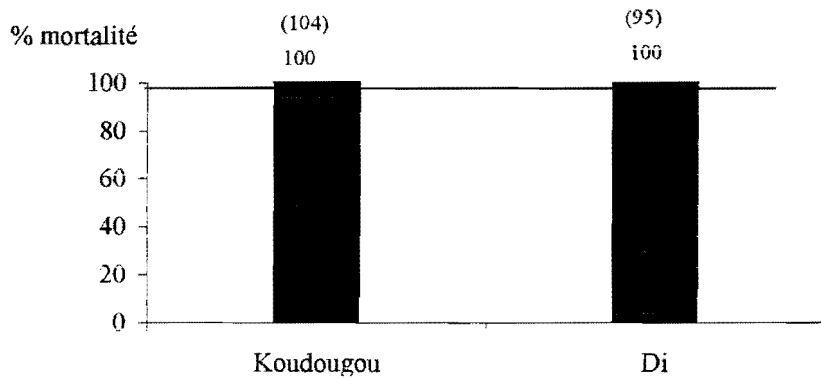


Figure 18b: Taux de mortalité à la deltaméthrine 0.05% des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone soudano-sahélienne du Burkina Faso

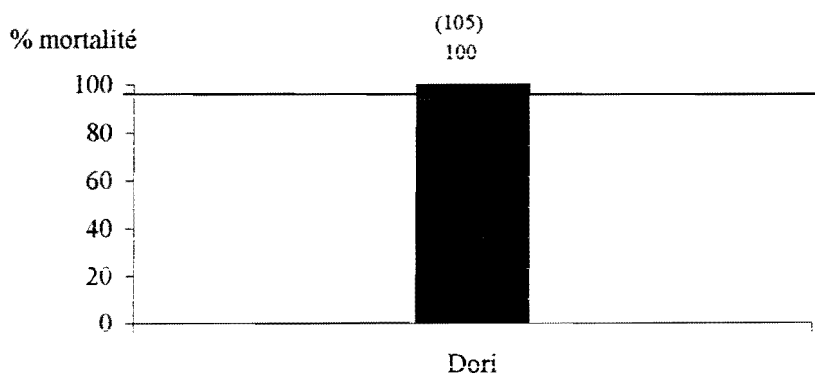


Figure 18c: Taux de mortalité à la deltaméthrine des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de la zone sahélienne du Burkina Faso

Tableau 16: Distribution géographique des espèces et formes moléculaires d'*Anopheles gambiae* s.l.

		<i>Anopheles gambiae</i> s.s.						<i>Anopheles arabiensis</i>	
		N	%	Formes moléculaires				N	%
				M		S			
				N	%	N	%		
Zone soudanienne	Bobo-Dosso	120	97,6	6	6,6	85	93,4	3	2,4
	Vallée du Kou	768	99,4	572	84,2	107	15,8	5	0,6
	Léna	141	92,8	26	30,2	60	69,8	11	7,2
	Soumouso	80	96,4	24	30,4	55	69,6	3	3,6
	Banfora	30	100	4	13,3	26	86,7	0	0
	Toussiana	26	89,7	0	0	26	100	3	10,3
	Léguéma	11	55	1	9,1	10	90,9	9	45
	Orodara	30	100	0	0	30	100	0	0
	Batié	57	95	6	13,3	39	86,7	3	5
	Bagré	6	22,2	4	66,7	2	33,3	21	77,8
	Po	30	100	5	16,7	25	83,3	0	0
Total	1299	86,20	648	24,54	465	75,40	58	13,80	
Zone soudano-sahélienne	Dédougou	30	100	27	90	3	10	0	0
	Koudougou	11	40,7	4	40	6	60	16	59,3
	Sourou	53	88,3	46	93,9	3	6,1	7	11,7
	Koupéla	6	21,4	6	100	0	0	22	78,6
	Kantchari	22	40,7	4	19,1	17	80,9	32	59,3
	Fada	12	38,7	10	83,3	2	16,7	19	61,3
	Kaya	27	90	17	63	10	37	3	10
	Houndé	40	100	3	14,3	18	85,7	0	0
	Sabou	27	90	0	0	15	100	3	7
	Boromo	18	62,1	8	44,4	10	55,6	11	37,9
	Ouagadougou	43	60,6	-	-	-	-	28	39,4
Total	268	66,87	112	54,80	76	45,20	159	33,13	
Zone sahélienne	Ouahigouya	20	71,4	16	94,1	1	5,9	8	28,6
	Dori	23	76,9	19	82,6	4	17,4	7	23,3
	Total	43	74,05	35	88,33	5	11,65	15	25,95

N= nombre de spécimens analysés; %= pourcentages des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae*

Cette répartition par ailleurs varie fortement au sein des sites d'étude d'une même région climatique. À l'exemple d'*An. arabiensis*, la distribution de la forme moléculaire M affiche une variabilité écotypique. Elle vit en sympatrie avec la forme S sur l'ensemble du territoire mais est mieux adaptée à certains milieux tels que les périmètres irrigués.

Sa répartition spatiale montre un gradient décroissant du Nord-Est, zone sahélienne, vers le Sud-Ouest, zone soudanienne (tableau 16) confirmant son adaptation au milieu semi-aride. Globalement, le tableau de la répartition des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* donne une nette dominance de la forme S au Sud-Ouest alors que la forme M prédomine au Nord. Quant au plateau central, on assiste à une distribution relativement équilibrée des espèces et formes de ce moustique.

4.2.1.3 Distribution de la mutation kdr au sein des populations échantillonnées

Au total 1 842 spécimens ont été analysés et la mutation kdr a été observée essentiellement chez la forme S d'*An. gambiae*. Sa fréquence chez la forme M et chez *An. arabiensis* est très faible. La distribution du gène kdr est observée sur tout le territoire avec une fréquence élevée au Sud-Ouest, région où les moustiques sont résistants à l'ensemble des trois insecticides (figures 19 et 20). Ce gène est observé à l'état homozygote chez 71% de la population analysée de cette région. Les homozygotes sensibles représentent moins de 10% de la population et attestent d'une grande pression insecticide dans cette région du pays. Quant aux deux régions restantes, le Centre et le Nord, la fréquence allélique de la mutation kdr est comparable et diminue de moitié par rapport à celle du Sud-Ouest. Par ailleurs une analyse statistique des résultats montre une bonne corrélation ($p < 10^{-3}$) entre le pourcentage de survivants à la perméthrine et la fréquence allélique de la mutation kdr. Cette forte corrélation confirme que la mutation kdr est le principal mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes dans ces populations (figure 21).

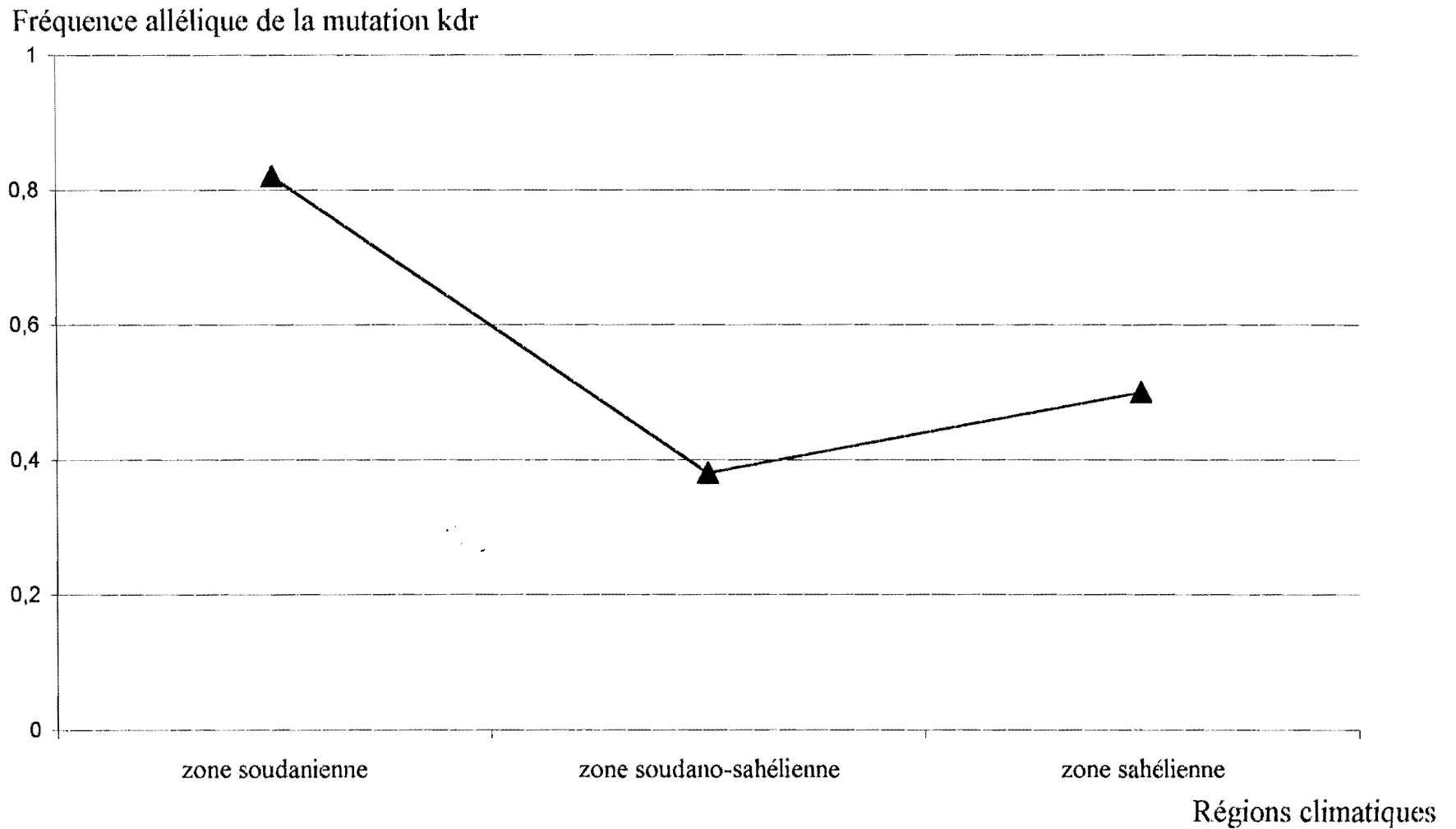


Figure 19: Distribution géographique des fréquences alléliques de la mutation kdr chez des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* au Burkina Faso

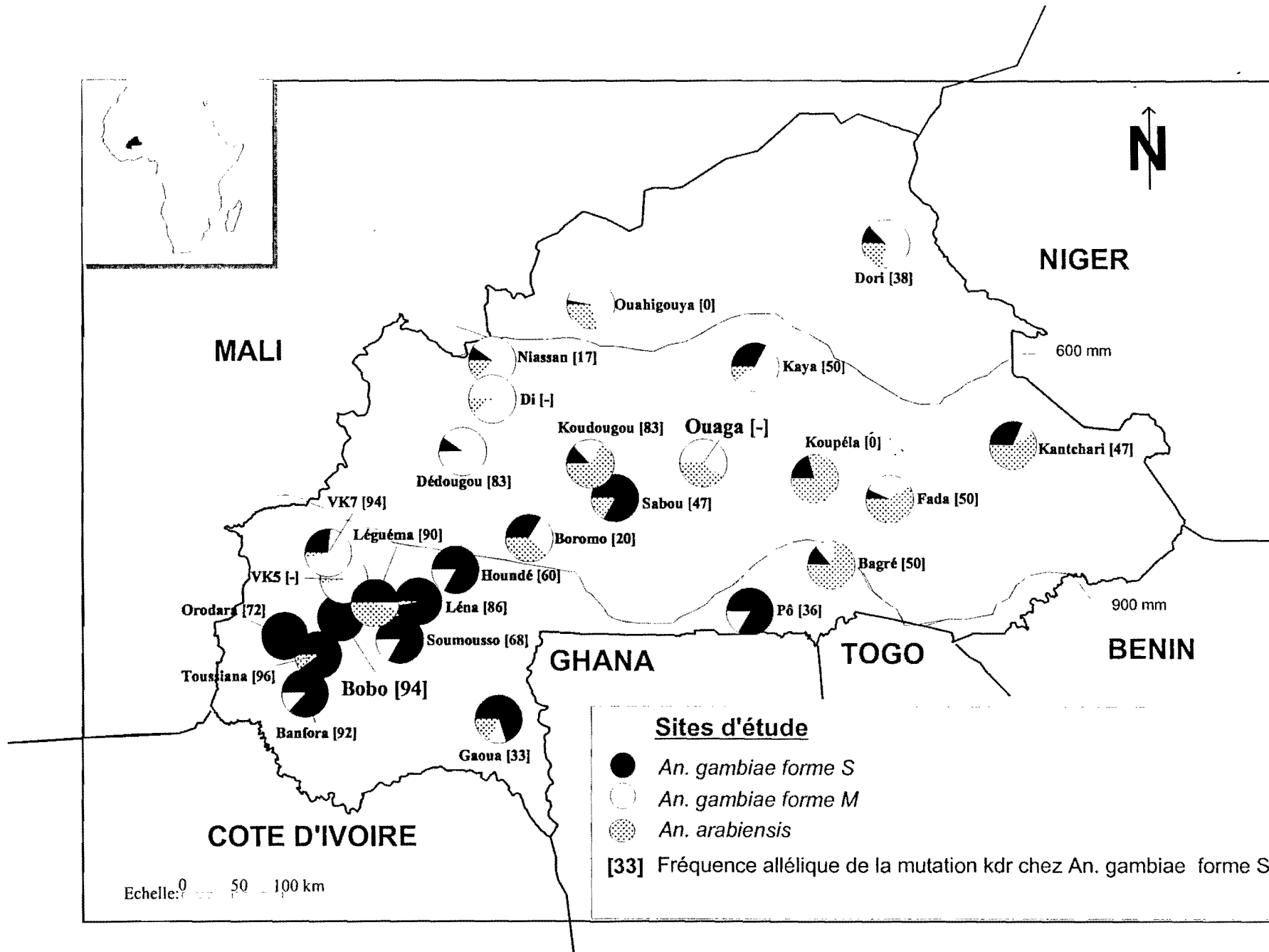


Figure 20 : Répartition géographique de la résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae*

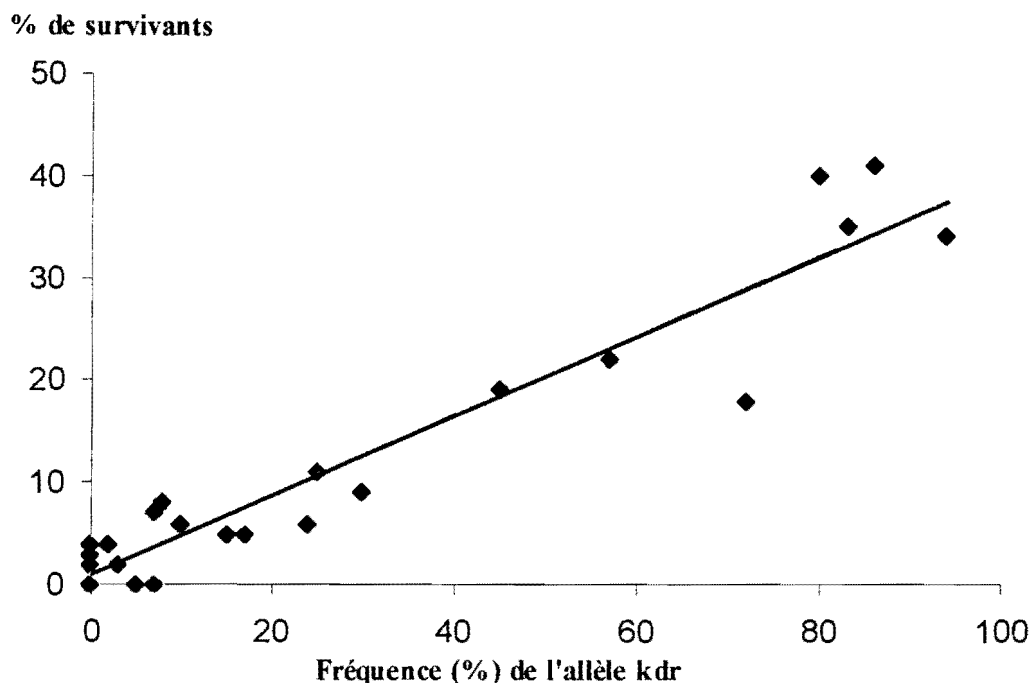


Figure 21 : Corrélation entre les fréquences de survivants à la perméthrine 1% et la fréquence allélique de la mutation kdr pour 23 populations d'*An. gambiae* s.s.. ($y = 0,39x + 0,90$; $r = 0,91$ et $p < 10^{-3}$).

4.2.2 Répartition de la résistance suivant l'utilisation des insecticides (cf article n°3)

Les résultats de la prospection générale dans les 26 sites ont révélé une distribution géographique de la résistance avec un gradient croissant de la zone soudanienne vers la zone sahélienne. L'étape suivante de l'étude a consisté à mesurer la variation de la résistance en relation avec l'utilisation des insecticides. Etant donné que le Sud-Ouest est la région agricole du Burkina Faso avec un bassin cotonnier très développé, nous avons étudié dans cette région l'impact des types de cultures et des traitements insecticides sur la répartition des espèces et formes du complexe *An. gambiae* d'une part et d'autre part sur la distribution de la résistance. Des sites d'étude représentatifs des différentes cultures ont été choisis pour cette évaluation ainsi que le milieu urbain de Bobo-Dioulasso où l'utilisation d'insecticides à usage domestique est importante.

4.2.2.1 Suivi de la résistance dans les zones urbaine, cotonnière et à cultures vivrières

Les sites urbain de Bobo-Dioulasso, cotonnier de Léna et à cultures vivrières de Batié ont été choisis. Ils sont tous trois caractérisés essentiellement par des gîtes larvaires temporaires liés aux eaux de précipitations que colonise de préférence *An. gambiae* forme S. Néanmoins on rencontre dans un des quartiers de Bobo-Dioulasso, en l'occurrence Dioulasso ba, et à Léna, un cours d'eau dont les phases de décrue créent des flaques résiduelles en bordure du cours d'eau favorables à la reproduction des deux formes moléculaires d'*An. gambiae*.

- Mortalité au test OMS

La résistance à la perméthrine et au DDT a été observée dans les sites urbain et cotonnier, mais une bonne sensibilité est obtenue à Batié (figure 22). Globalement la relation entre le pourcentage de moustiques knockdown et le temps d'exposition est bien représentée par une droite (figure 23). Les milieux urbain et cotonnier montrent les plus faibles mortalités avec un ratio des temps de knockdown (RRKd₅₀) pouvant atteindre 8,3 à la perméthrine et 32,7 au DDT (tableau 17). Bien que les niveaux de résistance au DDT et à la perméthrine soient élevés, ces populations d'*An. gambiae* montrent une bonne sensibilité à la deltaméthrine 0,05%.

% Mortalité

■ Perméthrine 1%

▨ DDT 4%

□ Deltaméthrine 0.05%

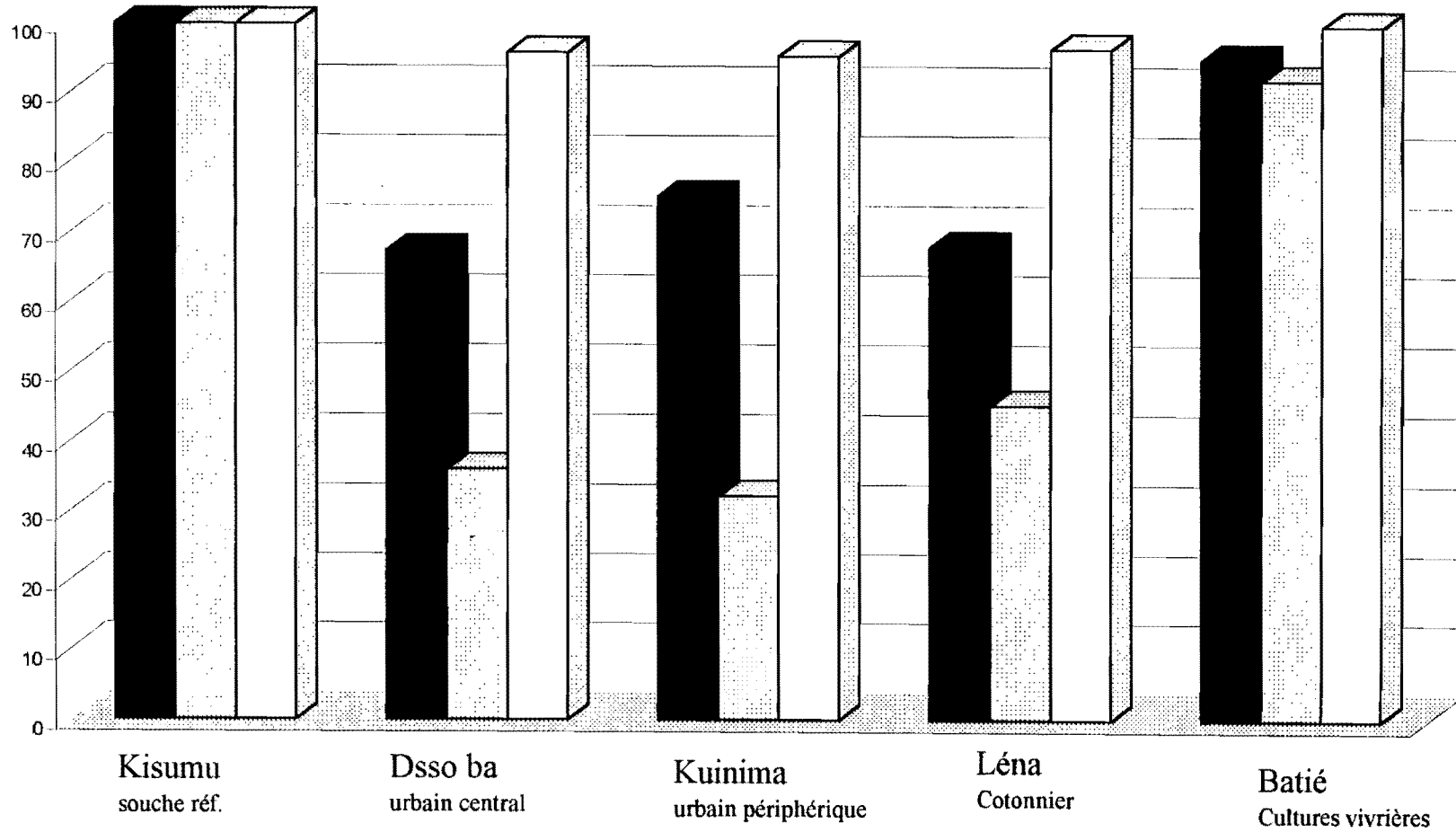


Figure 22: Mortalité au test OMS avec trois insecticides pour quatre populations d'*Anopheles gambiae* s.l. prélevées sur le terrain et une souche sensible kisumu

**Tableau 17: Résistance à l'effet knockdown des populations sauvages .
d'*Anopheles gambiae* s.l. récoltés dans différentes zones écologiques**

Insecticide	Zone	site d'étude	KdT50 (min)	KdT95 (min)	RR50	N	Statut
Perméthrine 1%	souche sensible	Kisumu	10.4	15.2	-	105	S
	urbaine	Dioulassoba	86.8	382.1	8.3	98	R
		Kuinima	57	329.3	5.5	101	R
	cotonnière	Léna	39.3	295.4	3.8	53	R
	cultures vivrières	Batié	12.3	36	1.2	102	S
DDT 4%	souche sensible	Kisumu	30.3	49.9	-	100	S
	urbaine	Dioulassoba	992.1	impossible	32.7	97	R
		Kuinima	123.3	impossible	4.1	99	R
	cotonnière	Léna	105.9	impossible	3.5	77	R
	cultures vivrières	Batié	24.8	124.4	0.8	28	S
Deltaméthrine 0.05%	souche sensible	Kisumu	9.6	13.4	-	100	S
	urbaine	Dioulassoba	29.4	53.8	3.0	98	S
		Kuinima	30.6	58.7	3.2	107	S
	cotonnière	Léna	22.4	46.7	2.3	125	S
	cultures vivrières	Batié	17.8	34.2	1.8	21	S

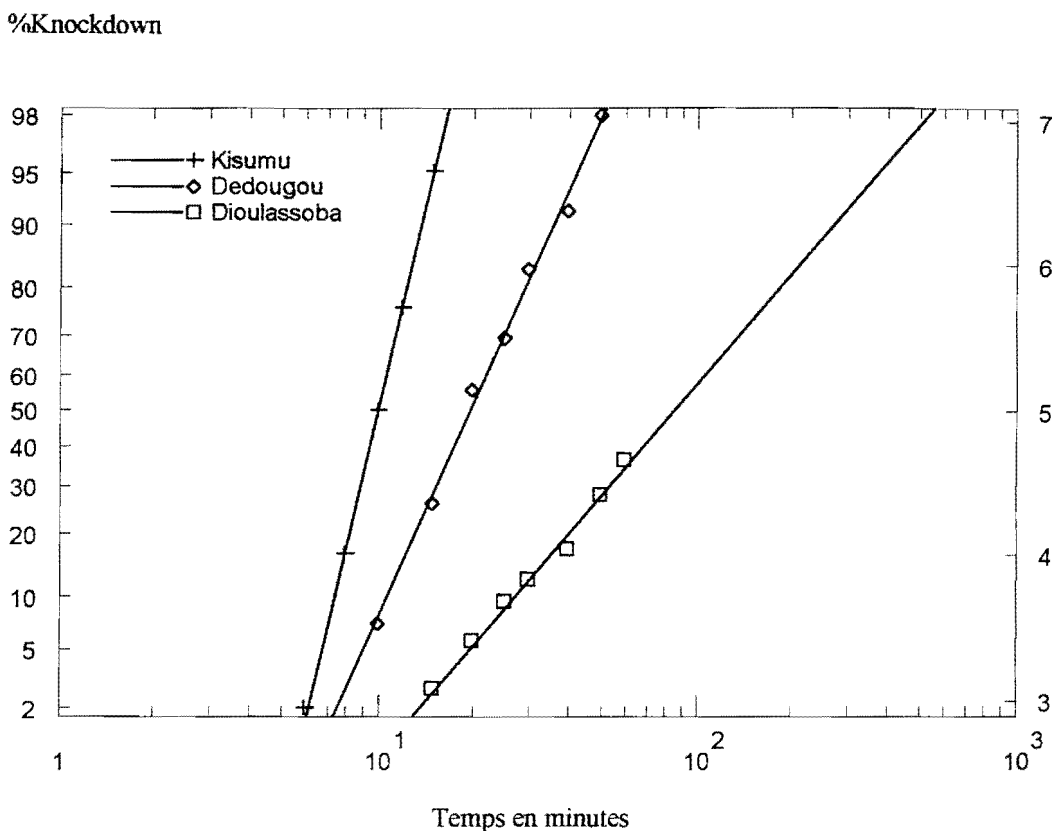
KdT50=temps de contact avec l'insecticide au bout duquel 50% des moustiques sont assomés

RR50: Résistance ratio au KdT50

S=sensible; R=résistant

N= nombre de spécimens testés

Figure 23 : Relation entre le pourcentage de moustiques knockdown et le temps d'exposition à la perméthrine 1% chez la souche sensible d'*An. gambiae* et deux populations sauvages.



4.2.2.2 Suivi de la résistance dans les périmètres rizicoles (cf articles n°4, 5 et 6)

La production agricole est une priorité dans les pays en voie de développement pour faire face aux problèmes de ressources alimentaires d'une population en croissance continue. Elle est en amont de toute autre préoccupation et constitue un des défis du troisième millénaire. Cette politique d'autosuffisance alimentaire a conduit à la mise en place de vastes aménagements agricoles qui ne bénéficient souvent d'aucune mesure d'accompagnement. L'une des conséquences inhérentes à l'implantation de ces aménagements est la prolifération de la faune culicidienne en toutes saisons. Cela occasionne une nuisance importante en terme de piqûres de moustiques, obligeant les habitants de ces localités à avoir recours aux moustiquaires comme moyen de protection. Notre objectif était d'évaluer le statut de sensibilité d'*An. gambiae* s.l. aux pyréthrinoïdes dans ces milieux rizicoles favorables à l'implantation des MII.

L'étude a été conduite dans trois sites d'hydroaménagements agricoles. Le périmètre rizicole de la Vallée du Kou, situé en zone soudanaise au sud-ouest du pays où deux quartiers, VK5 et VK7, ont été prospectés. Bagré, un périmètre aménagé en limite sud-est de la zone soudano-sahélienne où un seul village en périphérie des rizières a été étudié. Enfin le Sourou, en limite nord de la même zone avec deux villages prospectés, Di et Niassan. Les femelles utilisées dans les tests insecticides ont été récoltées à l'état larvaire sur le terrain. Les mêmes femelles ont été analysées pour déterminer la prévalence des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* et la fréquence de la mutation kdr. À VK7 néanmoins, des analyses supplémentaires ont été faites à partir de femelles issues des captures de nuit dans le but de comparer la distribution de la mutation kdr entre les deux méthodes d'échantillonnage.

- Mortalité au test OMS

Quelques populations sont résistantes à la perméthrine et au DDT alors qu'une bonne sensibilité est obtenue à la deltaméthrine dans tous les sites (tableau 18). Des populations d'*An. gambiae* s.l. récoltées dans deux quartiers de la Vallée du Kou ont été testées. À VK5, quartier implanté au milieu des périmètres rizicoles, une bonne sensibilité est obtenue à la perméthrine, mais une résistance est observée au DDT. Les populations de VK7, quartier situé à l'interface des périmètres rizicoles et des champs de coton, sont résistantes à la perméthrine et au DDT, mais sensibles à la deltaméthrine. Au Sourou, les populations des deux villages sont sensibles aux pyréthrinoïdes, mais celle de DI est résistante au DDT. La résistance à la perméthrine a été observée à Bagré, mais une bonne sensibilité est obtenue à la deltaméthrine. Les moustiques n'ont pas été testés au DDT dans cette localité. D'une manière générale, la relation entre les pourcentages de moustiques knockdown et le log du temps d'exposition à la perméthrine est bien représentée par une droite (tableau 18).

- Diagnostics d'espèces, de formes moléculaires et fréquence de la mutation kdr

Au total 175 femelles d'*An. gambiae* si ont été analysées pour l'identification des espèces, formes et fréquence du gène kdr. Les deux espèces *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont en sympatrie dans tous les sites (tableau 19). *An. arabiensis* est plus représentatif dans les hydroaménagements de la zone soudano-sahélienne avec 78% à Bagré alors qu'il ne représente plus que 3% de la population à la Vallée du Kou. *An. gambiae* forme M est dominante à VK5 et dans les sites du Sourou, mais c'est plutôt la forme S qui domine à VK7 avec 63% des effectifs d'*An. gambiae* s.s. analysés. La mutation kdr est présente dans les trois sites mais uniquement au sein de la forme S d'*An. gambiae* (tableau 19).

À VK7, des analyses supplémentaires de femelles issues des captures de nuit, ont permis d'observer, pour la première fois en zone de savane, la mutation kdr chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae*. Présente à la fréquence de 0.006 en 1999, elle est passée à 0.02 en 2000 (tableau 20).

Tableau 18 : Sensibilité de populations sauvages d'*An. gambiae* sl aux insecticides de référence au cours de la saison des pluies 1999 (tests adulte OMS)

Insecticide	Perméthrine 1% ¹				Deltaméthrine 0,05% ¹				DDT 4% ¹			
	Site d'étude	N Date	KdT ₅₀ (min)	KdT ₉₅ (min)	M (%)	N Date	KdT ₅₀ (min)	KdT ₉₅ (min)	M (%)	N Date	KdT ₅₀ (min)	KdT ₉₅ (min)
Kisumu (référence)	100 08/99	14 [13-16]	20 [18-22]	100 S	100 08/99	10 [9-12]	15 [14-18]	100 S	100 08/99	30 [28-32]	50 [47-53]	100 S
Bama VK5 (casiers rizicoles)	95 07/99	17 [16-18]	31 [28-36]	97 S	-	-	-	-	54 07/99	33 [30-37]	94 [79-119]	85 R
Bama VK7 I (bas-fond)	70 07/99	19 [17-21]	64 [51-90]	91 R	57 07/99	19 [21-25]	64 [47-67]	98 S	96 07/99	36 [33-40]	94 [80-116]	90 R
Bama VK7 II (bas-fond)	81 11/99	23 [20-24]	94 [73-110]	73 R	50 11/99	22 [19-26]	72 [52-104]	100 S	-	-	-	-
Bagré (zone d'inondation)	104 09/99	14 [14-15]	26 [23-29]	93 R	79 09/99	12 [11-13]	23 [21-27]	100 S	-	-	-	-
Sourou Di (zone d'inondation)	96 11/99	14 [14-15]	24 [22-26]	98 S	95 11/99	19 [18-21]	37 [31-44]	100 S	97 11/99	32 [29-36]	64 [51-81]	89 R
Sourou Niassan L (bas-fond)	82 11/99	15 [13-18]	26 [20-33]	96 S	-	-	-	-	-	-	-	-
Sourou Niassan A (faune résiduelle)	51 11/99	15 [14-16]	23 [21-28]	100 S	53 11/99	18 [16-19]	36 [31-48]	100 S	-	-	-	-

¹ : Dose diagnostique OMS / N : Nombre d'individus testés / Date : Date de réalisation du test

KdT₅₀ : temps d'exposition en minutes pour lequel 50% des individus testés sont "paralysés" - [IC à 95%]

KdT₉₅ : temps d'exposition en minutes pour lequel 95% des individus testés sont "paralysés" - [IC à 95%]

M : Pourcentage de mortalité relevé à 24h après 1h d'exposition aux doses diagnostiques OMS

Statut : **S** = Sensible (95% < M <= 100%) ; **R** = Résistant (M <= 95%)

Tableau 19: Diagnostics d'espèces, de formes moléculaires et fréquence de la mutation kdr chez des femelles d'*An. gambiae* sl issues des tests de sensibilité à la perméthrine 1%

Site d'étude	<i>An. gambiae</i> sl		<i>An. gambiae</i>		Forme S		Forme M		An. arabiensis	
	N	F (kdr)	%	F (kdr)	%	F (kdr)	%	F (kdr)	%	F (kdr)
Bama VK5 (casiers rizicoles)	30	0	97 (29)	0	0 (0)	-	100 (24)	0	3 (1)	0
Bama VK7 I (bas-fond)	30	0,27	97 (29)	0,28	30 (8)	0,93	70 (19)	0	3 (1)	0
Bama VK7 II (bas-fond)	28	0,41	96 (27)	0,44	63 (12)	0,92	37 (7)	0	4 (1)	0
Bagré (zone d'inondation)	27	0,018	22 (6)	0,08	33 (2)	0,25	67 (4)	0	78 (21)	0
Sourou Di (zone d'inondation)	30	0	90 (27)	0	0 (0)	-	100 (24)	0	10 (3)	0
Sourou Niassan L (bas-fond)	30	0,017	87 (26)	0,02	12 (3)	0,16	88 (22)	0	13 (4)	0

N : Nombre de femelles d'*An. gambiae* sl testées

F (kdr) : Fréquence allélique de la mutation kdr au sein de l'échantillon (RR+RS)/(RR+RS+SS)

% : Pourcentage (*effectifs*) des espèces ou formes moléculaires reporté au nombre de femelles testées

Tableau 20 : Variation mensuelle dans la fréquence de la mutation kdr et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* à VK7 de 1999-2000 capturées au stade adulte

	1999						2000					
	S ¹	KDR ²	F(R) ³	M ¹	KDR	F(R)	S	KDR	F(R)	M	KDR	F(R)
Juillet	0 0%	-	-	40 100%	0	0	0 0%	-	-	33 100%	0	0
Août	4 14%	3RR+1RS	0,87	26 86%	0	0	2 7%	2RS	0,5	28 93%	1RS	0,02
Septembre	3 10%	3RR	1	26 90%	0	0	1 4%	1RR	1	24 96%	2RS	0,04
Octobre	6 19%	4RR+2RS	0,83	25 81%	0	0	9 24%	9RR	1	28 76%	1RS	0,02
Novembre	26 37%	25RR+1RS	0,98	44 63%	1RS	0,01	14 19%	14RR	1	60 81%	0	0

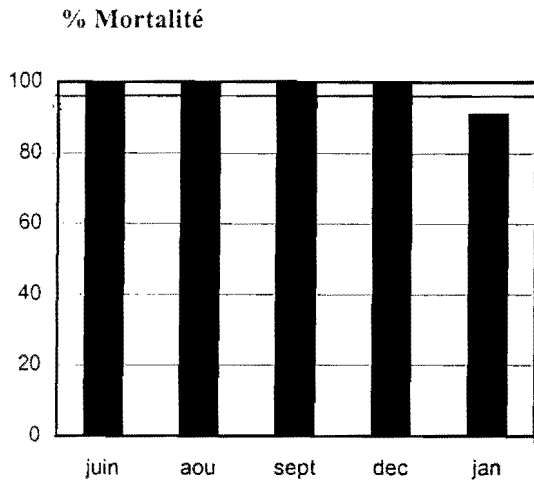
1 : Fréquence relative des formes moléculaires d'*An. gambiae*. 2 : Génotype kdr des spécimens analysés

3 : Fréquence allélique de la mutation kdr

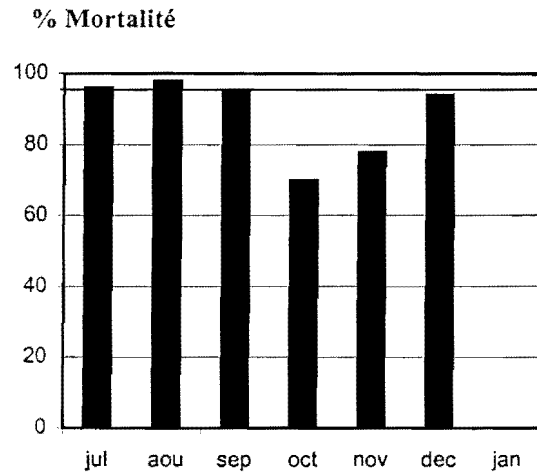
4.2.3 Variabilité temporelle de la résistance (cf article n°3)

Après avoir observé que la résistance des populations d'*An. gambiae* s.l. aux insecticides testés avait une distribution liée aux types de cultures et à l'utilisation des insecticides, l'étape suivante de notre étude a consisté à faire un suivi longitudinal de la résistance pour comprendre la dynamique des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* et l'évolution de la résistance dans un même site d'étude à travers le temps. Les sites rizicole de la Vallée du Kou (VK5 et VK7), urbain de Bobo-Dioulasso et cotonnier de Léna ont été choisis pour cette étude. Les populations ont été échantillonnées en 2000-2001 et testées uniquement à la perméthrine 1%.

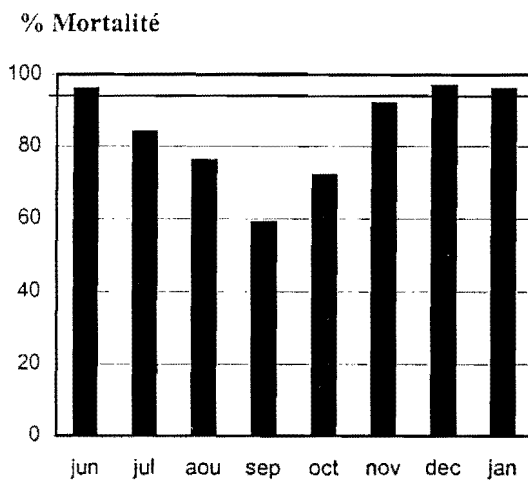
Les résultats des bioessais montrent que la résistance observée dans les différents sites est un processus dynamique. Dans le périmètre rizicole de la Vallée du Kou, une bonne sensibilité des populations récoltées a été observée à VK5 tout au long du suivi alors qu'à VK7, le quartier périphérique, la résistance n'apparaît que durant les deux mois à la fin de la saison pluvieuse (Figure 24 et tableau 21). À Léna, le site cotonnier, on observe une bonne sensibilité des populations au début de la saison des pluies et de la saison sèche suivante. Par contre de juillet à octobre, la résistance augmente progressivement tout au long de la campagne cotonnière. À Dioulasso ba, en milieu urbain, la résistance d'*An. gambiae* est présente durant tout le suivi, c'est à dire aussi bien pendant la saison des pluies que pendant la saison sèche, avec une mortalité variant de 48 à 89%.



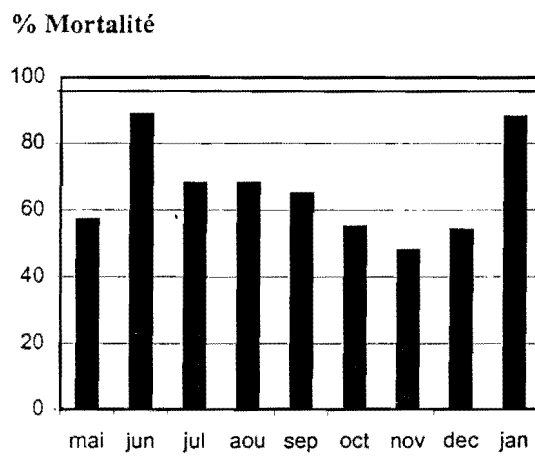
VK5
milieu rizicole central



VK7
milieu rizicole périphérique



Léna
milieu rural cotonnier



Dioulassoba
milieu urbain central

Figure 24: Variation temporelle et spatiale de la résistance des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. à la perméthrine 1% dans quatre zones écologiques du Sud-Ouest du Burkina Faso en 2000-2001
M : Pourcentage de mortalité relevé à 24h après 1h d'exposition à la concentration diagnostic OMS
95% = seuil de résistance

Tableau 21: Distribution saisonnière des espèces et formes moléculaires des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. récoltées dans différentes zones écologiques du Sud-Ouest du Burkina Faso en 2000

		<i>Anopheles gambiae</i> s.s.									<i>Anopheles arabiensis</i>		
Saison	site	N	%	F(kdr)	Formes moléculaires						N	%	F(kdr)
					M			S					
					N	%	F(kdr)	N	%	F(kdr)			
saison pluvieuse	VK5 rizicole	55	98,2	0	55	100	0	0	0	-	1	1,8	0
	VK7 rizicole	30	96,7	0.44	15	53,6	0	13	46,4	0.89	1	3,3	0
	Dioulasso ba urbain	61	100	0.96	0	0	-	61	100	0.96	0	0	-
	Léna cotonnier	51	96,2	0.90	0	0	-	51	100	0.90	2	3,8	0
saison sèche	Dioulasso ba urbain	22	91,7	0.83	3	14,3	0	18	85,7	0.97	2	8,3	0
	Léna cotonnier	15	75	0.20	10	71,4	0	4	28,6	0.75	5	25	0

N=nombre de spécimens analysés

%= pourcentage des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae*.

F(kdr)= fréquence allélique de la mutation kdr

Au regard de cette variabilité inter- et intra-sites, nous avons identifié par PCR les espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* et déterminé la fréquence de la mutation kdr au sein des différentes populations. Dans tous les échantillons, *An. arabiensis* est présent à une fréquence relativement faible. *An. gambiae* forme S est trouvé presque exclusivement seul pendant la saison des pluies dans les sites cotonnier et urbain alors que la forme M domine dans le périmètre rizicole de la Vallée du Kou (tableau 21). La mutation kdr est observée uniquement chez la forme S et à une fréquence très élevée au sein de ces populations. La même analyse pendant la saison sèche en milieux cotonnier et urbain montre un accroissement des individus de la forme moléculaire M bien que les effectifs soient plus faibles qu'en saison des pluies (tableau 21). Cette variation temporelle dans la fréquence relative des espèces et formes moléculaires et la présence à une haute fréquence de la mutation kdr chez la forme S expliquent l'évolution de la résistance observée dans les différents sites d'étude lors du suivi longitudinal. À cela s'ajoutent des différences de pression de sélection dans les zones d'études car les modes et les fréquences d'utilisation des insecticides varient selon les cultures.

4.2.4 Etude des événements d'introgession au sein du complexe *An. gambiae* (cf article 7)

L'espèce *An. gambiae* est le taxon nominal d'un complexe d'espèces qui mobilise depuis plusieurs décennies l'attention de nombreux groupes de recherches dans le monde entier. De nombreuses données ont été accumulées tant au niveau de la bio-écologie que de la génétique chez ce complexe d'espèces. Les études des phénomènes de spéciation et d'introgession en particulier sont actuellement en plein essor et sont d'autant plus justifiées à l'heure où la publication de la séquence complète et annotée du génome d'*An. gambiae* est imminente. Le passage exceptionnel de gènes qui ont un avantage sélectif est toujours possible entre les différentes espèces du complexe ou entre les formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. par l'intermédiaire de femelles hybrides fertiles et plusieurs arguments suggèrent

qu'il a lieu effectivement en conditions naturelles (Powell *et al.* 1999; Weill *et al.*, 2000). Dans notre étude nous avons détecté la mutation kdr à la fois chez les deux formes d'*An. gambiae* s.s. et chez un individu d'*An. arabiensis*. Une amplification spécifique des allèles sensible/résistant a été effectuée chez différents spécimens pour comparer la variation intra et inter-spécifique de la séquence de l'intron situé en amont de la mutation kdr. Ceci dans le but de comprendre l'historique du (des) événement(s) mutationnel(s) et l'expansion de la mutation kdr au sein du complexe *An. gambiae*. L'intron situé en aval a peu d'intérêt car il ne présente aucun polymorphisme comme mentionné par Weill *et al.*, (2000). Il n'a donc pas été pris en compte dans notre étude.

Au total 35 spécimens d'*An. gambiae* et 5 d'*An. arabiensis* ont été analysés. Un polymorphisme de sites a été observé au niveau de cet intron. Il s'est avéré que quatre nucléotides différiaient les deux espèces jumelles alors que *An. gambiae* forme S se distinguait de la forme M par deux nucléotides en position 702 et 896 (tableau 22). La forme S, à ces deux positions, est caractérisée par la combinaison T-C quel que soit son génotype pour la mutation kdr (RR, RS ou SS) alors que la forme M présente un profil différent. Les individus M homozygotes sensibles ont tous la combinaison C-A ou C-C alors que les résistants homozygotes, comme les individus S, présentent uniquement la combinaison T-C. Quant aux résistants hétérozygotes, ils se caractérisent sur l'allèle sensible par la combinaison C-A ou C-C et par la combinaison T-C sur l'allèle résistant (tableau 22).

Tableau 22 : Polymorphisme de l'intron 1 en position 702 et 896 situé a proximité de la mutation kdr chez des populations sauvages d'*An. gambiae*.

	Génotype sensible SS					Génotype résistant RR/RS			
	C-A	C-	C-C	T-C	T-	C-A	C-C	T-C	T-
<i>Taxon M</i>									
VK7	2	0	11	0	0	0	0	5	0
Léna	0	0	2	0	0	-	-	-	-
Total	2	0	13	0	0	0	0	5	0
<i>Taxon S</i>									
VK7	-	-	-	-	-	0	0	8	0
Léna	0	0	0	3	0	0	0	4	0
Total	0	0	0	3	0	0	0	12	0

Il ressort de ces résultats que la mutation kdr est apparue au sein de la forme S d'*An. gambiae* puisque tous les individus appartenant à cette forme présentent, indépendamment de leur génotype pour la résistance, la même combinaison T-C. Le gène serait ensuite passé par introgression de la forme S à la forme M dont seul l'allèle résistant affiche la combinaison caractéristique de la forme S. Ceci confirme que la barrière reproductive n'est pas complète entre les deux formes moléculaires de l'espèce.

Dans le cas d'*An. arabiensis*, outre les deux sites en position 702 et 896 qu'il partage en commun avec l'une des deux formes d'*An. gambiae*, il se différencie par quatre autres nucléotides en position 494, 824, 830 et 835 (tableau 23). Ces quatre sites caractéristiques d'*An. arabiensis*, présentant la combinaison G-A-A-T, sont bien conservés chez les individus sensibles homozygotes. Par contre chez le seul spécimen résistant hétérozygote analysé, l'allèle mutant affiche la combinaison T-A-A-T alors que l'allèle sensible conserve la séquence typique. Cet individu se caractérise donc par un T en position 494 à la place d'un G,

nucléotide qui est propre à *An. gambiae*. Toutefois compte tenu du faible nombre d'*An. arabiensis* séquencé, il est probable que ce premier nucléotide soit un site polymorphe au sein de cette espèce. Dans ce cas la mutation kdr présente chez *An. arabiensis* serait due à un événement indépendant de celui survenu chez *An. gambiae* s.s. Il est donc important de poursuivre les investigations afin d'étudier un plus grand nombre d'individus sensibles et si possible résistants.

Tableau 23: Amplification spécifique d'allèle de l'intron 1 de la mutation kdr suivie de séquençage chez des populations sauvages et de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.l.

n° de moustique	génotype kdr	allèle amplifié	espèce/forme moléculaire	Position des nucléotides					
				494	702	824	830	835	896
1	SS	S	<i>An. gambiae</i> S	T	T	T	G	A	C
2	RR	R		T	T	T	G	A	C
3	RS	R		T	T	T	G	A	C
		S		T	T	T	G	A	C
4	SS	S	<i>An. gambiae</i> M	T	C	T	G	A	C/A
5	RR	R		T	T	T	G	A	C
6	RS	R		T	T	T	G	A	C
		S		T	C	T	G	A	C/A
8	SS	S	<i>An. arabiensis</i>	G	C	A	A	T	C
9	RS	R	<i>An. arabiensis</i>	T	C	A	A	T	C
		S		G	C	A	A	T	C

4.3 Discussion

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides constitue un obstacle majeur à la lutte antivectorielle. La présente étude a permis de montrer que les populations d'*An. gambiae* sont résistantes aux pyréthrinoides sur l'ensemble du territoire Burkinabè. La répartition géographique de cette résistance est cependant inégale et affiche un gradient croissant du Nord-Est, zone sahélienne vers le Sud-Ouest, zone soudanienne. Cela tient à la fois à la distribution géographique des espèces et formes d'*An. gambiae*, à la présence du principal mécanisme de résistance essentiellement chez une seule des formes moléculaires, et à la pression de sélection insecticide qui peut être soit d'origine agricole soit domestique.

L'impact des traitements agricoles sur la résistance des vecteurs a été montré dans de nombreuses études. La résistance à la dieldrine d'*An. gambiae*, par exemple, a été enregistrée dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest entre 1953 et 1963 où cet insecticide n'avait jamais été utilisé dans le domaine de la santé publique (Mouchet, 1988). En 1960 quand l'utilisation du DDT en pulvérisation intradomiciliaire à Bobo-Dioulasso a été stoppée, *An. gambiae* était sensible à cet insecticide. Cependant en 1967, la résistance au DDT est apparue suite à son introduction pour traiter les plants de cotonnier (Hamon et al., 1968). Brun et Sales (1975) attribuent la résistance à la dieldrine d'*An. funestus* à la pression de sélection exercée par la culture de coton à Soumouso au Burkina Faso. Enfin, Lines (1988) cite un exemple au Salvador où des auteurs ont remarqué en 1972 une baisse importante de la densité anophélienne dans une région où des organophosphorés avaient été utilisés sur le coton. Dans le même temps, ces densités restaient normales dans une zone contrôle, non traitée. Cinq années plus tard, des densités comparables étaient retrouvées dans les 2 zones (cotonnière et non cotonnière), même pendant la saison de culture du coton. La résistance ainsi apparue était à mettre au compte de l'utilisation de ces insecticides en agriculture. Cette hypothèse était soutenue par quatre arguments indirects:

- i-Le niveau de la résistance était plus élevé dans la zone cotonnière que dans la zone non cotonnière,
- ii-Le niveau de la résistance était plus élevé pendant la période de traitement du coton et déclinait après cette période,
- iii-L'utilisation de ces insecticides en agriculture a dramatiquement réduit les populations de moustiques au début et non plus tard quand la résistance avait atteint un niveau élevé,
- iv-la résistance était rencontrée aussi bien chez les adultes que chez les larves.

La pression de sélection de la résistance exercée par les insecticides agricoles est d'autant plus importante qu'elle s'exerce sur les larves dans leur gîtes naturels à la faveur des eaux de ruissellement qui charrieraient l'insecticide appliqué aux cultures, en particulier au coton, dans les dépressions du sol qui sont des gîtes de moustiques. Pour l'heure aucune étude n'a véritablement recherché la présence de résidus d'insecticides dans les gîtes de moustiques par dosage HPLC. Cependant une étude réalisée en Côte d'Ivoire sur le rendement d'émergence de deux souches d'*An. gambiae* mises en eau de gîtes collectée en zone cotonnière a montré que Kisumu, la souche de référence sensible aux insecticides se développait très mal par rapport à la souche résistante VKPer.

Le Sud-Ouest du Burkina est la principale région agricole avec une utilisation massive de pyréthrinoïdes sur les plants de cotonnier. On a observé une variation spatiale et temporelle de la résistance dans cette zone. Cette fluctuation tient à l'écologie du milieu dont les caractéristiques déterminent la distribution des espèces et formes d'*An. gambiae* et conditionnent les types de cultures pratiquées et donc la nature des traitements insecticides. En rizière (VK5), *An. gambiae* M qui colonise ce milieu reste sensible aux pyréthrinoïdes en toutes saisons d'autant plus que la pression de sélection est très faible. À l'inverse une résistance de la population anophélienne à la perméthrine est observée à Léna pendant la saison des pluies en pleine campagne cotonnière alors qu'une sensibilité normale est obtenue

en saison sèche. Suivant la disponibilité des gîtes larvaires, *An. gambiae* forme S résistante domine pendant la saison des pluies, au moment des traitements insecticides, et *An. gambiae* M prend le relais en saison sèche. Une augmentation de la fréquence relative d'*An. arabiensis* est observée par la même occasion. La résistance d'*An. gambiae* à la perméthrine en toutes saisons à Bobo-Dioulasso, milieu urbain, est la conséquence d'une pression insecticide continue même en saison sèche où la faune résiduelle culicidienne est essentiellement constituée de *Cx. quinquefasciatus*, moustiques dont la nuisance entraîne l'utilisation des tortillons et des aérosols. Dans une étude conduite en 1993 à Bouaké, l'équipe de l'IPR a signalé la présence de populations d'*An. gambiae* résistante à la perméthrine à Bouaké (Elissa *et al.*, 1993). Cette résistance a été attribuée à la pression sélective exercée par l'utilisation des bombes aérosols dans la ville de Bouaké. En milieu urbain, il existe d'autres utilisations des insecticides qui exercent de ce fait une pression de sélection intense sur la faune anophélienne. Les cultures maraîchères aussi sont à la base de la sélection de la résistance chez *An. gambiae* en milieu urbain, car elles sont constamment traitées aux insecticides, qui du reste sont les mêmes que ceux utilisés sur le coton. Le milieu urbain est probablement la zone où les moustiquaires imprégnées ont de grandes chances d'être rapidement intégrées dans l'arsenal de lutte contre les moustiques à cause de la forte nuisance de piqûres due à *Cx. quinquefasciatus* et du pouvoir d'achat de la communauté. Il faut craindre que le niveau de résistance observé dans ce milieu ne soit préjudiciable à l'utilisation des MII d'autant plus que *Cx. quinquefasciatus* est pratiquement résistant à toutes les familles d'insecticides.

Les hydroaménagements agricoles constituent un milieu particulier dont l'écologie est favorable à *An. gambiae* M. Elle a été la forme majoritaire d'*An. gambiae* rencontrée dans tous les périmètres irrigués de notre étude. Une sensibilité normale aux pyréthrinoïdes a été observée dans la plupart des sites à l'exception de VK7, un quartier rizicole situé à l'interface riziculture/coton. Cette résistance tardive observée en fin de saison de pluies dans ce milieu

est consécutive à un envahissement progressif d'*An. gambiae* forme S résistante en provenance des villages environnants de la zone cotonnière.

La mutation kdr a été identifiée comme principal mécanisme de la résistance à la perméthrine chez les différentes populations étudiées. Elle aurait été sélectionnée antérieurement par l'usage massif du DDT en agriculture et maintenue grâce à l'utilisation actuelle des pyréthrinoïdes pour la protection des cultures (Chandre *et al.*, 1999b). Cette résistance a été reportée chez plusieurs insectes comme la conséquence d'une mutation de la leucine en phénylalanine sur la séquence du gène codant pour le canal sodium (Williamson *et al.*, 1996, Miyazaki *et al.*, 1996, Martinez *et al.*, 1998). C'est la même mutation qui est retrouvée chez les populations d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Ouest (Martinez *et al.*, 1998). Par contre, c'est une autre mutation, la leucine en serine, qui est décrite chez les populations d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Est (Ranson *et al.*, 2000a). Enfin, une troisième mutation de la leucine en histidine, toujours à la même position, a été rencontrée chez des populations de ravageurs de tabac, *Heliothis virescens* résistantes aux pyréthrinoïdes (Park & Taylor, 1997). Le caractère conservé des mutations qui s'opèrent toujours au même endroit chez différentes espèces d'insectes, suggère que seule une mutation sur cet acide aminé est capable de conférer à l'insecte une forte résistance, tout en gardant la fonctionnalité du récepteur (Ffrench-Constant *et al.*, 1994). Même si la mutation kdr a été décrite comme le principal mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'Ouest (Chandre, 1998), il existe néanmoins d'autres mécanismes. C'est ainsi qu'une résistance de type enzymatique, en l'occurrence les oxydases, a été observée chez des populations d'*An. gambiae* du Kenya, de la Côte d'Ivoire et du Cameroun (Ranson *et al.*, 2000a., Chandre, com. pers ; Etang, com. pers). La résistance d'*An. gambiae* forme M de la Vallée du Kou au DDT, malgré la faible fréquence de la mutation kdr qu'on y observe, laisse supposer la présence d'un mécanisme enzymatique de type glutathion-S-transférases.

Malgré des forts niveaux de résistance obtenus à la perméthrine, les populations d'*An. gambiae* du Burkina montrent globalement une bonne sensibilité à la deltaméthrine. C'est aussi le cas en Côte d'Ivoire et au Bénin (Chandre, 1998 ; Akogbeto com. pers.). Bien que notre étude n'ait pas pris en compte *An. funestus*, il faut signaler que ce moustique est sensible à l'ensemble des trois insecticides testés dans le cadre de ce travail (Diabaté, 1999).

La mutation kdr s'est révélée être un marqueur important du phénomène de spéciation en cours au sein d'*An. gambiae* s.s.. L'absence de cette mutation kdr au sein d'*An. gambiae* M, même vivant en sympatrie avec la forme S résistante dans les zones cotonnières, est difficile à expliquer. Cependant considérant que l'apparition de la résistance dans une population est consécutive à une pression de sélection intense, il semblerait que *An. gambiae* forme M n'est pas soumise, dans les conditions naturelles, à une forte sélection. L'écologie et la dynamique saisonnière de ce moustique confirment cette hypothèse, car la forme M ne s'installe véritablement qu'en saison sèche à Léna, milieu cotonnier, quand les traitements insecticides sont pratiquement arrêtés. Néanmoins, si on considère que les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*, constituent une population homogène à l'intérieur de laquelle les croisements seraient panmictiques, la mutation kdr devrait alors être observée chez les deux formes en zone de sympatrie. L'absence de cette mutation chez la forme M est un argument démontrant l'existence d'une barrière reproductive au sein d'*An. gambiae* (Chandre *et al.*, 1999, della Torre *et al.*, 2001). Ce d'autant plus que le gène codant pour le canal sodium est localisé en dehors des zones d'inversion chromosomique sur le bras gauche du chromosome 2 et donc qu'il n'est à priori pas soumis aux contraintes environnementales impliquées dans la sélection de ces arrangements (Collins *et al.*, 1987 ; Ranson *et al.*, 2000b). Cependant la nature et le mécanisme de cet isolement génétique ne sont pas encore élucidés et cette barrière peut être soit pré-copulatoire, consécutive à des composantes éthologiques, ou post-

copulatoire avec un désavantage sélectif des individus hybrides (Coluzzi *et al.*, 1985, Touré *et al.*, 1998). Des études récentes sur le terrain ont confirmé le caractère préférentiel des croisements au sein d'*An. gambiae* (Tripet *et al.*, 2001). Néanmoins, certaines études ont tenté vainement de mettre en évidence, dans plusieurs parties du génome, des différences entre les deux formes moléculaires (Gentile *et al.*, 2001; Mukabayire *et al.*, 2001; Lanzaro *et al.*, 1998). À cela il faut ajouter que les deux formes moléculaires sont parfaitement interfécondes au laboratoire et les individus hybrides restent viables et fertiles (Chandre *et al.*, 1999). L'explication la plus plausible est que l'isolement génétique entre les deux formes est trop récent pour permettre, même aux régions non-codantes du génome de se différencier (Gentile *et al.*, 2001).

La découverte récente de la mutation *kdr* chez la forme M d'abord sur le littoral des pays côtiers d'Afrique de l'Ouest, puis de plus en plus à l'intérieur des terres comme à la vallée du Kou et à Bouaké en Côte d'Ivoire (Chandre com. pers.), montre que l'on assiste à un phénomène dynamique et que la barrière reproductive entre les deux formes moléculaires n'est probablement pas aussi complète qu'on le suppose (Weill *et al.*, 2001 ; Fanello *et al.*, 2000 ; Black et Lanzaro 2000 ; Taylor *et al.*, 2001 ; Tripet *et al.*, 2001). Ce gène après être passé par introgression chez la forme M sur le littoral, peut avoir envahi l'intérieur des terres par un phénomène de migration, mais il est possible également qu'il soit apparu dans plusieurs zones de savane à la faveur de plusieurs phénomènes d'introgression indépendants. Cette dernière hypothèse nous semble la plus probable, car seule la population d'*An. gambiae* M de la vallée du Kou possède la mutation *kdr* au Burkina Faso, et que ce site est plus éloigné du littoral que d'autres localités de notre étude où la forme M est toujours sensible. Les études menées en Côte d'Ivoire sur la distribution de ce marqueur génétique au sein des populations M suivant un transect du littoral vers l'intérieur des terres en tenant compte des facteurs

écologiques permettront de comprendre davantage ce processus de spéciation en cours au sein d'*An. gambiae* s.s..

La mise en évidence de la mutation kdr au sein de la forme M et chez *An. arabiensis* bien que son origine demeure encore incertaine, suggère que la distribution de la résistance va rapidement s'étendre à des zones jusque là épargnées. La résistance aux pyréthrinoides risque potentiellement de s'étendre à toute l'aire de distribution de ces deux membres du complexe *An. gambiae* si les pressions de sélection sont suffisantes. Il est donc nécessaire d'envisager et de tester dès à présent des stratégies de gestion de la résistance chez ce vecteur majeur du paludisme en Afrique afin de disposer d'alternatives aux pyréthrinoides pour éviter que la résistance n'atteigne un seuil qui ne soit plus contrôlable.

V CONCLUSION

Le paludisme a pu être contrôlé efficacement dans certaines régions du monde en partie grâce à des programmes de lutte antivectorielle basés sur l'aménagement de l'environnement et la pulvérisation intra-domiciliaire (Greenwood, 1997). En zone tempérée en Europe, un système intégré de lutte alliant le contrôle des vecteurs et une meilleure organisation du système de santé a permis d'éradiquer la maladie. La transmission du paludisme au Sud du Sahara est caractérisée par la présence de plusieurs bons vecteurs qui s'adaptent bien à leur environnement et cette ubiquité des vecteurs fait de l'Afrique un énorme foyer ininterrompu de paludisme (Mouchet *et al.*, 1993). L'extrême pauvreté des pays les plus touchés, le manque de volonté politique et la mauvaise organisation des systèmes de santé rendent le contrôle du paludisme extrêmement difficile en Afrique. L'impact de la maladie en terme de santé publique augmente au fil du temps à cause des modifications de l'environnement et des phénomènes de résistance des parasites aux antimalariques et des vecteurs aux insecticides.

En travaillant sur deux espèces de moustiques d'intérêt majeur en santé publique dans différents milieux écologiques, nous nous sommes attachés à dégager la part respective de chacune des deux espèces dans la transmission du paludisme et à étudier la résistance de l'espèce vectrice majeure aux pyréthriinoïdes, seuls insecticides disponibles en ce moment pour l'imprégnation des moustiquaires.

Au plan de la transmission, notre étude entreprise à la suite de celles réalisées dans les années 80 dans les mêmes contextes écologiques a révélé une modification de l'environnement dans certains milieux. Cette dégradation du milieu a favorisé la prolifération d'*An. gambiae* à la Vallée du Kou et conséquemment une augmentation de la transmission plus étalée dans le temps. Un profil similaire a été observé en milieu urbain où nous assistons à un accroissement du risque palustre. Seul le milieu rural classique a montré un niveau de transmission comparable à celui observé en 1986, probablement parce qu'il n'a pas connu de changements notables. Même si nous y avons assisté à une participation importante d'*An. funestus* à la transmission au détriment d'*An. gambiae*, son intensité est restée la même pendant les trois années d'étude. L'accroissement du risque palustre observé dans les deux autres sites d'étude est probablement lié à beaucoup de facteurs dont une augmentation de la résistance du parasite aux antimalariques et une détérioration des pratiques agricoles. L'exemple de la Vallée du Kou en est une bonne démonstration. Dans les années 70 quand le périmètre a été mis en place, les paysans s'y sont installés et ont bénéficié à cette époque d'un encadrement conséquent et d'une bonne assistance pour l'écoulement de leur production. Par la suite, les paysans livrés à eux mêmes ont dû faire face à une filière du riz mal organisée. À cela s'ajoute la pression démographique, car les familles nucléaires pour la plupart se sont agrandies au fil du temps, mais les superficies cultivables qui leur ont été attribuées au départ

sont restées les mêmes. Les paysans sont donc obligés de rechercher des ressources alternatives avec d'autres cultures, comme le maïs et le coton. Cette double occupation, souvent mal coordonnée a des conséquences sur le cycle des parcelles rizicoles où on observe un manque total de synchronisation des travaux sur l'ensemble du périmètre irrigué. Certains casiers rizicoles sont au stade épiaison pendant que d'autres en sont encore à la mise en eau mettant ainsi à la disposition des moustiques des gîtes de reproduction de façon permanente. À cela s'ajoute le manque d'entretien des canaux de drainage qui favorise le développement d'*An. funestus* dans la transmission du paludisme. Une meilleure organisation de la filière avec un suivi permanent et régulier des paysans dans de tels aménagements seraient bénéfiques tant sur le plan de la santé que de l'autosuffisance alimentaire. Le milieu urbain, autrefois préjudiciable au paludisme subit de plus en plus de profondes transformations anthropiques qui façonnent un nouvel environnement auquel s'adaptent mieux les vecteurs. Une intensification de la culture maraîchère aux abords des cours d'eaux crée des gîtes de reproduction favorable au développement d'*An. gambiae*. La stagnation de la transmission en milieu rural 10 ans après les dernières études montrent que le niveau de la transmission peut rester stable lorsque le milieu écologique n'a pas subi de pressions importantes.

L'augmentation de la chloroquinorésistance, qui se répercute sur la taille du réservoir de gamétocytes, pourrait en partie expliquer l'augmentation des niveaux de transmission. Même si la résistance observée à la chloroquine n'a pas atteint le seuil critique, l'élaboration d'autres alternatives thérapeutiques semble nécessaire à la fois pour améliorer l'efficacité des traitements et réduire la pression de sélection sur les parasites. La combinaison thérapeutique basée sur l'association de plusieurs molécules pourrait être une solution mais le surcoût d'une telle méthode risque de limiter son applicabilité compte tenu des faibles revenus de la population. Les Etats et les firmes pharmaceutiques devraient faire un effort pour amoindrir les charges en direction des familles. Un dernier travail, et

non des moindres, devrait s'opérer au niveau de chaque pays afin d'informer les populations à la prise correcte de ces médicaments.

La résistance aux insecticides est un phénomène qui est connu depuis les années 50. Elle a souvent été évoquée comme la cause majeure du succès limité de certains programmes de lutte antivectorielle. L'échec de la campagne d'éradication du paludisme dans les années 50/60 est attribué, au moins en partie, à la résistance des vecteurs aux organochlorés.

Les facteurs qui conditionnent l'évolution de la résistance dépendent à la fois de la biologie de l'insecte, de la nature des mécanismes impliqués et des aspects opérationnels liés aux traitements. À cela il faut ajouter les modifications de l'environnement dont l'interaction avec les autres paramètres de l'insecte est souvent mal appréhendé ou le sont de façon parcellaire (Chandre, 1998). Notre étude souligne, le rôle primordial que joue l'agriculture dans la sélection de la résistance chez les vecteurs du paludisme et il faut craindre que le phénomène ne s'aggrave dans les années à venir car la culture du coton qui consomme presque la quasi-totalité des insecticides au Burkina Faso s'étend à des zones qui en étaient jusqu'alors exemptes.

An. gambiae sl., comme beaucoup d'espèces ou de complexes d'espèces à large répartition, a un patrimoine génétique suffisamment riche, qui lui permet de s'adapter plus ou moins rapidement à des conditions environnementales très variées et notamment de constituer des populations résistantes aux insecticides. La mutation kdr est le mécanisme principal de résistance aux pyréthrinoïdes présent chez *An. gambiae* s.s.. Sa répartition inégale au sein des formes moléculaires M et S, bien que vivant en sympatrie, démontre l'existence de flux géniques très restreints au sein de cette espèce. Pour une meilleure compréhension de la biologie et de l'écologie des espèces vectrices, il importe d'étudier les modalités de circulation des gènes entre ces deux entités taxonomiques. L'observation récente de la mutation kdr chez la forme M dans plusieurs régions pose la question de l'intensité réelle du flux génique au sein de l'espèce. Au delà de l'intérêt scientifique, la

détection de la mutation kdr chez la forme M à une forte fréquence sur le littoral peut avoir des implications sur le plan opérationnel car elle risque de se propager rapidement au sein des populations naturelles de savane d'autant plus que la distribution de ce moustique forme un continuum de la zone de forêt aux régions semi-arides. Il est donc impératif de surveiller l'évolution de ce gène au sein des populations naturelles du littoral vers l'intérieur des terres en prenant bien soin de spécifier les paramètres écologiques dont l'apport est certainement important dans la vitesse de propagation des gènes.

L'inquiétude en ce moment est de savoir si le niveau de résistance actuel des populations naturelles peut avoir un impact négatif sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées ? Une étude en case-piège a montré que les moustiquaires imprégnées conservaient leur efficacité vis-à-vis des moustiques résistants et cela a été confirmé sur le terrain dans une étude conduite en zone de résistance de la Côte d'Ivoire (Darriet *et al.* 2000). Ce résultat s'explique par les actions antagonistes du gène kdr, à savoir une résistance à l'effet létal et une résistance à l'effet irritant des pyréthrinoïdes. Comme ils sont moins sensibles à l'effet irritant de ces produits, ils restent suffisamment longtemps au contact des moustiquaires imprégnées et finissent par prendre une quantité d'insecticide qui leur est fatale (Chandre *et al.*, 2000). Toutefois le risque d'apparition d'autres mécanismes qui augmenteraient de façon significative les niveaux de résistance actuels nécessite que des solutions alternatives soient mises en place et testées dès à présent. Les exemples de gestion réussie de la résistance aux insecticides en santé publique, sont rares. Le Programme de Lutte contre l'Onchocercose en Afrique de l'Ouest (OCP) a montré que les difficultés opérationnelles liées au développement de la résistance pouvaient être maîtrisées de façon raisonnée (Hougard *et al.*, 1993).

Les modèles théoriques de gestion de la résistance sont d'autant plus limités dans leur valeur prédictive qu'ils ne prennent en compte qu'un nombre restreint de paramètres et n'intègrent pas la biologie de l'insecte et la dynamique de ses populations (Guillet *et al.*, 1996). À cela il faut ajouter les facteurs externes propre à l'environnement que l'on ne maîtrise pas. Il s'agit essentiellement de la pression de sélection exercée par l'agriculture.

Les pays concernés sont hélas confrontés au double défi de l'autosuffisance alimentaire et de la santé publique. Ils mettent en général l'accent sur le secteur agricole en le dissociant de l'aspect santé et créent des ouvrages dont les retombées sont parfois néfastes au plan sanitaire. Toutefois des efforts sont faits pour développer des stratégies de contrôle de la résistance au niveau opérationnel (Leeper *et al.*, 1986), sachant que le contrôle des ravageurs agricoles est nécessaire pour obtenir des rendements suffisants. Elles sont basées sur l'utilisation de mélanges d'insecticides ayant des modes d'action différents, l'alternance de différents insecticides dans le temps (rotation d'insecticides) ou dans l'espace (traitement en mosaïque). Des études de mélanges d'insecticides pour l'imprégnation des moustiquaires, (*i.e.* moustiquaires bi-traitées), sont en cours. Cette stratégie nouvelle vise à prévenir ou ralentir la sélection de la résistance chez le moustique. Elle cherche avant tout une synergie d'action entre les molécules utilisées (pyréthrinoides, carbamates, organophosphorés) afin de réduire significativement la pression de sélection sur les différents mécanismes de résistance spécifiques à chacun des insecticides. Des résultats intéressants sur l'effet synergiste de ces combinaisons ont été obtenus en laboratoire et confirmés sur le terrain (Corbel *et al.*, 2002 ; Guillet *et al.*, 2001 ; Hougard, com. pers.). Ces combinaisons présentent en outre l'avantage de réduire significativement la quantité de produits sur la moustiquaire.

Les molécules de rechange étant très limitées, une bonne gestion de la résistance commence d'abord par une utilisation rationnelle des insecticides que nous avons à porter de main. Dans un deuxième temps un suivi régulier de la résistance sur le terrain avec des méthodes de diagnostic fiables et performants doit être mis en place. Puis à chaque fois que la résistance est observée sur le terrain, mettre un accent particulier sur la recherche des mécanismes de cette résistance, sa dynamique dans l'espace et dans le temps afin de pouvoir proposer des combinaisons ou rotation d'insecticides qui tiennent compte de tous ces paramètres pour une meilleure gestion. Des solutions alternatives doivent être continuellement pensées avant même l'apparition de la résistance afin d'éviter que celle-ci n'apparaisse et atteigne un niveau à partir duquel les vecteurs ne soient plus contrôlables.

Le paludisme est une endémie en pleine recrudescence dans les pays tropicaux. Des études multidisciplinaires touchant à la fois les interactions hôte/parasite, la mise au point de vaccins et les moustiques génétiquement modifiés sont en cours, mais il semble hélas que nous soyons encore loin de la solution idéale. Le génome complet d'*An. gambiae* est aujourd'hui publié, mais il reste encore certainement du chemin à faire avant de pouvoir obtenir des solutions opérationnelles applicables sur le terrain. Pour l'heure les efforts sont fournis dans le sens de contrôler la maladie et les outils dont nous disposons pour atteindre cet objectif sont en nombres limités. Il convient de les utiliser judicieusement afin de pouvoir en conserver le bénéfice aussi longtemps que possible. Les matériaux imprégnés d'insecticides sont censés rester un bon outil bien qu'imparfait dans la lutte contre le paludisme, parce que parallèlement à leur impact sur la maladie, ils diminuent significativement la nuisance provoquée par les moustiques, ce qui est probablement la meilleure motivation pour son utilisation à grande échelle. Cet outil de lutte connaît néanmoins des difficultés liées à sa disponibilité et au coût qui reste hélas élevé pour beaucoup de familles africaines. À cela il faut ajouter les barrières culturelles et le faible niveau d'instruction des populations qui freinent la vulgarisation de l'outil.

La lutte contre le paludisme au plan entomologique passera avant tout par une meilleure compréhension de la biologie et de l'écologie des espèces vectrices afin de pouvoir efficacement utiliser les outils de lutte, qu'ils soient chimiques ou génétiques, à notre disposition. À ce sujet, la publication de la séquence du génome d'*An. gambiae* est une avancée scientifique importante. Elle ouvre des perspectives de recherches intéressantes alliant la génomique à la bio-écologie du moustique. Une véritable synergie d'action doit s'établir entre les laboratoires du Sud et ceux du Nord. Les différentes équipes doivent conjointement travailler sur des programmes de recherche diversifiés sur le terrain en relation avec les 15 000 gènes identifiés à partir du génome d'*An. gambiae* en ayant toujours à l'esprit leur aspect pratique opérationnel.

REFERENCES

- Aldous P (1993). Malaria : focus on mosquitoes genes. *Sciences* 261 : 546-547.
- Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong Schellenberg JRM, Conteh M, Hill AG, David PH, Fegan G, de Francisco A, Hall AJ, Shenton FC, Cham K & Greenwood BM (1991). The effect of insecticide-treated bednets on mortality of Gambian children. *Lancet*, **337** : 1499-1502.
- Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong Schellenberg JRM, Keita K, Gomez P, Shenton FC, Hill AG, David PH, Fegan G, Cham K et Greenwood BM (1993). A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of the Gambia, west Africa. 6. The impact of the interventions on mortality and morbidity from malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**, supplement 2, 37-44
- Anonyme (1997). Rapport technique sur la campagne agricole cotonnière 1996/97. 33p.
- Baldet T, (1995). Etude comparative de deux stratégies de lutte contre *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 par *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 dans la ville de Maroua (Nord Cameroun). Thèse Université de Montpellier II 294p.
- Beach RF, Ruebush II TK, Sexton JD, Bright PL, Hightower AW, Breman JG, Mount DL et Oloo AJ (1993). Effectiveness of permethrin-impregnated bednets and curtains for malaria control in holoendemic area of Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33** : 783-788.
- Binka, FN, Kubaje A, Adjuik M, Williams LA, Lengler C, Maude GH, Arma GE, Kajihra B, Adiamo JH et Smith PG (1996). Impact of permethrin treated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Tropical Medicine and International Health*, **1**, 147-154.
- Black WC IV et Lanzaro GC (2001). Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss: introgressive hybridization, adaptative inversions or recent reproductive isolation? *Insect Mol Biol*, **10**, 3-7.
- Bruce-Chwatt L J (1988). History of malaria from prehistory to eradication, p. 1-59. In *W. Wernsdorfer and I McGregor* (ed.), *Malaria. Principles and Practice of Malariology* vol. 1. Churchill Livingstone, Edingburgh, United Kingdom.
- Brun LO et Sales S (1975). Evolution de la résistance à la dieldrine d'une population sauvage d'*Anopheles funestus* Giles en l'absence de traitements sélectifs délibérés. Rap. ronéot. OCCGE-ORSTOM, *Lab. Entomologie, Bobo-Dioulasso, N° 15/Ent/75 du 25.11.1975*.
- Bryan JH, Petrarca V, DI Deco MA et Coluzzi M (1987). Adult behaviour of members of the *Anopheles gambiae* complex in the Gambia with references to *An. melas* and its chromosomal variants. *Parasitologia*, **29**:221-249.

- Bryan JH, DI Deco MA, Petrarca V et Coluzzi M (1982). Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.s. in the Gambia, West Africa. *Genetica* **59** : 167-176.
- Burkot TR, Williams JL et Schneider I (1984). Identification of *Plasmodium falciparum* infected mosquitoes by a double enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33** : 783-788.
- Carnevale P et Robert V (1987). Introduction of irrigation in Burkina Faso and its effects on malaria transmission. In *Effects of agricultural development on vector-borne diseases*. Rapport FAO : AGL/MISC/12/87, 57-67.
- Carnevale P, Robert V, Boudin G, Gazin P, Halna JM, Pazart L, Richard A et Mouchet J (1988). La lutte contre le paludisme par les moustiquaires imprégnées de pyrethrinoides au Burkina Faso. *Bulletin de Société de Pathologie Exotique* **81** : 832-846.
- Carnevale P et Mouchet J (1990). Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. *Méd. Trop.*, **50** : 391-398.
- Carnevale P, Guillet P, Robert V, Fontenille D, Doannio J, Coosemans M et Mouchet J (1999). Diversity of malaria in rice growing areas of the Afrotropical region. *Parassitologia* **41** : 273-276.
- Chandre F (1998). Résistance d'*Anopheles gambiae* giles et de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles. Thèse, Université de Paris XII 112p.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P & Guillet P (1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west africa and further evidence for reproductive isolation of the mopti form. *Parassitologia* **41** :319-322.
- Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P and Guillet P (1999b). Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J. Am. Mosq. Control Assoc* **15** :53-9.
- Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P et Guillet P (2000). Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, **14** : 81-88
- Chapman RF (1969). The insects, structure and function. The English Universities Press Ltd. London, UK:819p.
- Chinery WA (1984). Effects of ecological changes on the malaria vectors *Anopheles funestus* and the *An. gambiae* complex of mosquitoes in Accra, Ghana. *J. trop. Med. Hyg.*, **87**:75-81.
- Chippaux JP et Akogbeto M (1991). Le paludisme urbain lagunaire. Le paludisme en Afrique de l'Ouest. Paris : ORSTOM, 37-53.

- Chritie M (1959). A critical review of the role of immature stages of anopheline mosquitoes in the regulation of adult numbers with particular reference to *Anopheles gambiae*. *Trop.Dis. Bull.*, **56**:385-399.
- Collins FH, Mendez AM, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, et Finnerty VA (1987) Ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37:37-41.
- Collins FH (1994). Prospects for malaria control through the genetic manipulation of its vectors. *Parasitology Today* **10(10)** : 370-371.
- Collins FH, Besansky NJ et Paskewitz SM (1994). Peut-on espérer interrompre le paludisme par des vecteurs génétiquement modifiés? *Annales de l'Institut Pasteur/actualités* **5(4)** : 324-329.
- Collins FH, James AA (1996). Genetic modification of mosquitoes. *Science & Medicine* (Nov-Dec) : 52-61.
- Coluzzi M (1984). Heterogeneities of malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **62(Suppl.)** :107-113.
- Coluzzi M, Petrarca V et Di Deco MA (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.*, **52**:45-63.
- Coluzzi M (1992). Malaria vector analysis and control. *Parasitology Today*, **8**, 113-118
- Coosemans MH, (1985). Comparaison de l'endémie malarienne dans une zone de riziculture et dans une zone de culture de coton dans la plaine de la Ruzizi, Burundi. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* **65 suppl. 2** : 187-200.
- Corbel V, Darriet F, Chandre F et Hougard JM (2002). Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. *Parasite* **9** : 255-259.
- Coz J, Escudié A et Sales P (1962). Rapport sur les moustiques et le paludisme dans Bobo-Dioulasso. Section Entomologie médicale et Paludisme du Centre Muraz, OCCGE.
- Craig GB Jr (1963). Prospects for vector control through genetic manipulation of populations. *Bull. WHO* **29**:89-97.
- Craig GB (1967). Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science* **156**:1499-1501.
- Crampton JM, Morris AC, Lycett GJ, Warren A et Eggleston P (1990). Transgenic mosquitoes : a future vector control strategy ? *Parasitology Today* **6** : 31-36.
- Curtis CF (1985). Genetic control of insect pests: growth industry or lead balloon? *Biological J. Linnean Soc.* **26**:359-374.

- Curtis CF (1994). The case of malaria control by genetic manipulation of its vectors. *Parasitology Today* **10(10)** : 371-374.
- D'Alessandro U, Olaleye BO, McGuire W, Languerock P, Bennett S, Aikins MK, Thomson MC, Cham MK, Cham BA et Greenwood BM (1995). Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of a treated bednet programme. *The Lancet*, **345**, 479-483.
- Danis M et Mouchet J (1991). Paludisme. Paris, Universités francophones UREF. 240pp.
- Darriet F, Robert V, Tho View N et Carnevale P. (1984). Evaluation of the efficacy of permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vector of malaria. WHO/VBC/84.889.
- Darriet F, (1991). Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyrethrinoïdes dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parassitologia* **33** : 111-119.
- Darriet F, Guillet P, N'Guessan RN, Doannio JMC, Koffi AA, Konan LY & Carnevale P, 1999. The impact of permethrin and deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae* s.s. on the efficacy of insecticide-treated mosquito nets. *World Health Organization*, **WHO/MAL/99.1088** : 20 pp.
- Darriet F, N'guessan R, Koffi AA, Konan L, Doannio JMC, Chandre F et Carnevale P (2000). Impact de la résistance aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans la prévention du paludisme : résultats des essais en cases expérimentales avec la deltaméthrine SC. *Bull Soc Pathol Exot* **93(2)** : 131-134
- Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-Yovo J, Favia G, Petrarca V & Coluzzi M (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Mol Biol* **10(1)**, 9-18.
- Della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR et Coluzzi M (2002). Speciation within *Anopheles gambiae*-the glass is half full. *Science* **298** : 115-117.
- Detinova TS (1962). Age grouping methods in Diptera of medical importance, with special reference to some vectors of malaria. World Health Organization, Geneva.
- Devonshire AL et Field LM (1991). Gene amplification and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **36**:1-23.
- Diabaté A. (1995). Impact des rideaux imprégnés d'insecticide sur les paramètres entomologiques de la transmission du paludisme. Mémoire de DEA. Université de Ouagadougou 57p.
- Diabaté A (1999). Evaluation de la résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrethrinoïdes au Burkina Faso. Thèse de 3^{ème} cycle, université de Ouagadougou 128p.

- Doannio JMC, Dossou-Yovo J, Diarassouba S, Rakotondraibé ME, Chauvancy G, Chandre F, Rivière F et Carnevale P (2002). La dynamique de la transmission du paludisme à Kafiné, un village rizicole en zone de savane humide de Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* 95, 1 : 11-16.
- Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY et Yao K (1993). Resistance of *Anopheles gambiae* ss. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 73, 291-294.
- Fanello C, Akogbeto M & Della Torre A (2000). Distribution of the pyrethroid knockdown resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94 : 132.
- Favia G, della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N'F, Touré YT & Coluzzi M, (1997). Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 6(4) : 377-383.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I & Louis C, (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Mol Biol* 10(1), 19-23.
- French-Constant RH (1994). The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24(4) : 335-345.
- Fontenille D et Campbell GH (1992). Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar ? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(1) :28-30.
- Fontenille D, Lochouarne L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, Konate L, Faye F, Rogier C et Trape JF (1997). High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(3) : 247-253.
- Fontenille D et Lochouarn L (1999). The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia* 41 : 267-271.
- Fontenille D, Meunier JY, Nkonjio CA et Tchuinkam Timoléon (2001). Use of circumsporozoite protein enzyme-linked immunosorbent assay compared with microscopic examination of salivary glands for calculation of malaria infectivity rates in mosquitoes (*Diptera : Culicidae*) from Cameroun. *J. Med. Entomol.* 38(3) : 451-454.
- Gazin P, Robert V et Carnevale P (1985). Etude longitudinale des indices paludométriques de deux villages de la région de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.* 65, suppl.2 : 181-186.
- Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR and Caccone A (2001). Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 10, 25-32.
- Gillies MT et De Meillon B (1968). The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. *Inst. Med. Res.* 54 : 343p.

- Gillies MT et Coetzee M (1987). A supplement to the *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. Pub. South Afr. *Inst. Med. Res.* **55** : 143p.
- Grant DF et Matsumura F (1988). GST1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **33**:132-143.
- Graves PM, Brabin BJ, Charlwood JD, Burkot TR, Cattani JA, Ginny M, Paino J, Gibson FD et Alpers MP (1987). Reduction in incidence and prevalence of *Plasmodium falciparum* in under-5-year-old by permethrin impregnation of mosquito nets. *Bulletin of the World Health Organisation*, **65** : 869-877.
- Greenwood BM (1997). Malaria transmission and vector control. *Parasitology Today* **13** (3) : 90-92.
- Guiguemdé TR, Aouba A, Ouédraogo JB et Lamizana L (1994). Ten years surveillance of drug-resistance malaria in Burkina Faso (1982-1991). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50** : 699-704.
- Guillet P, Chandre F et Mouchet J (1996). Vector insecticide resistance and limit of prediction. In Proc. 10th European SOVE Meeting. Strasbourg, France : 75-76.
- Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Lamizana TM, Chandre F et Carnevale P (2001). Combined pyrethroid and carbamate « two-in-one » treated mosquito nets : field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *J Med Vet Entomol* **15** : 105-112.
- Hama H (1983). Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of AChE. In: G.P. Georgiou and T. Saito, editor, *Pest resistance to pesticide*. New York: Plenum pp.231-299
- Hamon J, Adam JP et Grjebine A (1956). Observations sur la répartition et le comportement des anophèles de l'Afrique équatoriale française, du Cameroun et de l'Afrique occidentale. *Bull. Wld Hlth Org.* **15** : 549-591.
- Hamon J et Garrett-Jones C (1963). La résistance aux insecticides chez les vecteurs majeurs du paludisme et son importance opérationnelle. *Bull. Org. Mond. Santé*, **28**:1-24.
- Hamon J, Sales S et Coz J (1968). Données récentes sur la résistance aux insecticides chez les membres du complexe *Anopheles gambiae* et chez *An. funestus*. *Rap. final VIII^e conférence techn. OCCGE*.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J et Coetzee M (2000). *Anopheles funestus* resistant to pyrethroids insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology* **14** : 181-189.
- Hemingway, J. & Georgiou, J. P. (1983). Study on AChE of *Anopheles albimanus* resistant and susceptible to organophosphate and carbamate insecticides. *Pest. Biochem. Physiol.* **19**:167-171.

- Hemingway J, Jayawardarna KGJ et Herath PRJ (1986). Pesticide resistance mechanisms produced by field selection pressures on *Anopheles nigerrimus* and *Culex culicifacies* in Sri Lanka. *Bull. World Health Org.* **64**:753-758.
- Hemingway J, Small GJ, Monro A, Sawyer BV et Kasap H (1992). Insecticide resistance gene frequencies in *Anopheles sacharovi* population of Cukurova plain, Adan province, Turkey. *Med. Vet. Entomol.* **6**:342-348.
- Hougard JM, Poudiougou P, Guillet P, Back C, Akpoboua LKB et Quilévééré D (1993). Criteria for the selection of larvicides by the onchocerciasis control Programme in West Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **87**(5) : 435-442
- Hunt RH, Coetzee M et Fettene M (1998). The *Anopheles gambiae* complex : a new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92** : 231-235.
- Julvez J, Mouchet J, Michault A, Fouta A et Hamidine M (1997). Eco-épidémiologie du paludisme à Niamey et dans la vallée du fleuve, République du Niger, 1992-1995. *Bull. Soc. Path. Ex.* **90** (2) : 94-100.
- Karch S, Garin B, Asidi N, Manzambi Z, Salaun JJ et Mouchet J (1993). Moustiquaires imprégnées contre le paludisme au Zaïre. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.* **75** : 37-53.
- Kidwell MG et Ribeiro JMC (1992). Can trasposable elements be use to drive disease refractoriness genes into vector populations ? *Parasitology today* **8** : 325-329.
- Knipling EF, Laven H, Craig GB Jr, Pal R, Kitzmiller JB, Smith CN et Brown AWA (1968). Genetic control of insects of public health importance. *Bull. WHO* **38**:421-438.
- LaChance LE et Knipling EF (1962). Control of insect populations through genetic manipulations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **55**:515-520.
- Laclavère G, Bougnounou O, Compaoré G, Izard M, *et al.*, (1993). Atlas du Burkina éd. j. a. 54p.
- Lanzaro GC, Touré YT, Carnahan J, Zheng L, Dolo G, Traoré S, Petrarca V, Vernick KD et Taylor CE (1998). Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in West Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 14260-14265.
- Laventure S, Mouchet J, Blanchy S, Marrama L et Rajaonarivelo E (1996). Le riz, source de vie et de mort sur les Plateaux de Madagascar. *Cahiers Santé* **6** : 79-86.
- Leeper JR, Roush RT et Reynolds HT (1986). Preventing or managing resistance in arthropods, *In* Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management Populations, Committee on strategies for the management of pesticide resistance pest populations (ed). National Academy Press, Washington, DC : 335-346.
- Lines JD, Curtis CF, Myamba J et Njau R (1985). Test of repelent or insecticide impregnated curtains against malaria vectors in Tanzania. WHO/VBC/85.920.

- Lines JD (1988). Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes? A look at the evidence. *Parasitology Today*, **4** :17-20.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N et Pauron D (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular biology*, **7**(2), 179-184.
- Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY et Matsumura F (1996). Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* **252**:61-68.
- Mouches C, Pasteur N, Berges JB, Hyrien O, Raymond M, de Saint Vincent BR de Silvestri M et Georghiou GP (1986). Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, **233**:778-780.
- Mouchet J (1988). Mini-review: agriculture and vector resistance. *insect science and its Applications*, **9**, 297-302.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A et Robert V (1993). Typology du paludisme en Afrique. *Cahiers santé* **3**(4) : 220-238.
- Mukabayire O, Caridi J, Wang X, Touré YT, Coluzzi M et Besansky NJ (2001). Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae* : evidence from rDNA and single-copy loci. *Insect Mol Biol* **10** : 33-46.
- Mutero A, Pralavorio M, Bride JM et Fournier D (1994). Resistance associated point mutations in insecticide insensitive AChE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:5922-5926.
- N'guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traoré-Lamizana M, Corbel V, Koffi AA et Chandre F (2003). Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Medical and Veterinary Entomology*, **17** : 1-7.
- OMS (1970). Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Dix-septième rapport du comité OMS d'experts des Insecticides. Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 1970 (OMS, série de rapports techniques, n° 443).
- OMS (1975). Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and Technics. Geneva.
- Oppenoorth FJ (1985). Biochemistry and physiology of resistance. In:G.A Kerkut et LI Gilbert, editors, *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*. vol. **12** Oxford:Pergamon pp.731-773.

- Ouedraogo JB, Guiguemdé TR et Gbary AR (1990). Surveillance passive de la chimiosensibilité palustre à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Médecine d'Afrique Noire* 35 : 261-265.
- Ouedraogo JB et Guiguemdé TR (1998). Dutheil Y, Tinto H, Traoré B, Zampa H, Tall F, Coulibaly SO et Guiguemdé TR (1998). In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to halofantrine compared with chloroquine, quinine and mefloquine in the region of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (West Africa). *Tropical Medicine and International Health* 3(5) : 381-384.
- Park Y et Taylor MJF (1997). A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27:9-13.
- Petrarca V, Vercruyse J et Coluzzi M (1987). Observations on the species of the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal River Basin. *Med. Veter. Entomol.*, 1:303-312.
- Powell JR, Petrarca V, della Torre A, Caccone A et Coluzzi M (1999). Population structure, speciation and introgression in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 41 : 101-113.
- Prapanthadara L, Hemingway J et Ketterman AJ (1995). DDT-resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) from Zanzibar, Tanzania based on DDT dehydrochlorinase activity of glutathione-S-transferases. *Bull. Entomol. Res.*, 85:267-274.
- Ranque P, Touré Y, Soula G, Le D Diallo Y, Traoré o, Duflo B et Balique H (1984). Use of mosquito nets impregnated with deltamethrin in mosquito control (abstract). *International Congress of Tropical Medicine and Malaria*, Calgary, pp. 124.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J and Collins FH (2000a). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology* 9(5) : 491-497.
- Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Prapanthadara, L, Hemingway, J, and Collins, F.H. (2000b). Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 9 : 499-507.
- Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, Ouedraogo V et Carnevale P (1985). La transmission du paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop. Suppl* 65 : 201-214.
- Robert V, Gazin P, Ouedraogo V et Carnevale P (1986). Le paludisme urbain à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* Vol XXIV n° 2 : 121-128.

- Robert V, Ouary B, Ouédraogo V et Carnevale P (1988). La succession des espèces anophélienne et le cycle du riz; étude écologique des Culicidae adultes et larvaires dans la rizière de la Vallée du Kou, Burkina Faso. *Acta, tropica*, **45**:351-359.
- Robert V (1989). La transmission du paludisme humain: la zone des savanes d'Afrique de l'Ouest. Thèse, Université de Paris 6 325p.
- Robert V, Carnevale P et Mouchet J (1989). Pyrethroids impregnated bed nets in the malaria control strategy at community level. *Acta Tropica* **46** : 267-268.
- Robert V et Carnevale P (1991). Influence of deltamethrin treatment of bed nets on malaria transmission in the Kou valley, Burkina Faso. *Bull. Wld Hlth Org.* **69** : 735-740.
- Rodhain F & Perz C (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, éditeur *Maloine s. a.* Paris, France 458p.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993). Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **49** : 520-529.
- Sexton JD (1994). Impregnated bed nets for malaria control: Biological success and social responsibility. *Am. J. Trop. Med Hyg.* **suppl.50 (6)** 72-81.
- Sinègre G, Babinot M, Vigo G, Gaven G et Julien JL (1993). *Bacillus sphaericus* et démoustication urbaine. Bilan de cinq années d'utilisation expérimental de la spécialité Sphérimos dans le sud de la France. Doc. EILDm n°62, 21p.
- Snow WF (1983). Mosquitoes production and species succession from an area of irrigated rice fields in the Gambia, West Africa. *J. Trop. Med. Hyg.*, **86**:237-245.
- Snow RW, Jawara M et Curtis CF (1987). Observations on *Anopheles gambiae* s.l. Giles (Diptera: Culicidae) during a trial of permethrin-treated bed nets in the Gambia. *Bulletin of Entomological Research*, **77**:279-286.
- Soderlund DM et Bloomquist JR (1990). Molecular mechanism of insecticide resistance. In: B.E. Tabashnik and R.T. Roush, editors, *Pesticid Resistance in Arthropods*. New York: Chapman and Hall, pp.58-96.
- Taylor C, Touré YT, Carnahan J, Norris DE, Dolo G, Traoré SF, Edillo FE and Lanzaro GC, (2001). Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* **157** : 743-759.
- Touré YT, Petrarca V et Coluzzi M (1983). Nuove entità del complesso *Anopheles gambiae* in Mali. *Parassitologia* **25**: 367-370.
- Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankaré O, Sow M, di Deco MA & Coluzzi M. (1994) Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s. str. In Mali, West Africa. *Genetica* **94**: 213-223.
- Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankaré O, Sow M, di Deco MA & Coluzzi M. (1998) The distribution and inversion polymorphism of

chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* **40**: 477-511.

Trape JF et Zoulani A (1987). Malaria and urbanisation in central Africa : the example of Brazaville. Part III. Relationships between urbanization and the intensity of malaria transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg suppl 2 (81)* : 19-25.

Trigg PI et Kondrachine AV (1998). The current global malaria situation, p. 11-22. In Irwin W. Sherman (ed.), *Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. ASM Press, Whanshigton D C.

Tripet F, Touré YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G and Lanzaro GC (2001). DNA analysis transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, **10**, 1725-1732.

Waterhouse DF, LaChance LE et Whitten MJ (1976). Use of autocidal methods. In: C.B. Huffaker, P.S. Messenger, editors, *Theory and practice of biological control*. New York: Academic press. pp 637-659.

Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pasteur N, Guillet P et Raymond M, (2000). The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol* **9(5)** : 451-455.

White GB (1974). *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **68** : 278-298.

White GB (1985). *Anopheles bwambae* sp. n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex (*Diptera: Culicidae*). *Sytem. Entomol.*, **10**:501-522.

Whitten MJ et Pal R (1974). Introduction In: R. Pal & M.J. Whitten, editors, *Genetic control of insects*. Amsterdam:Elsevier/Norh-Holland pp 1-16.

Whitten MJ et Foster GG (1975). Genetic methods of pest control. *Ann. Rev. Entomol.* **20**:461-476

WHO (1984). Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of vectors. *Mimeogr. doc. TDR/BCV/SWG/84.3* 33pp.

WHO (1995). Vector control for malaria and other vectors-born diseases. *Technical Report Series*, **857** : 91p.

WHO (1998a). Evaluation de la santé, *In Rapport sur la Santé dans le Monde. La vie au 21^e siècle, une perspective pour tous*. World Health Organization (ed.), Genève Suisse : 43-65.

WHO (1998b). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/MAL/98. 12, World Health Organization, Geneva.

- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA et Devonshire AL (1996). Identification of mutations in the housefly paratype channel sodium gene associated with Knockdown resistance (Kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.*, **252**:51-60.
- Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL et Andre RG (1987). Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull. Wld Hlth Org.* **65** : 39-45.
- Zavala F, Gwadz RW, Collins FH, Nussenzweig RS et Nussenzweig V (1982). Monoclonal antibodies to circumsporozoite protein identify the species of malaria parasite in infected mosquitoes. *Nature* **299** : 737-738.

ARTICLES PUBLIES, SOUS PRESSE, ACCEPTES OU SOUMIS

Article 1

Baldet T, Diabaté A & Guiguemdé TR (2003). Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama) Burkina Faso. *Cahier santé* : accepté.

**ETUDE DE LA TRANSMISSION DU PALUDISME EN 1999
DANS LA ZONE RIZICOLE DE LA VALLEE DU KOU (BAMA)
BURKINA FASO**

**MALARIA TRANSMISSION IN 1999
IN THE RICE FIELD AREA OF THE KOU VALLEY (BAMA)
BURKINA FASO**

Baldet T.¹, Diabaté A.¹,

Guiguemdé TR²

1 : Entomologiste Médical, Laboratoire de Parasitologie/Entomologie, Centre
Muraz 01 BP 153 Bobo-Dioulasso Burkina Faso - Tel : 226 97 01 02 - Fax : 226
97 04 57 - mail : mol@fasonet.bf

2 : Professeur, Responsable du Laboratoire de Parasitologie/Entomologie, Centre
Muraz 01 BP 153 Bobo-Dioulasso Burkina Faso

RESUME

Un suivi entomologique longitudinal a été réalisé en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (VK5 : centre ; VK7 : périphérie) afin d'évaluer les niveaux de transmission du paludisme. La nuisance culicidienne est considérable : un homme dormant non protégé à VK5 reçoit plus de 60 000 piqûres de moustiques par an.

Deux espèces jouent un rôle vecteur : *An. gambiae* et secondairement *An. funestus*. Le cycle des saisons et la culture du riz déterminent deux périodes de transmission à VK5. A VK7, la transmission est plus étalée dans l'année.

Les niveaux annuels de 697 piqûres infectées par homme à VK5 et de 515 pi/h à VK7 sont supérieurs à ceux de 1984/1985. Ceci tient à la fois à un accroissement des densités vectrices et des indices sporozoïtiques. Le niveau et le rythme de transmission sont également plus importants que ceux relevés dans la savane environnante. Cette transmission plus importante reste toutefois sans proportion avec les densités vectrices très élevées relevées dans la zone rizicole du fait notamment de la jeunesse de ces populations inaptes à assurer la transmission. Elle n'entraîne pas localement d'aggravation du paludisme-maladie.

Mots-clés : Paludisme, rizière, Afrique

SUMMARY

A longitudinal study based on mosquitoes sampled by larvae prospecting and adult catches on humans was carried out during 1999 in the rice field area of the Kou Valley (south-west Burkina Faso) to evaluate the malaria transmission level. Two sites were studied : VK5 located in the rice field centre and VK7 in the periphery. Irrigation is sub-permanent and two crops are grown each year : from February to June during the dry season and from July to November during the rainy season. A man sleeping in VK5 without any protection is exposed to more than 60 000 mosquito bites/year. Two majors vectors are present: *An. gambiae* sl and *An. funestus*. *An. gambiae* M form which breeds in rice field constitutes the majority of the complex. In the periphery of the rice field, we observed during the rainy season a mix of M and S forms, the latter coming from classical breeding sites created by rainfall (residual puddles). *An. arabiensis* is rare in this environment while we can find it in sympatry with *An. gambiae* in the surrounding savannah. *An. gambiae* remains present throughout the year. Its dynamic depends closely on both season and rice cycle. There are two density peaks, in March (210 bites/man/night) and in July (306 b/m/n), corresponding to the moment when rice is planted. The latter peak is more important due to additional productivity of residual puddles created by rainfall. These large and very young populations can not transmit malaria. Growing rice reduces larvae productivity : transmission occurs when the adult population decreases and becomes older. Variations in parity rate and sporozoitic index are inversely related to mosquito density. Finally *An. gambiae* population is lowest during the dry season in January when irrigation stops.

An. funestus does not develop in rice fields but rather in drains made of dirt in addition to the classical natural breeding sites at the end of the rainy season. The density of *An. funestus* is 25 to 30 times smaller than that of *A. gambiae*; as observed during 8 months in VK5 and 10 months in VK7 with a peak in January of 16 b/m/n. Its mean parity rate and sporozoitic index is higher than those of *An. gambiae*. *An. funestus* plays an additional role in malaria

transmission at the same period than *An. gambiae* but more shortly and less intensively. Finally, malaria transmission is due mainly to *An. gambiae* (90%) and to a lesser extent, to *An. funestus* (10%). It occurs in VK5 during two periods of four months each: from May to August and from November to February. In VK7, transmission is also bimodal but it occurs more extensively during the year with only July and September as exemptions of transmission.

The annual inoculation rate amounts to 697 and 515 infected bites per man. This value is higher than those obtained in 1984/1985 : 50 and 60 infected bites per man per year [2]. This increase is due both to growth of aggressive vectorial density and sporozoitic index. Growth of adult density can be explained by environmental modification and/or better adaptation of vectorial species. Sporozoitic index of vectors has been obtained by ELISA which is 2 more sensitive than the microscopic observations used in 1984/1985. This can partly explain the increase of sporozoitic index. Other hypothesis in relation to human parasitological inputs have to be evaluated more accurately. Level and rhythm of transmission in the rice field in 1999 are more important than those registered in the surrounding savannah the same year [3]. This important transmission is however not proportionally related to the high vectorial density found in rice fields. Probably, it does not imply more malaria-diseases, but its intensity and rhythm could concentrate malaria cases in young people with an early acquisition of premunition. Pyrethroid impregnated bednets should be used to prevent malaria especially since high mosquitoes nuisance makes local populations to use it and *An. gambiae* M form is particularly susceptible to this class of insecticides.

Key Words : Malaria, rice-field, Africa

INTRODUCTION

Les rizières font partie des zones agricoles dont l'aménagement hydraulique peut avoir des répercussions importantes sur les maladies à transmission vectorielle, en particulier sur le paludisme [1]. Un suivi entomologique longitudinal a été réalisé de mars 1999 à février 2000 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou afin d'évaluer les niveaux de transmission du paludisme. Ces niveaux sont comparés

d'une part avec les valeurs relevées en 1983/1984 dans la même zone par Robert [2] et d'autre part avec les valeurs obtenues en milieu rural classique dans la savane environnante au cours de la même année [3].

MATERIEL ET METHODES

1. Site d'étude

La région est située en zone de savane humide du sud-ouest du Burkina Faso. Le climat est marqué par la succession d'une saison des pluies (mai à octobre) et d'une saison sèche (novembre à avril). La pluviométrie annuelle est de 1 100 mm avec un pic en août. La moyenne annuelle des températures est de 27°C.

La zone rizicole de la Vallée du Kou aménagée en 1970 s'étend sur une surface de 1 000 ha (4°25'W-11°22N). L'irrigation se pratique avec l'eau détournée de la rivière Kou alimentant par gravité un réseau de canaux. La riziculture se déroule en deux récoltes annuelles : l'une en saison sèche (février à juin), l'autre en saison des pluies (juillet à novembre). Entre deux cycles de culture, l'irrigation est stoppée. Le rendement moyen par récolte est de 5 000 kg/ha, soit 10 000 t de riz par an. Sept villages implantés soit à l'intérieur de la rizière soit à sa périphérie immédiate abritent environ 18 000 personnes majoritairement de l'ethnie Mossi.

Deux villages représentatifs ont été retenus pour l'étude (figure 1) :

- le village de VK5 (Vallée du Kou n° 5) situé en plein centre de la rizière,
- le village de VK7 localisé en périphérie de la rizière à 1,5 km du précédent.

2. Protocole d'étude

Il repose sur un suivi entomologique longitudinal réalisé de mars 99 à février 00 basé sur des prospections larvaires et des captures nocturnes sur sujets humains.

2. 1. Prospections larvaires

Elles ont été réalisées mensuellement dans des gîtes sentinelles représentatifs des différents types de collection d'eau : casiers rizicoles, canaux d'irrigation cimentés ou en terre, flaques résiduelles, mares sub-permanentes. Les larves recueillies sont identifiées et les densités larvaires pour les vecteurs du paludisme (*An. gambiae* sl, *An. funestus*, *An. nili*) estimées de manière indirecte.

Des diagnostics PCR ont été effectués sur des spécimens récoltés d'*An. gambiae* sl afin de distinguer au sein de ce complexe les espèces jumelles *An. arabiensis* et *An. gambiae* [4] toutes deux vectrices du paludisme et au sein d'*An. gambiae* les formes moléculaires M ou S [5]. Ces formes M et S de l'espèce *An. gambiae* diffèrent par leur bio-écologie. En savane ouest-africaine notamment au Burkina Faso [6], les formes moléculaires M et S correspondent respectivement aux formes chromosomiques Mopti et Savane auparavant caractérisées par cytogénétique [7].

2. 2. Captures nocturnes sur sujet humain

Elles sont effectuées dans 4 chambres d'habitations réparties dans chaque village à raison de 2 nuits consécutives par mois. Les mêmes chambres sont utilisées pendant toute l'étude. Dans chacune, deux captureurs se relaient entre 18h et 6h.

La détermination des moustiques capturés se fait le matin suivant la capture. Les densités d'*An. gambiae* sl étant très élevées, on prélève pour chaque point de capture un échantillon de 25 femelles réparties dans chaque tranche horaire qui sont disséquées afin de déterminer le taux de parturité ou âge physiologique. Pour les autres vecteurs du paludisme (*An. funestus*, *An. nili*), toutes les femelles capturées sont disséquées. La détermination de la parturité est faite selon l'état des trachéoles ovariennes par la méthode classique de Detinova [8].

La détermination de l'état d'infestation (présence de *Plasmodium falciparum* dans les glandes salivaires) se fait ultérieurement par ELISA sur la tête et le thorax de chaque moustique disséqué. Le taux d'inoculation entomologique est calculé en multipliant le taux de piqûres sur homme par l'indice sporozoïtique.

RESULTATS

1. Dynamique larvaire

En saison sèche, les seuls gîtes larvaires potentiels sont le fait de l'irrigation : casiers rizicoles et canaux d'irrigation. Dans les casiers, le cycle du riz détermine une succession larvaire caractéristique : (1) février-mars : mise en eau-repiquage/*An. gambiae* sl, (2) avril-mai : montaison-épiaison/*An. pharoensis*, (3) juin :

maturation-récolte/*An. coustani*. Les plus fortes densités larvaires s'observent dans les casiers repiqués et sont le fait du complexe vecteur *An. gambiae* sl. Après, les densités diminuent avec la croissance du riz et l'ombrage qui s'en suit. Les canaux d'irrigation surtout en terre sont beaucoup moins productifs que les casiers. *An. funestus* y est récolté à de faible densité après la mise en eau (mars) en présence ou non de larves d'autres anophèles. En saison des pluies, le même schéma chronologique s'observe dans les casiers durant la seconde campagne du riz. Outre les casiers, agissent en sus pour les anophèles les gîtes classiques liés aux pluies : flaques résiduelles temporaires pour *An. gambiae* sl et plus tard collections d'eau sub-permanente avec végétation pour *An. funestus*.

En saison sèche (mars), les diagnostics PCR réalisées sur 30 spécimens d'*An. gambiae* sl récoltés dans les casiers donnent 100% d'*An. gambiae* forme M. En saison des pluies (juillet), les mêmes analyses effectuées sur 30 spécimens récoltés dans les casiers donnent 29 *An. gambiae* forme M (97%) et 1 *An. arabiensis*. Dans les flaques résiduelles à VK7, nous avons dans le même temps sur 30 spécimens, 29 *An. gambiae* dont 15 forme M (52%) et 14 forme S (48%).

2. Composition de la faune culicidienne agressive pour l'homme

Au total, 144 hommes-nuits de capture ont été réalisées de mars 1999 à février 2000. Sur les 18 496 femelles de moustiques capturées, nous avons 15 786 anophèles (85%), 2 290 culex (12%), 408 mansonïa (2%), 5 aedes et 7 autres. Les anophèles se décomposent comme suit : 13 827 *An. gambiae* sl (87%), 507 *An. funestus* (3%), 9 *An. nili* pour les vecteurs ; 1 381 *An. pharoensis* (9%), 57 *An. coustani*, 5 divers pour les autres espèces non vectrices.

Les résultats suivants concernent seulement les deux principaux vecteurs du paludisme dans la région (*An. gambiae* sl, *An. funestus*). Pour *An. nili*, les effectifs sont trop faibles. A VK5, un habitant non protégé reçoit annuellement 63 871 piqûres de moustiques dont 43 296 *An. gambiae* sl et 1 324 *An. funestus*. A VK7, ces chiffres sont plus faibles avec 36 459 piqûres de moustiques par homme par an dont 29 751 *An. gambiae* sl et 1 207 *An. funestus* (tableau 1).

3. Variations saisonnières des densités de vecteurs

Dans les deux sites, les densités d'*An. gambiae* sl présentent deux pics saisonniers. Le premier en mars avec 210 piqûres par homme par nuit à VK5 et 220 p/h/n à VK7. Le second en juillet avec 306 p/h/n à VK5, 197 p/h/n à VK7. Les minima sont en mai et en janvier mais toujours supérieurs à 1 p/h/n (figure 2). Pour *An. funestus*, les densités sont maximales en avril (11 p/h/n) et en janvier (16 p/h/n) à VK5 ; en mai (10 p/h/n) et en novembre (8 p/h/n) à VK7. A VK5, elles dépassent 1 p/h/n durant 8 mois de l'année contre 10 mois à VK7.

4. Age physiologique des vecteurs

Pour *An. gambiae* sl, le taux de parturité moyen est de 20,9% à VK5 et de 39% à VK7. A VK5, la proportion de femelles pares est très faible en mars, juillet et novembre. A l'inverse, la parturité est maximale en mai et en janvier.

A VK7, les minima sont notés aussi en mars et en juillet ; les maxima en mai et en janvier. On remarque donc dans les deux sites les variations saisonnières inverses existant entre les taux de piqûres et les taux de parturité (figure 2).

Pour *An. funestus*, les taux de parturité moyens sont plus élevés : 70% à VK5 et 93% à VK7 mais les effectifs réduits ne permettent pas une analyse mensuelle.

5. Infectivité des vecteurs

Pour *An. gambiae* sl, l'indice sporozoïtique moyen est de 2,8% à VK5 et de 2,9% à VK7. Les variations saisonnières des indices sporozoïtiques sont corrélées à celles des taux de parturité (figure 2). Dans les deux sites, les maxima sont relevés en mai et en décembre. Les infections sont notées durant 8 mois à VK5 contre 10 mois à VK7 avec des discontinuités : aucune infection n'est trouvée en mars-avril et septembre-octobre à VK5 ; en juillet et septembre à VK7.

Pour *An. funestus*, les indices sporozoïtiques moyens sont plus élevés : 4,3% à VK5 et 7,5% à VK7. Dans les deux sites, les infections sont décelées pendant 5 mois (mai-juin, décembre-janvier-février).

6. Taux d'inoculation entomologique

A VK5, la transmission est élevée de 697 piqûres infectées/homme/an (tableau 1). *An. gambiae* s'assure cette transmission à plus de 90% assisté d'*An. funestus*. La transmission est bimodale. Une première période de 4 mois va de mai à août avec des maxima en juin de 5,7 pi/h/nuit pour *An. gambiae* s.l et 0,3 pi/h/n pour *An. funestus*. La seconde période de 4 mois va de novembre à février avec des pics de 3,1 pi/h/n en décembre pour *An. gambiae* s.l et de 0,5 pi/h/n en janvier pour *An. funestus* (figure 3). A VK7, la transmission équivaut à VK5 avec 515 pi/h/an. Elle est là aussi surtout le fait d'*An. gambiae* avec une allure bimodale mais plus étalée dans l'année : seuls juillet et septembre sont exempts de transmission.

DISCUSSION

Comme l'a souligné Robert [2], la dynamique culicidienne dans la Vallée du Kou est conditionnée par deux facteurs : la saison et la culture du riz. Deux vecteurs interviennent dans la transmission du paludisme : *An. gambiae* et plus accessoirement *An. funestus*. En saison sèche, *An. gambiae* forme M se développe dans les casiers récemment mis en eau. La forme M est inféodée aux eaux issues de la nappe phréatique : zones irriguées ou d'inondation [9]. La productivité larvaire est alors très importante donnant une population adulte très jeune ne pouvant assurer la transmission. Au fur et à mesure de la croissance du riz, les larves d'*An. gambiae* disparaissent. La diminution de la productivité larvaire se répercute en terme de baisse des densités adultes et de vieillissement de cette population. La transmission du paludisme devient alors effective. Le même schéma s'opère en saison des pluies avec des densités adultes supérieures du fait de l'apport à la fois des casiers et des gîtes classiques. Dans ceux-ci (flaques résiduelles), nous avons un mélange de forme M et de forme S, cette dernière étant plus adaptée aux eaux résiduelles des pluies [9]. *An. arabiensis* en sympatrie avec *An. gambiae* dans la savane environnante est rare dans le milieu rizicole. Ces résultats corroborent ceux obtenus par cytogénétique en 1984/1985 [2].

An. funestus n'est en général pas favorisé par les rizières en savane d'Afrique de l'Ouest [10]. A la Vallée du Kou, il se développe plutôt dans les canaux en terre non drainés et dans ses gîtes classiques en fin de saison des pluies. Il joue un rôle d'appoint dans la transmission aux mêmes périodes qu'*An. gambiae* mais de manière plus brève et moins intense. Si on compare les deux sites, la transmission est équivalente en terme de quantité annuelle mais diffère de par son rythme plus étalée dans l'année à VK7. Par rapport à 1984/1985, on relève une augmentation des niveaux (x10) et des durées (+4 mois) de transmission reposant à la fois sur un accroissement des densités vectrices (x2) et des indices sporozoïtiques (x5).

Pour les densités, les techniques d'échantillonnage sont les mêmes. Des variations inter-annuelles naturelles importantes s'observent en savane sèche [11] et au sahel [12]. A la Vallée du Kou, enclave artificielle, l'accroissement des densités repose plus sur une modification favorable du milieu et/ou une meilleure adaptation des vecteurs à l'environnement. La riziculture est devenue moins organisée en terme (i) de calendrier et de gestion de l'eau et (ii) d'entretien des canaux d'irrigation.

Pour les indices sporozoïtiques, les techniques diffèrent : l'ELISA utilisée en 1999 décèle 2x plus de moustiques infectés que l'observation directe usitée en 1984/1985 [11, 13]. Ceci peut expliquer une partie des différences observées. Des études devraient être menées afin de vérifier d'autres facteurs : meilleure accessibilité (anthrophilie du vecteur, contact homme-vecteur) ou importance (chloroquino-résistance) du réservoir humain de parasites.

Par rapport à la savane environnante en 1999, les niveaux annuels de transmission relevés à la Vallée du Kou sont 2 à 3 fois plus élevés. Les densités vectrices très importantes (20 fois plus pour *An. gambiae*) ne se répercutent pas proportionnellement sur la transmission du fait de la jeunesse de ces populations. Ce résultat montré par Robert [2] et Carnevale [10] confirme que la riziculture en savane ouest-africaine même si elle accroît très fortement les densités vectrices n'entraîne pas d'aggravation démesurée de la transmission du paludisme.

CONCLUSION

Cette étude fait le point sur la transmission du paludisme dans la zone rizicole de la Vallée du Kou en 1999 au Burkina Faso à savoir (i) une augmentation de cette transmission par rapport à une étude réalisée dans la même zone en 1984/1985 et (ii) une transmission plus importante par rapport à la savane environnante la même année. Cette transmission accrue dans une région de paludisme stable [2] n'entraîne pas d'aggravation du paludisme-maladie [14] du fait d'une saturation des piqûres infectées et de l'immunité protectrice établie dès l'adolescence [12]. Par contre, son intensité et son rythme prolongé pourraient concentrer les accès sur les jeunes classes d'âge avec une acquisition plus précoce de la prémunition. A fin de protection, l'usage des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes apparaît judicieux d'autant plus que la nuisance importante favorise l'adhésion des populations et que la forme M d'*An. gambiae* est parfaitement sensible à ces insecticides [15] avec un risque réduit de résistance par le mécanisme Kdr [16].

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les techniciens du Laboratoire d'Entomologie Médicale du Centre Muraz pour avoir su mener à bien cette étude et le Ministère français de la Coopération pour son soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

1. Philippon P, Mouchet J. Répercussions des aménagements hydrauliques à usage agricole sur l'épidémiologie des maladies à vecteurs en Afrique tropicale. Colloque International: l'eau et les activités agricoles. Paris 3-5 mars 1976.
2. Robert V. La transmission du paludisme humain : la zone des savanes d'Afrique de l'Ouest. Thèse de Doctorat, Université de Paris 6 1989 ; 325 p.
3. Baldet T, Diabaté A, Guiguemdé TR. Malaria transmission in wet savanna region of south-west Burkina Faso. Soumis à Med. Vet. Entomol.

4. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993 ; 49 : 520-9.
5. Favia G, della Torre A, Bagayoko M *et al.* Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 1997 ; 6 (4) : 377-83.
6. Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-Yovo J, Favia G, Petrarca V, Coluzzi M. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Mol. Biol.* 2001 ; 10(1) : 9-18.
7. Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bull. Zool.* 1985 ; 52 : 45-63.
8. Detinova TS. Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les Diptères présentant une importance médicale. *OMS Sér Monogr* 1963 ; 47 ; 220 p.
9. Touré YT, Petrarca V, Traoré SF *et al.* The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 1998; 40 : 477-511.
10. Carnevale P, Guillet P, Robert V *et al.* Diversity of malaria in rice growing areas of the Afrotropical region. *Parassitologia* 1999 ; 41 : 273-6.
11. Fontenille D, Lochouarn L, Diagne N *et al.* High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1997 ; 56 : 247-53.
12. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M *et al.* Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers Santé* 1993 ; 3 : 220-38.
13. Sokhna CS, Diagne N, Lochouarn L *et al.* A comparison between ELISA and dissection for detection of *Plasmodium* infections in *Anopheles* mosquitoes. Consequences of the estimation of malaria transmission in Ndiop, Senegal in 1995. *Parasite* 1998 ; 5 (3) : 273-9.
14. Henry MC, Rogier C, Nzeyimana I *et al.* Morbidité palustre en zone rizicole de savane au nord de la Côte d'Ivoire. Colloque International Eau et Santé-Ouaga 2000. Ouagadougou (BF), 21-24 nov. 2000.

15. Diabaté A, Ouédraogo JB, Baldet T *et al.* Pyrethroids resistance status of *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. Med Vet Entomol 2001 (in press).
16. Chandre F, Manguin S, Brengues C *et al.* Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. Parasitologia 1999 ; 41 :319-22.

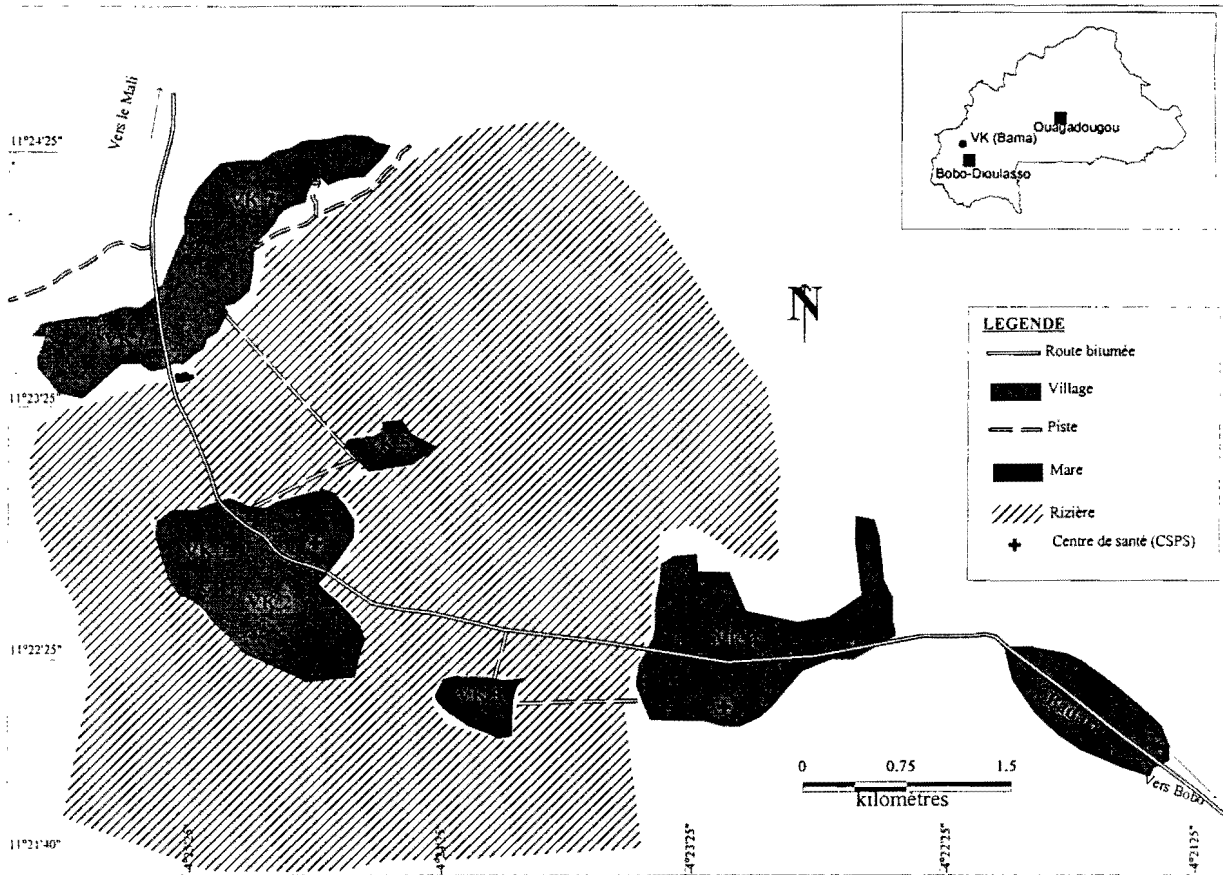


Figure 1 : La zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama) – Burkina Faso

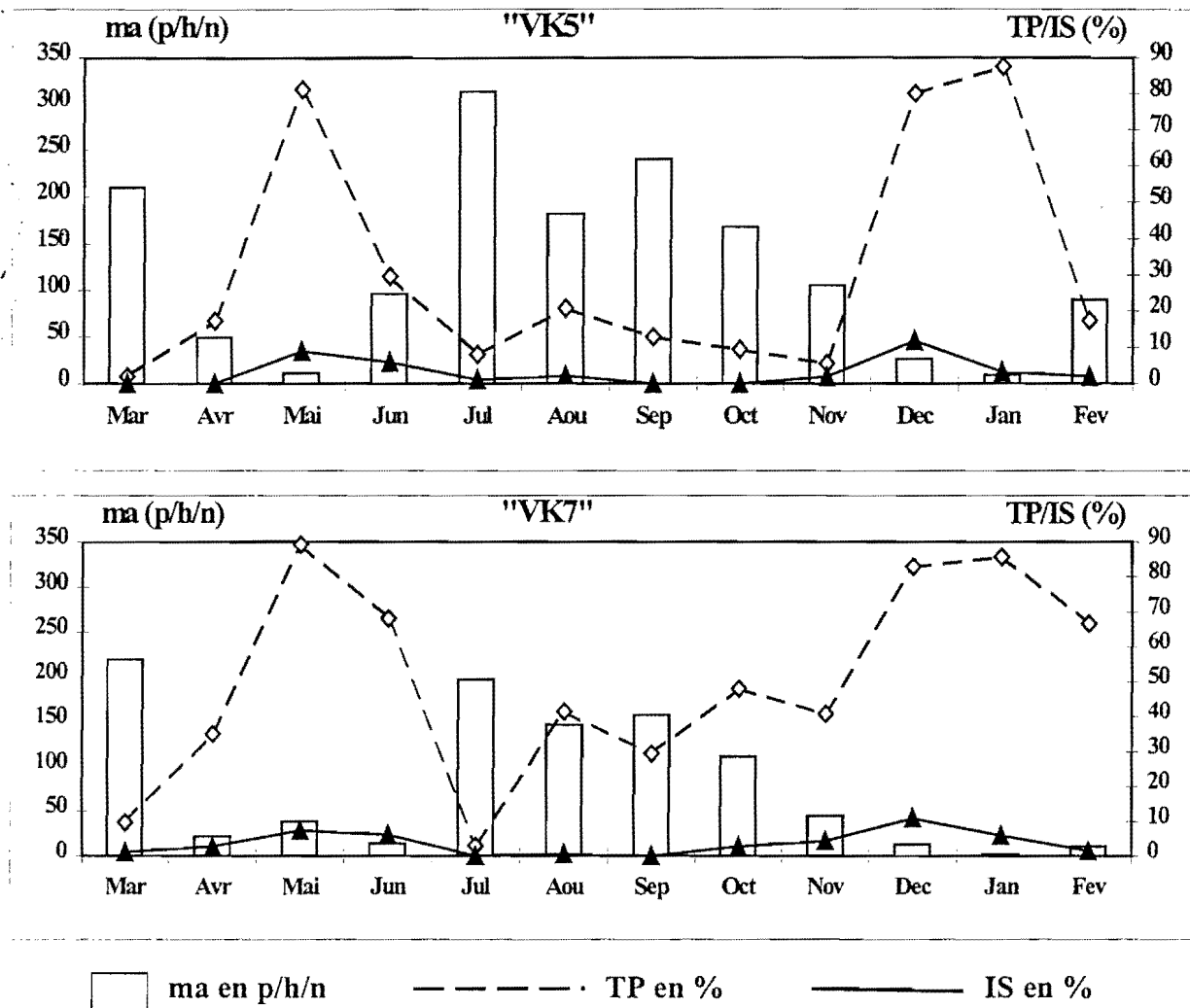


Figure 2 : Variations mensuelles de la densité agressive (ma en p/h/n), du taux de parturité (TP en %) et de l'indice sporozoïtique (IS en %) pour *An. gambiae* sl à la Vallée du Kou de mars 1999 à février 2000

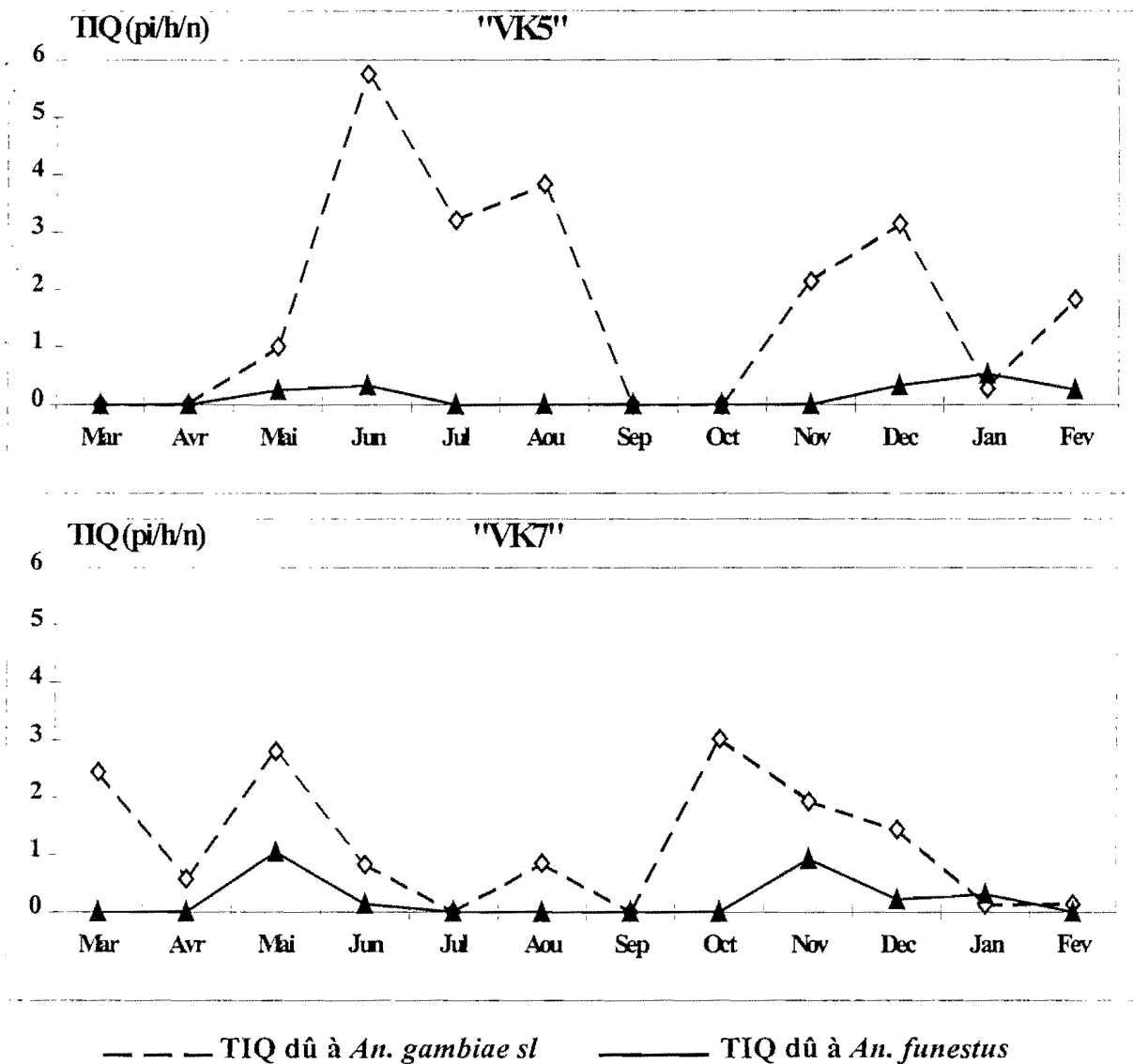


Figure 3 : Variations mensuelles des taux d'inoculation quotidiens (en pi/h/n) reçus par un homme non protégé à la Vallée du Kou de mars 1999 à février 2000

Vallée du Kou 1999	Nombre annuel de piqûres ^a				Taux d'inoculation annuel ^b		
	Total <i>Culicidae</i>	Total <i>Anopheles</i>	<i>An. gambiae sl</i>	<i>An. funestus</i>	<i>An. gambiae sl</i>	<i>An. Funestus</i>	TOTAL
VK5 central	63 871	52 112	43 296 (12)	1 324 (8)	645 [8]	52 [5]	697
VK7 périphérie	36 459	32 736	29 751 (12)	1 207 (10)	435 [10]	80 [5]	515
Savane classique 1999 ¹	Nombre annuel de piqûres ^a				Taux d'inoculation annuel ^b		
Léna	3 572	2 850	1 785 (4)	936 (4)	119 [6]	73 [2]	192
Vallée du Kou 1984/1985 ²	Nombre annuel de piqûres ^a				Taux d'inoculation annuel ^b		
VK5 1984	20 500	17 000	13 930 (12)	70 (2)	50 [5]	0 [-]	50
VK7 1984	17 000	15 000	13 320 (12)	580 (4)	54 [6]	6 [3]	60
VK5 1985	35 038	28 911	23 595 (12)	547 (4)	26 [4]	4 [2]	30

Tableau 1 : Nombre annuel de piqûres de moustiques et taux d'inoculation annuel du paludisme reçus par un homme non protégé en milieu rizicole : Vallée du Kou (1984/1985, 1999) et en savane classique : Léna (1999)

a : exprimé en nombres de piqûres par homme par an

b : exprimé en nombre de piqûres infectées par homme par an

Entre parenthèses est indiqué le nombre de mois où la densité des vecteurs du paludisme (*An. gambiae sl*, *An. funestus*) est supérieure à 1 piqûre/homme/nuit

Entre crochets est indiqué le nombre de mois où des infections sont décelées chez les vecteurs du paludisme (*An. gambiae sl*, *An. funestus*) et où la transmission du paludisme est donc assurée

1 : Baldet *et al.*, soumis

2 : Robert *et al.*, 1989

Article 2

Chandre F, Brengues C, Dossou Yovo J, Manguin S, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P & Guillet P (1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west africa and futher evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* **41** : 319-322.

Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form

F. Chandre¹, S. Manguin¹, C. Brengues¹, J. Dossou Yovo², F. Darriet², A. Diabate³, P. Carnevale², P. Guillet⁴

¹ IIN/IRD, Montpellier, France; ² IPR/OCCGE, Bouaké, Côte d'Ivoire; ³ Centre Muraz, OCCGE, Bobo Dioulasso, Burkina Faso; ⁴ World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Abstract. In the field, the *kdr* mutation, involved in pyrethroid resistance, has been found widely distributed in the Savanna form of *Anopheles gambiae* s.s., but never in wild populations of the Mopti form or *An. arabiensis*, even in areas where both occur in sympatry with resistant Savanna populations. Under laboratory conditions, Mopti and Savanna forms were fully able to interbreed and the *kdr* mutation was transmissible from one form to the other. Both forms appeared to be exposed to pyrethroid selection pressure in the field. The absence of the *kdr* mutation in the Mopti form and the total lack of Mopti-Savanna heterozygotes in field populations provides further evidence of a pre-copulatory barrier to gene flow between these two forms. Molecular markers, including *kdr*, are powerful tools for studying population genetics and circulation of resistance genes, and should be used through an integrated approach for a better understanding of the speciation process.

Key words: *Anopheles gambiae* complex, Mopti form, resistance, pyrethroid, *kdr* mutation, West Africa.

Pyrethroid resistance due to the *kdr* mutation has been found widespread in several West African countries (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Chandre *et al.*, 1999a). Its geographical distribution has been thoroughly investigated in Côte d'Ivoire where it occurs in most wild populations, occasionally at very high frequency (>90%) (Chandre *et al.*, 1999b). However, some populations showed deviation from Hardy Weinberg equilibrium (i.e. a deficit in heterozygotes). For a better understanding of the situation, allelic frequencies of *kdr* mutation were determined within the recognized forms of *Anopheles gambiae* s.s. including Savanna/Forest and Mopti. Since both Mopti and Savanna forms interbreed under laboratory conditions, back-cross experiments were done to evaluate whether the *kdr* mutation could be transmitted from one form to the other.

Materials and methods

Mosquitoes were collected in several localities from Côte d'Ivoire and Burkina Faso. In the former country, sampling was made related to rice cultivation practices: no rice (R0), 1 annual rice harvest (R1), and 2 irrigated rice harvests (R2) and in different

environments from deep forest to savanna areas. Human landing females were collected in Côte d'Ivoire, whereas females in Burkina Faso were obtained from larval collections. All individuals were first identified morphologically and then by PCR (Scott *et al.*, 1995). Mopti and Savanna/Forest forms were identified by PCR-RFLP (Favia *et al.*, 1997). The *kdr* mutation was detected by PCR (Martinez-Torres *et al.*, 1998) and population genetic analysis was made using Genepop software (Raymond and Rousset, 1995). The level of significance of each test was corrected according to the sequential Bonferroni procedure (Rice, 1989).

In order to verify whether *kdr* gene was transmissible from one form to the other, a susceptible Savanna strain (*kdr* free, originated from Kenya) and resistant Mopti (homozygous for the *kdr* gene) were reciprocally crossed (SS males × RR females and SS females × RR males). This resistant Mopti strain was selected in the laboratory from a field sample that initially contained both susceptible Mopti and resistant Savanna forms.

The 8 possible back-crosses were tested (100 to 200 individuals per cage). From each progeny, 30 females and 10 males were identified by PCR-RFLP and genotyped for *kdr*.

The fitness cost associated with the *kdr* mutation was investigated in the field by comparing the *kdr* frequency between *P. falciparum* infected females of *An. gambiae* s.s. (salivary gland dissections confirmed by ELISA) and uninfected. This comparison was made in two areas of Côte d'Ivoire, including one in a savanna environment with a high pyrethroid resistance (*kdr* frequency >80%) and one in a forest environment with low resistance (<15%).

Invented contribution to the Malariology Centenary Conference 'The malaria challenge after one hundred years of malariology' held in Rome at the Accademia Nazionale dei Lincei, 16-19 November 1998.

Correspondence: Dr Pierre Guillet, World Health Organization, Division of Communicable Diseases Prevention and Control, 1211 Geneva 27, Switzerland. Tel ++41 22 791 5860, Fax ++41 22 791 4777, e-mail: guilletp@who.ch

Results and discussion

More than 1,000 mosquitoes were both identified taxonomically by PCR and genotyped for *kdr* (Table 1). Among them, 478 were identified as belonging to the Mopti or Savanna/Forest forms. In 5 out of 6 areas where resistant *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* were in sympatry, the *kdr* mutation was not found in *An. arabiensis*. Pyrethroid susceptibility of the latter species was also confirmed by bioassays. Among the 19 populations of *An. gambiae* s.s. tested, 4 deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium. However, within the Savanna/Forest forms, all populations were at equilibrium. Of the 149 Mopti individuals screened from the field, none was found with the *kdr* mutation, although Mopti populations were commonly found in sympatry with the resistant Savanna form (8 mixed populations, with Savanna *kdr* frequency from 17 to 100%).

Isozyme analysis comparing three populations, one of Mopti (Mbé) and two resistant Savanna (Kafiné and Yaokoffikro) on the basis of 14 enzymatic systems controlled by 25 loci, showed little differentiation between the populations with a value of the F-statistic (*F_{st}*) of 0.042. In addition, unbiased genetic distances of Nei (1978) were low, with values ranging from 0.003 to 0.008. As found by Cianchi *et al.* (1983) on different natural populations, the genetic distance between Mopti and Savanna forms was very low and no discriminant alle-

les by multilocus analysis were found. As stated by Cianchi *et al.* (1985), sibling species identification by multilocus electrophoresis becomes less efficient when their origin is quite recent, and their genetic divergence at the structural gene level is still minimal.

Backcrossed hybrids from homozygous resistant (RR) Mopti and homozygous susceptible (SS) Savanna, yielded allelic frequencies for taxonomic status and *kdr*. The *kdr* mutation was not sex-linked since frequencies did not differ significantly from Mendelian autosomal expectation. It is freely transmitted from one form to the other under laboratory conditions. In addition, this experiment confirmed that both forms, Savanna and Mopti, were able to freely interbreed in the laboratory.

If *kdr* mutation reduces fitness, one possible effect at the adult stage would be the reduction of life expectancy. Since vectorial capacity is closely related to life expectancy, it would be expected that the frequency of the *kdr* mutation in infected females would be significantly lower than in uninfected ones.

Results in Table 2 showed that difference in genotype frequencies of infected and uninfected individuals was not significant ($P > 0.05$, Goudet exact test; Goudet *et al.*, 1996). *Kdr* mutation was apparently not found associated with a fitness cost. Thus, *kdr* individuals appear to live as long as susceptible ones. Under laboratory conditions, the *kdr* gene was

Table 1. Frequencies of *kdr* mutation among species of *An. gambiae* s.l. and forms of *An. gambiae* s.s. within field samples of mosquitoes from Côte d'Ivoire and Burkina Faso. G. savanna, Guinean savanna; S. savanna, Sahelian savanna; Rice cult., presence or absence of ricefields; % and (N), frequency of each species/form and number of mosquitoes tested; *F(kdr)*, allelic frequency of *kdr* mutation; HW, P value from exact test for conformity to Hardy-Weinberg ratio; values still significant ($P < 0.05$), when taking into account multiple tests, are indicated in bold characters; ND, not determined.

Location	Ecological zone	Rice cult.	<i>An. gambiae</i> s.s.			Savanna/Forest forms			Mopti form		<i>An. arabiensis</i>	
			% and (No.)	<i>F(kdr)</i>	HW	% and (No.)	<i>F(kdr)</i>	HW	% and (No.)	<i>F(kdr)</i>	% and (No.)	<i>F(kdr)</i>
Côte d'Ivoire												
Mbe	G savanna	Yes	100 (67)	0.04	0.0740	6.4 (4)	0.63	1	93.6 (63)	0	0	-
Kafine	G. savanna	Yes	100 (77)	0.94	0.0009	84.2 (16)	0.90	1	15.8 (3)	0	0	-
Yaokoffikro	Peri urban	Yes	100 (56)	0.96	0.0880	100 (56)	0.96	1	0	-	0	-
Korhogo	G. savanna	Yes	100 (91)	0.84	0.0600	100 (65)	0.82	0.0200	0	-	0	-
Kabolo	G savanna	No (R0)	100 (29)	0.31	<0.0001	44.8 (13)	0.69	0.0330	55.2 (16)	0	0	-
Tioroniaradougou	G. savanna	Yes (R1)	100 (29)	0.83	0.0170	100 (29)	0.83	0.0170	0	-	0	-
Nombolo	G savanna	Yes (R2)	100 (29)	0.81	0.0360	89.7 (26)	0.90	1	10.3 (3)	0	0	-
Nambekaha	G savanna	Yes (R2)	100 (30)	0.88	1	100 (30)	0.88	1	0	-	0	-
Fapaha	G savanna	Yes (R1)	100 (28)	0.73	0.3500	100 (28)	0.73	1	0	-	0	-
Danane	Forest	Yes	100 (24)	0.21	0.5400	83.3 (20)	0.25	0.2800	16.7 (4)	0	0	-
Guigio	Forest	Yes	100 (85)	0.10	0.5900	59.8 (49)	0.17	1	40.2 (33)	0	0	-
Abidjan	Urban	No	100 (27)	0.39	1	ND	-	-	ND	-	0	-
Burkina Faso												
Sabou	S savanna	No	92.1 (70)	0.29	1	ND	-	-	ND	-	7.9 (6)	0
Boromo	Peri urban	No	64.1 (25)	0.08	1	ND	-	-	ND	-	35.9 (14)	0
Kuiti	S savanna	No	82.1 (23)	0.02	1	ND	-	-	ND	-	17.9 (5)	0
Hounde	Peri urban	Yes	94.7 (161)	0.04	0.0013	72.7 (8)	0.50	0.2200	27.3 (3)	0	5.3 (9)	0
Kou Valley	S. savanna	Yes	98.0 (100)	0.02	<0.0001	7.7 (2)	1	1	92.3 (24)	0	2.0 (2)	0
Bobo	Urban	No	100 (11)	0.95	1	100 (11)	0.95	1	0	-	0	-
Ouagadougou	Urban	No	60.6 (43)	0	1	ND	-	-	ND	-	39.4 (29)	0

Table 2. Comparison of genotypes for *kdr* between infected and uninfected females from savanna and forest areas of Côte d'Ivoire. F(*kdr*), allelic frequency of *kdr* mutation; P value for significance test between *kdr* genotypes of infected and uninfected. NS, non-significant

Samples	RR	RS	SS	F(<i>kdr</i>)	P
High resistance area (savanna)					
Infected	34	6	5	0.822	
Uninfected	31	12	1	0.841	0.869 (NS)
Low resistance area (forest)					
Infected	1	3	26	0.083	
Uninfected	0	8	23	0.129	0.573 (NS)

maintained at a low frequency over numerous generations in the absence of any insecticide pressure. Consequently, it is reasonable to assume that the *kdr* mutation would be maintained in the Mopti form under field conditions if introduced by natural interbreeding from the resistant Savanna form.

Why did the Savanna and not the Mopti form develop resistance, although they live in the same environment? Since the *kdr* mutation is fully transmissible from one form to the other under laboratory conditions, why has it so far never been found in Mopti field populations?

Both Mopti and Savanna populations are presumably exposed to pyrethroid selection pressure in the study area. This is obvious for the Savanna form considering the extremely high *kdr* frequencies commonly observed in its natural populations. In the field, Mopti females are also likely to be exposed to selection pressure. Indeed, contrary to expectations, in northern Côte d'Ivoire during July-August, this form accounted for 55% of females collected in R0 area, zero % in R1, and only 5.2% in R2, although the Mopti form is more commonly associated with rice fields. This association was confirmed in the same area, in an experimental rice field station not surrounded by villages (Mbe, see Table 1), where the frequency of the Mopti form was over 80%.

Sociological KAP surveys (Audibert, unpublished data) have shown that rural populations in R1 areas were using large amount of household pyrethroids for personal protection (coils and aerosols), 3 times more than in R0 and twice more than in R2. Cotton is a more profitable crop than rice and since it is extensively grown in R1, unlike R0 (no cultivation) and R2 (essentially rice), people in R1 make more money and consequently can afford personal protection. Therefore, absence or low prevalence of the Mopti form in some rice field areas can be explained by selection pressure exerted on susceptible adults by household pyrethroids and probably also on larvae by agricultural insecticides.

The only reasonable explanation for the complete absence of the *kdr* mutation in the Mopti populations, although sympatric with highly resistant Savanna populations and both forms are exposed to pyrethroid selection pressure, is that the Mopti form is genetically isolated from the Savanna form by a strong barrier to gene flow. Since both forms inter-

breed under laboratory conditions and the *kdr* gene is freely transmitted from one form to the other, isolation must be at the pre-copulatory stage. In addition, this isolation was also confirmed during our study, as also reported by Favia *et al.* (1997), by the complete absence of heterozygotes by the RFLP type diagnostic of the forms in field populations (although heterozygotes were systematically and undoubtedly identified in crossing experiments).

Detection of gene flow based on the presence of backcross progeny in field populations, through chromosome examination, usually requires a very large number of samples, especially when these flow rates are very low. Our results showed that the *kdr* mutation is a sensitive marker with which to detect possible gene flow when the mutation is highly selected as in our study area. The presence of a strong barrier to gene flow is confirmed through the pyrethroid resistance pattern, which further reinforced Coluzzi's hypothesis that the Mopti form should be regarded as a distinct species separated from the Savanna-Forest form (Coluzzi *et al.*, 1985; Touré *et al.*, 1994).

Since the Mopti form is widely distributed in forested areas of south-eastern Côte d'Ivoire, more individuals from this area will be identified and tested for the *kdr* mutation in order to further evaluate the isolation between the Mopti and Savanna-Forest forms. Since *kdr* is also widespread at a high frequency in southern Benin (around Cotonou), it would be interesting to use it as a marker to investigate the degree of genetical isolation between *An. melas* and the Forest form of *An. gambiae* s.s., which are sympatric in this area.

The use of new molecular markers allows a better understanding not only of population genetics, but also of resistance gene flow, as well as the speciation process. Since species ecology plays an important role in the dynamics of resistance, further studies on the occurrence of resistance genes and their possible evolution should be done through an integrated approach combining population dynamics and its regulatory factors in natural environments.

Acknowledgements

This study was funded by WARDA (West African Rice Development Association) and WHO/TDR (Task Force on impregnated materials, Project No. 970523).

References

- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P (1999a) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. Bull Wild Hlth Org 77: 230-234.
- Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P (1999b) Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. J Am Mosq Control Ass 15: 53-59.
- Cianchi R, Villani F, Touré YT, Petrarca V, Bullini L (1983). Electrophoresis study of different chromosomal forms within *Anopheles gambiae* s.s. Parassitologia 25: 239-241.
- Cianchi R, Urbanelli S, Villani F, Sabatini A, Bullini L (1985). Electrophoresis study in mosquitoes: recent advances. Parassitologia 27: 157-167.
- Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA (1985) Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. Boll Zool 52: 45-63.
- Favia G, della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N'F, Touré YT, Coluzzi M (1997). Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. Insect Mol Biol 6: 377-383.
- Goudet J, Raymond M, De Meeüs T, Rousset F (1996). Testing differentiation in diploid populations. Genetics 144: 1933-1940.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol 7: 179-184.
- Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- Raymond M, Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2); population genetics software for exact tests and eucumenicism. J Heredity 86: 248-249.
- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43: 223-225.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993). Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 49: 520-529.
- Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maïga HM, Sankaré O, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M (1994). Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.s. in Mali, West Africa. Genetica 94: 213-223.

ARTICLE 3

Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Darriet F, Brengues C, Guiguemdé TR, Guillet P, Hemingway J, Small GJ & Hougard JM, (2002). The role of agricultural use of insecticides in *An. gambiae* sl resistance to pyrethroids in Burkina Faso (West Africa). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: sous presse.

THE ROLE OF AGRICULTURAL USE OF INSECTICIDES IN RESISTANCE TO PYRETHROIDS IN *ANOPHELES GAMBIAE* S.L. IN BURKINA FASO

ABDOULAYE DIABATE, THIERRY BALDET, FABRICE CHANDRE, MARTIN AKOGBETO,
T. ROBERT GUIGUEMDE, FRÉDÉRIC DARRIET, CÉCILE BRENGUES, PIERRE GUILLET, JANET HEMINGWAY,
GRAHAM J. SMALL, AND JEAN MARC HOUGARD

Laboratoire d'Entomologie et de Parasitologie, Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso; Institut Pierre Richet Bouaké, Bouaké, Côte d'Ivoire; Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou, Cotonou, Bénin; Laboratoire de Lutte Contre les Insectes Nuisibles (Institut de Recherche pour le Développement/Montpellier), Montpellier, France; World Health Organization, Geneva, Switzerland; School of Biosciences, Cardiff University, Main College, Cardiff, United Kingdom

Abstract. Agricultural use of insecticides is involved in the selection of resistance to these compounds in field populations of mosquitoes in Burkina Faso. *Anopheles gambiae* s.l. was resistant to permethrin and DDT in cotton-growing and urban areas, but susceptible in areas with limited insecticide selection pressure (rice fields and control areas). Nevertheless, resistance to these insecticides was observed in a village on the outskirts of the rice fields at the end of the rainy season, suggesting that the latter population of mosquitoes had migrated from the surrounding cotton villages into the rice fields. A seasonal variation of resistance observed in the cotton-growing area is related to the distribution of the molecular M and S forms of *An. gambiae*, since resistance to pyrethroids has so far only been reported in the S form. Pyrethroid resistance in west African *An. gambiae* was conferred by target site insensitivity through a knockdown resistance (kdr)-like mutation, which was present at high frequencies in mosquitoes in the cotton-growing and urban areas.

INTRODUCTION

Resistance to insecticides has become a limiting factor in the use of these compounds in the control of many insect pests. Mosquito control has focused on the use of insecticides (initially organochlorines, followed by organophosphates and carbamates) through indoor residual spraying. By 1990, more than 500 species of insects and mites had developed resistance to one or more classes of insecticides.¹ The use of insecticide-treated bed nets (ITNs) for both individual and collective protection against malaria has shown potential, reducing childhood malaria morbidity by 50% and global mortality by 20-30% in The Gambia, Ghana, and Kenya.²⁻⁴ The insecticides of choice for bed net impregnation are pyrethroids because of their high efficacy, rapid rate of knockdown, strong mosquito excito-repellent properties, and low mammalian toxicity. The World Health Organization (WHO) recommends the large-scale use of ITNs to control malaria transmission because they offer a good cost-efficiency ratio based on active community involvement. Analysis of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. is complicated by the presence of several members of the species complex throughout much of its range, and the occurrence of different chromosomal forms within *An. gambiae* s.s. Resistance to pyrethroids in *An. gambiae* s.l. has been reported in west Africa.⁵⁻⁷ Field and laboratory studies in Côte d'Ivoire in 1999 showed that *An. gambiae* s.l. had developed cross-resistance to many pyrethroids.⁸ Despite this, pyrethroid impregnated ITNs still achieve good control of resistant populations.⁹ As in several other insect species, a knockdown resistance (kdr)-based mechanism caused by a single point mutation in the para-sodium channel gene is the main mechanism of resistance to pyrethroids in *An. gambiae* s.l.¹⁰⁻¹² This kdr mutation was present only in the S molecular form of *An. gambiae* s.s. in the tropical savanna area. Recently, a different kdr mutation was found that conferred pyrethroid resistance in association with a monooxygenase-based mechanism in *An. gambiae* s.s. from eastern Africa.¹³

The present survey was carried out in Burkina Faso in 1999 and 2000. It was designed to evaluate resistance to pyre-

throids in *An. gambiae* s.l. at different sites and correlate resistance with the use of insecticides in these areas.

MATERIALS AND METHODS

Study area. The study was carried out in four localities in Burkina Faso chosen because of their different patterns of insecticide use (Figure 1). The localities were 1) a rice field cultivation area with two sampling sites, village VK5, located in the center of the rice fields and village VK7, located on the outskirts of the rice fields; 2) a cotton-growing area (Léna); 3) an urban area (Bobo-Dioulasso) with two sampling sites, Dso ba, located in the center of the city and Kuinima, located on the outskirts of the city; and 4) a control area, Batié, a site with very limited use of insecticides. All of these study sites were located in the same climatic area (annual rainfall = 1,000 mm).

Mosquito strains and bioassays. Mosquitoes were collected as larvae during the rainy season and brought back to the laboratory for emergence of adults. A susceptible strain of *An. gambiae* s.s. from Kisumu (Kenya) was provided by the Laboratoire de Lutte Contre les Insectes Nuisibles, WHO Collaborating Center for Vector Control (Montpellier, France) and used as a reference strain.

Adult susceptibility assays were carried out using 1% permethrin (cis:trans = 25:75)- and 0.05% deltamethrin-impregnated filter papers as recommended by the WHO. Resistance to 4% DDT was checked in the same populations for an initial prediction of cross-resistance patterns and underlying resistance mechanisms. Filter paper impregnated according to WHO specifications was provided by the Institut Pierre Richet de Bouaké, WHO Collaborating Center for Vector Control (Bouaké, Côte d'Ivoire). The WHO test kits for adult mosquitoes were used.¹⁴ Tests were carried out in the laboratory of the Center Muraz in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. All tests were done on 2-5-day-old, non-blood-fed, female mosquitoes. In addition to mortality after a 24-hour recovery period, insecticide knockdown effects were recorded after 10-, 20-, 30-, 40-, and 60-minute exposures. Fifty and ninety-five percent knockdown times (KDT₅₀ and KDT₉₅) were es-

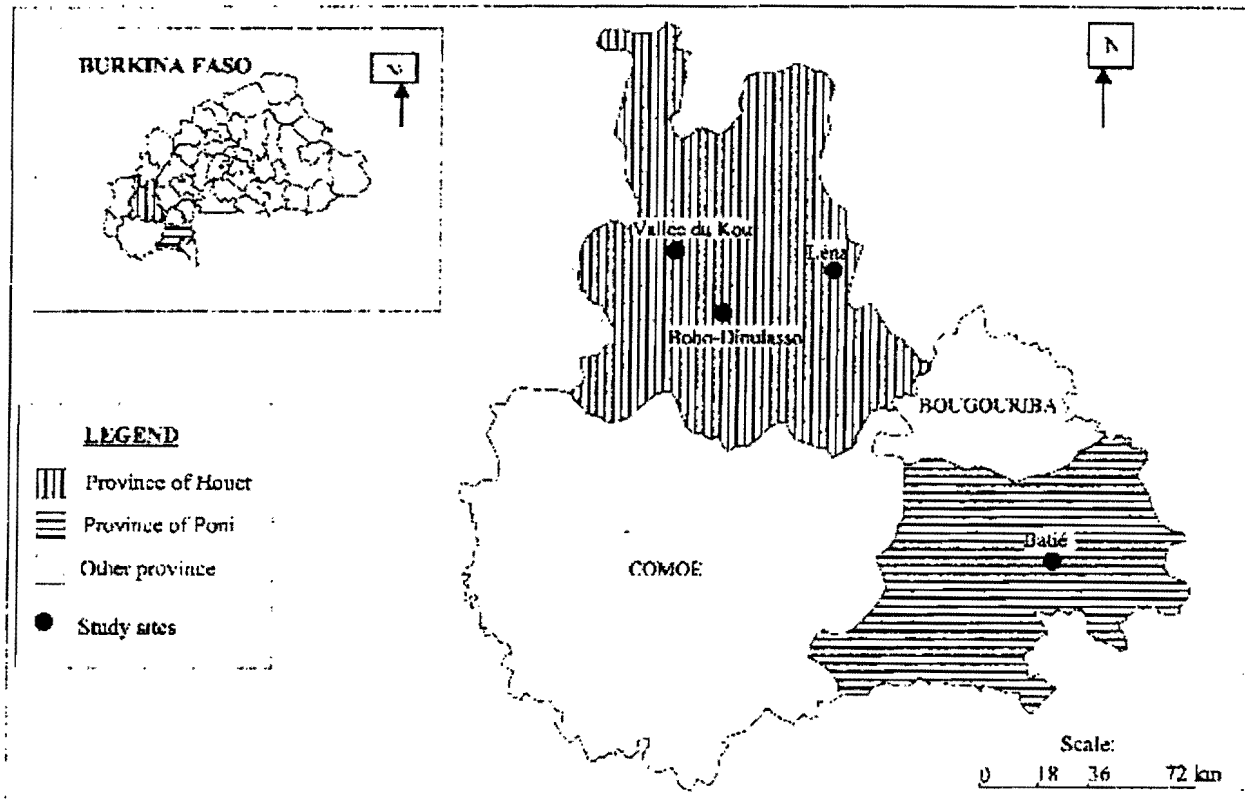


FIGURE 1. Study areas in Burkina Faso.

estimated using a log time-probit model.¹⁵ Samples were defined as resistant if they showed less than 90% mortality with 4% DDT and less than 95% mortality with 1% permethrin and 0.05% deltamethrin.⁶

Mosquito species, molecular forms, and the presence of the *kdr* mutation. Mosquitoes used in bioassays were identified to the species level using the polymerase chain reaction technique described by Scott and others¹⁶ and analyzed for the prevalence of *kdr* mutations.¹¹ *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes were identified as being the M or S form by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.¹⁷

RESULTS

Mortality. Mortality in control groups was consistently less than 5%. Thus, no correction of test sample data for observed control mortality was required. All WHO recommended discriminating dosages of insecticides caused 100% mortality in the susceptible Kisumu strain.

Mosquitoes collected in cotton-growing and urban areas were resistant to permethrin and DDT, but susceptible to deltamethrin (Figure 2). In the control area, complete susceptibility to the three insecticides was observed. The rice field area showed variable results. In July, mosquitoes collected in VK5, a village located in the center of the rice fields, were susceptible to permethrin and deltamethrin, but resistant to DDT. Four months later, when the rice was fully grown, mos-

quitoes collected from VK7, a village located on the outskirts of rice fields, were resistant to permethrin and DDT. When compared with the control area, significantly lower mortality with permethrin and DDT ($P < 0.05$) was obtained with mosquitoes from all test areas except from VK5, the rice field area. The numbers of mosquitoes tested from the different field sites ranged from 75 to more than 100.

Resistance levels were again tested in the cotton-growing, urban, and rice field areas in 2000. In the cotton-growing area, mosquitoes were susceptible to permethrin in the dry season (January and June). As the rainy season began, selection for resistance to permethrin was observed and mosquitoes became more resistant from July to September (Figure 3). In VK5, mosquito susceptibility remained unchanged throughout 2000. In the dry season, mosquitoes were already resistant to permethrin in the urban area and resistance increased during the rainy season. The KDT_{50} of the mosquitoes tested, when compared with that of the Kisumu strain, was slightly increased even with deltamethrin, which achieved a high mortality in all areas tested (Table 1). This knockdown time to permethrin and DDT was significantly increased ($P < 0.05$) in VK7, Léna, and Dso ba compared with the susceptible strain.

Mosquito species, molecular forms, and presence of the *kdr* mutation. Two hundred eighty mosquitoes were identified to species and molecular forms and analyzed for the *kdr* mutation. *Anopheles arabiensis* composed only a small percentage of the total *An. gambiae* s.l. population throughout the year,

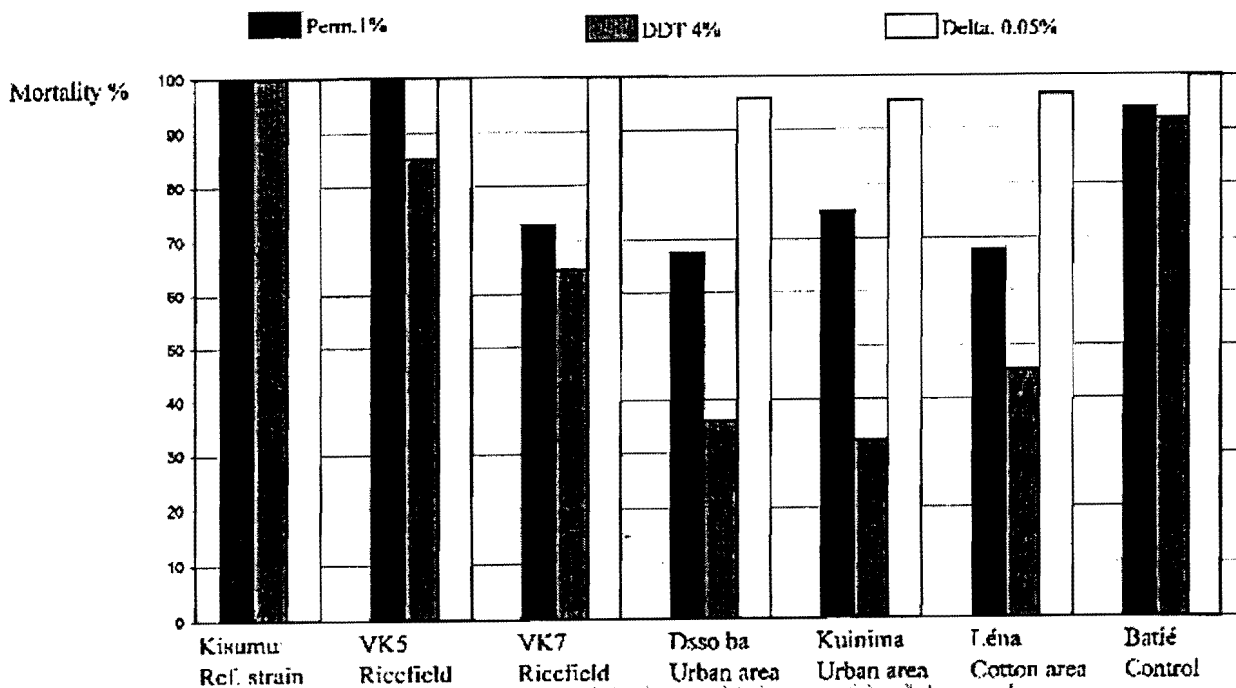


FIGURE 2. Mortality of *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso after a one-hour exposure to insecticide-impregnated paper in World health organization tubes. Perm. = permethrin; Delta. = deltamethrin; Ref. = référence.

except in Léna during the dry season (Table 2). During the rainy season, most *An. gambiae* s.s. were of the S form, with the M form being found only in the rice field area. During the dry season, the frequencies of the M forms of both *An. gam-*

biae s.s. and *An. arabiensis* increased, especially in the cotton-growing area, where the S form of *An. gambiae* s.s. was almost completely eliminated. This occurred at a significantly higher frequency in the cotton-growing and urban areas than in

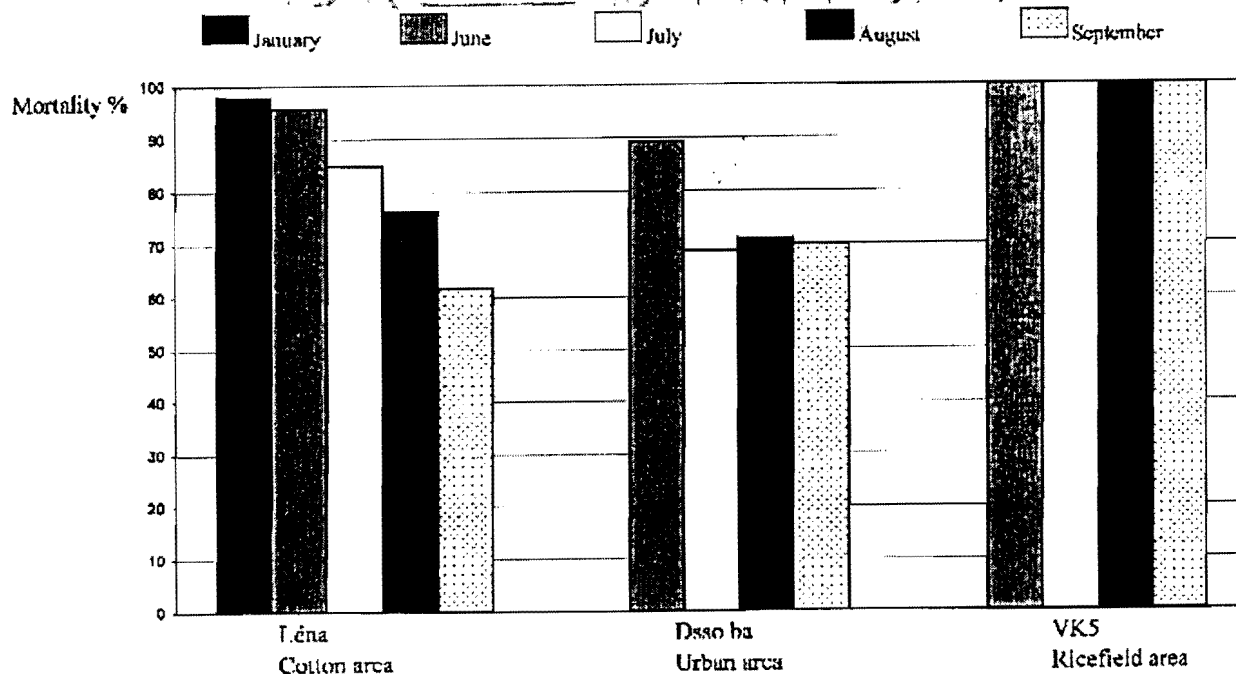


FIGURE 3. Mortality levels of *Anopheles gambiae* s.l. after exposure to 1% permethrin in three areas of Burkina Faso from January to September 2000.

TABLE 1

Knockdown times (KDTs) in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso after exposure to fixed insecticide dosages in a tarsal contact assay*

Insecticide	Area	Locality	KDT ₅₀ (min)	KDT ₉₅ (min)	Status
1 % Permethrin	†	–	10.4	15.2	S
		VK5	16.9	31.3	S
	Rice field	VK7	22.9	94	R
		Dsso ba	86.8	382.1	R
	Urban	Kuinima	57	382.1	R
	Cotton-growing	Léna	39.3	295.4	R
Control	Batié	12.3	36	S	
4% DDT	†	–	30.3	49.9	S
		VK5	33	93.9	R
	Rice field	VK7	36.2	163.5	R
		Dsso ba	992.1	Impossible	R
	Urban	Kuinima	123.3	Impossible	R
	Cotton-growing	Léna	105.9	Impossible	R
Control	Batié	24.8	124.4	S	
0.05% Deltamethrin	†	–	9.6	13.4	S
		VK5	14.3	27.8	S
	Rice field	VK7	21.8	37.4	S
		Dsso ba	29.4	53.8	S
	Urban	Kuinima	30.6	58.7	S
	Cotton-growing	Léna	22.4	46.7	S
Control	Batié	17.8	34.2	S	

* S = susceptible; R = resistant. Mortality was significantly lower than in the Kisumu strain ($P < 0.05$).

Batié. The *kdr* mutation was present in all areas tested except in the rice field village (VK5). The M forms of *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* did not have the *kdr* mutation.

DISCUSSION

In this study, resistance to permethrin and DDT in *An. gambiae* s.l. was found in the cotton-growing and urban areas of Burkina Faso. We also observed higher mosquito mortality with the WHO discriminating dosage of deltamethrin. Extensive use of insecticides for in the cotton-growing area may explain the high level of resistance observed in this region. Cotton farmers in Burkina Faso are obliged to use increased amounts of insecticides to avoid losses that can amount to half of their yield.¹⁸ In the urban area of Bobo-Dioulasso, resis-

tance to both permethrin and DDT can be explained by the extensive domestic use of insecticides as bomb sprays or coils.

A sociologic knowledge, attitude, and practice (KAP) survey in this city showed that more than 95% of the households use coils frequently to protect themselves against mosquito bites (Ouédraogo and others, unpublished data). This finding is consistent with a study carried out in 1993 in Bouaké, Côte d'Ivoire in which Elissa and others⁹ reported permethrin resistance in *An. gambiae* s.l. that was attributed to massive use of pyrethroids in households (coils, aerosols). In the rice-growing area, resistance differed in mosquitoes from the two study villages. During the rainy season, when mosquitoes were collected in VK5, we observed low resistance to DDT but not to permethrin. At the end of the rainy season, when the rice was fully grown, which prevented larval breeding in

TABLE 2
Frequency of knockdown resistance (*kdr*) mutations, species identification, and molecular forms*

Season	Area	<i>Anopheles gambiae</i> s.s.			S form			M form			<i>An. arabiensis</i>		
		%	N	F (<i>kdr</i>)	%	N	F (<i>kdr</i>)	%	N	F (<i>kdr</i>)	%	N	F (<i>kdr</i>)
Rainy	VK5	98.2	55	0	0	–	–	100	55	0	1.8	1	0
	Rice field												
	VK7	96.7	30	44.2	46.4	13	88.5	53.6	15	0	3.3	1	0
	Rice field												
	Dsso ba	100	61	95.6	100	61	95.6	–	0	–	–	0	–
	Urban												
Dry	Léna	96.2	51	89.6	100	51	89.6	–	0	–	3.8	2	0
	Cotton-growing												
	Batié	94.2	33	18.1	100	33	18.1	–	0	–	5.8	2	0
	Control												
	Dsso ba	91.7	22	83.3	85.7	18	97.2	14.3	3	0	8.3	2	0
	Urban												
	Léna	75	15	20	28.6	4	75	71.4	10	0	25	5	0
	Cotton-growing												

* F values are frequencies of the *kdr* mutation.

rice fields, mosquitoes in VK7, a village at the periphery of the rice fields, were resistant to both permethrin and DDT. Mosquitoes collected in VK5 were mainly of the M form, while those collected in VK7 were of mixed forms (M and S). The resistant mosquitoes from VK7 were only of the S form and might have migrated from the areas of high resistance into the rice fields. Insecticides are used less in the rice fields than in cotton-growing areas and the selection pressure is therefore lower in this area.

Results from the survey conducted in 2000 showed that resistance in mosquitoes varied with the season. In the dry season, mosquitoes were susceptible to all three insecticides tested in the cotton-growing area. During this season, insecticides are not used. During the rainy season, use of insecticides to protect cotton plants increases, which exerts selective pressure on the mosquito population and results in an increase in resistance. The *kdr* mutation, which is probably the main mechanism of pyrethroid resistance in this area, was found only in the S form of *An. gambiae* s.s.^{12,13} The absence of the *kdr* mutation in the M form mosquitoes is at least partly due to the M form being genetically isolated from the S form by a strong barrier to gene flow. In tropical areas, the molecular study of natural populations support the stability of genetic differentiation and the existence of effective isolation barriers, presumably acting at the pre-mating level.^{17,19} However, in southern Benin, the *kdr* mutation was recently detected in the M population.^{20,21} The low genetic diversity in the sodium channel introns of the resistant M and S mosquitoes suggests that a genetic sweep has occurred through an introgression from the S form.²² On the basis of this resistance survey in 2000, resistance is absent in *An. arabiensis* or the M form of *An. gambiae* s.s. in our study area. The frequencies of these species increase during the dry season. There is no intensive use of insecticides during that period. Mosquitoes that were collected from VK5 were resistant to DDT, but not to permethrin. The *kdr* mutation was not detected in mosquitoes from this site, suggesting that a GST-based metabolic mechanism of resistance may be present. The knockdown time is an important parameter in detecting early resistance in mosquitoes since the KDT₉₅ to DDT in the control area consistently increased, although mosquitoes were susceptible to this insecticide.

Resistance to insecticides in insect vectors constitutes a great problem in disease control. In a previous study, we demonstrated that resistance to pyrethroids occurred primarily in the cotton-growing area of Burkina Faso.⁷ This study has shown the variability of resistance to pyrethroids throughout the year, which is related to the use of insecticide in this country. We now plan to look for pesticide residues in mosquitoes-breeding sites to confirm the actual involvement of agriculture in the selection of resistance in mosquitoes. Any strategy of resistance management needs to consider the different selection pressures and allow accurate resistance monitoring. The use of molecular and biochemical techniques can provide a better understanding of gene flow between members of the *An. gambiae* sibling species complex. We will continue to monitor these field populations for movement of resistance genes between taxa as an indicator of gene flow.

Financial support: This study was supported by the Multilateral Initiative on Malaria, the Ambassade du Danemark au Burkina Faso,

and a grant from the l'Institut de Recherche pour le Développement to Abdoulaye Diabaté for his training in Montpellier and Cardiff.

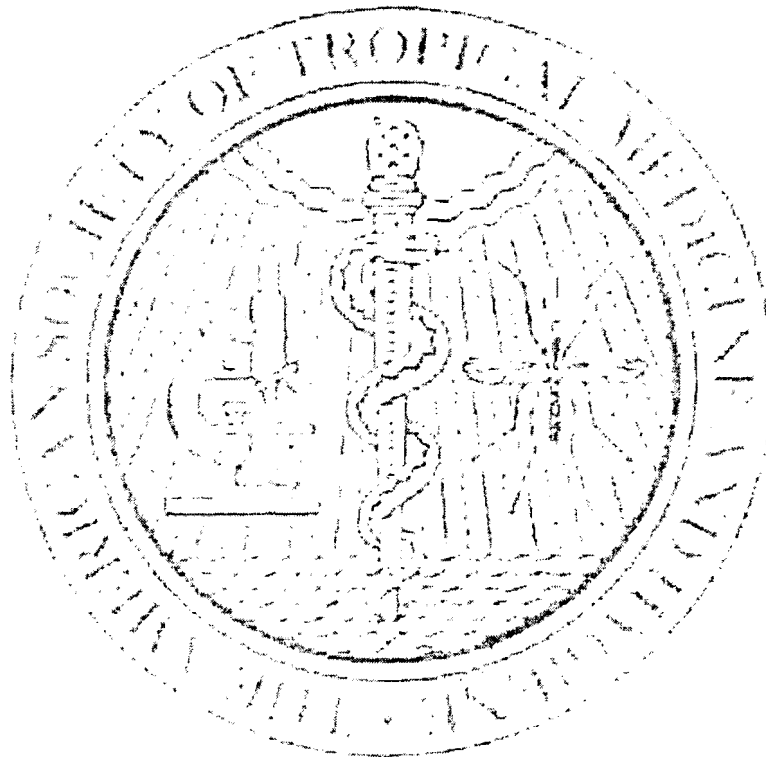
Authors' addresses: Abdoulaye Diabate, Thierry Baldet, and T. Robert Guiguemde, Laboratoire d'Entomologie et de Parasitologie, Centre Muraz, BP 153, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, Telephone: 226-97-01-02, Fax: 226-97-04-57, E-mail: a_diabate@hotmail.com. Fabrice Chandre, Institut Pierre Richet Bouaké, BP 1500, Bouaké 01, Côte d'Ivoire, Telephone: 225-81-32-14, Fax: 225-63-27-38. Martin Akogbeto, Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou, 06 BP 2604, Cotonou, Bénin, Telephone: 229-33-08-25, Fax: 229-33-08-25. Jean Marc Hougard, Cécile Brengues, and Frédéric Darriet, Laboratoire de Lutte Contre les Insectes Nuisibles (Institut de Recherche pour le Développement/Montpellier), 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France, Telephone: 33-4-67-04-32-23, Fax: 33-4-67-54-20-44. Pierre Guillet, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland, Fax: 41-22-791-4869. Janet Hemingway and Graham J. Small, School of Biosciences, Cardiff University, Main College, Cardiff, United Kingdom, Telephone: 44-1222-874-621, Fax: 44-1222-874-305.

REFERENCES

1. Georghiu GP. 1990. Overview of insecticide resistance. *ACS Symp Ser* 421: 18-41.
2. Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong JRM, Conteh M, Hill AG, David PH, Fegan G, DeFrancisco A, Hall AJ, Shenton FC, Cham K, Greenwood BM. 1991. The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. *Lancet* 337: 1499-1502.
3. Binka FN, Kubaje A, Adjuik M, Williams LA, Lengeler C, Maudei GH, Arma GE, Kajihra B, Adiamo JH, Smith PG. 1996. Impact of permethrin treated bed nets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop Med Int Health* 1: 147-154.
4. Nevill CG, Some ES, Mungala VO, Mutemi W, New L, Marsh K, Lengeler C, Snow RW. 1996. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health* 1: 139-146.
5. Elissa N, Mouchet J, Riviere E, Meunier JY, Yao K. 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann Soc Belg Med-Trop* 73: 291-294.
6. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bull World Health Organ* 77: 230-234.
7. Diabaté A, Quédraogo JB, Baldet T, Guillet P, Guiguemde TR. 2001. Pyrethroids resistance status of *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso (West Africa). *Med Vet Entomol* (in press).
8. Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P. 1999. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc* 15: 53-59.
9. Darriet F, Guillet P, N'Guessan RN, Doannio JMC, Koffi AA, Konan LY, Carnevale P. 1999. *The Impact of Permethrin and Deltamethrin Resistance in Anopheles gambiae* s.s. on the Efficacy of Insecticide-Treated Mosquito Nets. Geneva: World Health Organization, WHO/MAL/99.1088.
10. Knipple DC, Doyle KE, Marsella-Herrick A, Soderlund DM. 1994. Tight genetic linkage between the *kdr* insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2483-2487.
11. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé J B, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7: 179-184.
12. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P, Guillet P. 1999. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* 41: 319-322.
13. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. 2000. Identification of a point mutation in the voltage-

gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* 9: 491-497.

14. World Health Organization, 1970. *Résistance aux Insecticides et Lutte Antivectorielle*. Dix-Septième Rapport du Comité OMS d'Experts des Insecticides. Geneva: World Health Organization. (OMS, Série de Rapports Techniques, no. 443).
15. Raymond M, Prato G, Ratsira D, 1993. *PROBIT Analysis of Mortality Assays Displaying Quantal Response*. Version 3.3. St. Georges d'Orques, France.
16. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 520-529.
17. Favia G, della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N'F, Touré YT, Coluzzi M, 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 6: 377-383.
18. Anonymous, 1997. *Rapport Technique sur la Campagne Agricole Cotonnière 1996/1997*.
19. Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankaré O, Sow M, di Deco MA, Coluzzi M, 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477-511.
20. Fanello C, Akogbeto M, della Torre, A, 2000. Distribution of the pyrethroid knockdown resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. Research in Progress: Oral Presentations and Posters.
21. Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pasteur N, Guillet P, Raymond M, 2000. The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol* 9: 451-455.



ARTICLE 4

Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Dabiré R, Ido K, Guiguemdé TR & Hougard JM (2001). Sensibilité aux pyréthrinoïdes d'*Anopheles gambiae* si dans les hydro-aménagements au Burkina Faso : implications opérationnelles dans la lutte contre le paludisme. *Hydro-aménagements et système de production-Impact Social, Economique et Environnemental*. Editions Karthala : accepté

**SENSIBILITE AUX PYRETHRINOÏDES D'*ANOPHELES GAMBIAE* SL DANS LES
HYDRO-AMENAGEMENTS AU BURKINA FASO : IMPLICATIONS
OPERATIONNELLES DANS LA LUTTE CONTRE LE PALUDISME**

DIABATE A¹, BALDET T¹, CHANDRE F², DABIRE R¹, IDO K¹,
GUIGUEMDE TR¹ & HOUGARD JM²

1 : Centre Muraz 01 BP 360 Bobo-Dioulasso Burkina Faso

2 : LIN/IRD BP 5045 34 032 Montpellier France

RESUME

Les moustiquaires imprégnées de pyréthriinoïdes constituent une méthode efficace de prévention contre le paludisme. Cette méthode doit être vulgarisée et accessible au plus grand nombre. Des cas de résistance à la perméthrine et de baisse de sensibilité à la deltaméthrine d'*An. gambiae* sl vecteur majeur du paludisme ont été rapportés en Côte d'Ivoire, au Bénin et au Burkina Faso. Cette résistance croisée au DDT est contrôlée par le gène kdr. Ce gène aurait été sélectionné par l'utilisation massive du DDT pour les traitements du coton dans les années 60 et maintenu depuis par l'usage croissant des pyréthriinoïdes dans cette culture.

La présente étude vise à préciser la sensibilité aux pyréthriinoïdes d'*An. gambiae* sl dans les hydro-aménagements au Burkina Faso préalable à la diffusion des moustiquaires imprégnées. Trois sites sont retenus : Bama en zone soudanaise dans le sud-ouest cotonnier, Bagré en limite sud-est soudano-sahélienne et le Sourou en limite nord de la même zone climatique. Pour chaque site, des populations larvaires d'*An. gambiae* sl sont prélevées sur le terrain puis élevées au Centre Muraz. Les tests standard OMS sont réalisés sur les femelles adultes émergentes aux doses diagnostiques (perméthrine 1%, deltaméthrine 0,05% et DDT 4%).

Les résultats montrent une résistance à la perméthrine à Bama. Une sensibilité réduite à la perméthrine est relevée à Bagré. Au Sourou, *An. gambiae* sl demeure sensible aux deux pyréthriinoïdes. La résistance à Bama croisée au DDT confirme les résultats antérieurs et l'implication probable de la culture cotonnière dans la sélection de cette résistance. La sensibilité notée dans les autres sites repose sur une pression sélective moins importante.

L'usage des moustiquaires imprégnées en prévention contre le paludisme dans les hydro-aménagements au Burkina Faso apparaît judicieux. Toutefois, l'apparition d'une résistance à la perméthrine dans certains sites souligne toute l'importance d'une surveillance régulière de la sensibilité aux pyréthriinoïdes des populations locales d'*An. gambiae* sl.

Mots-clés : Pyréthriinoïdes, *Anopheles gambiae* s.l, Hydro-aménagements

INTRODUCTION

Le paludisme reste la maladie tropicale la plus répandue et une des principales causes de mortalité infantile en Afrique tropicale. La lutte anti-palustre repose d'une part sur un diagnostic précoce et un traitement rapide des cas et d'autre part sur la lutte antivectorielle. Des études récentes réalisées en Afrique montrent que les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes constituent une méthode de prévention efficace [1, 2, 3].

Cet outil efficace de protection doit être vulgarisé et accessible au plus grand nombre. Néanmoins, de multiples problèmes se posent dont la faisabilité et la durabilité de cette méthode à large échelle et la résistance des moustiques vecteurs aux insecticides utilisés. Les premiers cas de résistance aux pyréthrinoïdes d'*An. gambiae* sl, vecteur majeur du paludisme en Afrique, sont décrits dans la ville de Bouaké en Côte d'Ivoire en 1993 [4].

Cette résistance se traduit avec la perméthrine par une disparition de l'effet knock down (paralysie rapide) et une baisse de la mortalité. Avec les autres pyréthrinoïdes (deltaméthrine), l'effet kd est retardé et la mortalité conservée. Depuis, une résistance généralisée à la perméthrine et une baisse de sensibilité à la deltaméthrine ont été notés dans plusieurs sites urbains et ruraux en Côte d'Ivoire ainsi qu'au Burkina Faso (Bama) et au Bénin (Cotonou). La résistance aux pyréthrinoïdes est croisée au DDT, là où cet insecticide organochloré a été testé [5]. Le mécanisme responsable de cette résistance croisée dénommé gène kdr (knock down resistance) consiste en une mutation de la séquence du gène codant pour le canal sodium des axones nerveux, site cible de ces insecticides. Le gène kdr a été mis en évidence dans un premier temps chez des insectes domestiques résistants aux pyréthrinoïdes (*Musca domestica*, *Blattella germanica*) puis plus récemment chez *An. gambiae* en Afrique de l'Ouest [6]. Il aurait été dans ce cas particulier sélectionné par l'usage massif des organochlorés (DDT) en agriculture dans les années 60-70, surtout pour les traitements du coton [7] et maintenue depuis cette date par l'introduction et l'usage croissant des pyréthrinoïdes contre les ravageurs

de cette culture. La répartition actuelle de la résistance aux pyréthriinoïdes correspond en effet aux zones où une résistance d'*An. gambiae* sl au DDT avait été déjà décrite à cette époque.

Les cas de résistance décelés au sud-ouest du Burkina Faso dans la zone rizicole de Bama soulignent la nécessité d'étendre cette étude à d'autres hydro-aménagements du pays avant la mise en place de vastes programmes de lutte anti-palustre par moustiquaires imprégnées.

METHODOLOGIE

1) Site d'étude

Trois sites d'hydro-aménagements représentatifs des différents faciès climatiques du Burkina Faso ont été retenus. A Bama, situé en zone soudanaise dans la région cotonnière au sud-ouest du pays, deux villages ont été prospectés : VK5 au centre des rizières et VK7 en périphérie à 1 km du précédent. A Bagré, en limite sud-est de la zone soudano-sahélienne, un seul village en périphérie des rizières a été étudié. Enfin au Sourou, en limite nord de la même zone, deux villages ont été prospectés : Di village traditionnel avec des cultures vivrières non concernées par les aménagements et Niassan village récemment implanté en périphérie des rizières.

2) Tests de sensibilité

Dans chaque site, des populations larvaires d'*An. gambiae* sl ont été prélevées sur le terrain en saison des pluies 1999 puis ramenées à l'insectarium du Centre Muraz pour élevage. Les tests standard OMS de sensibilité aux insecticides sont réalisés sur les femelles adultes émergentes non gorgées aux doses diagnostiques : perméthrine 1%, deltaméthrine 0,05% et DDT 4% [8].

La perméthrine est testée en priorité et lorsque les effectifs le permettent, on teste aussi la deltaméthrine et le DDT. La souche Kisumu d'*An. gambiae* sensible à tous les insecticides et maintenue à l'insectarium du Centre Muraz depuis 1997 est utilisée comme référence.

Deux critères sont utilisés : (ii) Le suivi de l'effet kd pendant l'exposition à l'insecticide (1 h)
Toute augmentation significative des KdT_{50}^1 et KdT_{95}^2 constitue un indicateur précoce d'une baisse de sensibilité et indique l'implication probable du gène kdr en cas de résistance avérée.
(i) La mortalité après 24h d'observation. Si cette mortalité est inférieure à 95%, la souche de moustique est considérée comme résistante vis à vis de l'insecticide testé.

3) Diagnostics d'espèces, de formes moléculaires et fréquence de la mutation kdr

Pour chaque site, des diagnostics PCR ont été réalisés sur 30 femelles d'*An. gambiae* si exposées à la perméthrine 1%. Ces diagnostics permettent de distinguer au sein du complexe *An. gambiae* si les espèces jumelles *An. arabiensis* et *An. gambiae* [9] toutes deux vectrices du paludisme et au sein de l'espèce *An. gambiae* les formes M et S [10] qui diffèrent par leur bio-écologie. Chaque femelle identifiée est analysée pour la mutation kdr [6].

RESULTATS

1) Tests de sensibilité

Les 3 sites (5 villages) ont tous été testés à la perméthrine 1% et pour certains sur les mêmes populations à la deltaméthrine 0,05% et au DDT 4% (tableau I). Les prélèvements ont été réalisés au cours de la saison des pluies (juillet à VK5 et à VK7, septembre à Bagré) ou en fin de saison des pluies (novembre à Di et à Niassan) de l'année 1999. A VK7, un second prélèvement a été réalisé en fin de saison des pluies en novembre 1999. Tous les tests ont été réalisés sur la F1 issue de larves prélevées sur le terrain. A Niassan, un test a été également réalisé sur une F1 issue de femelles adultes gorgées récoltées par captures résiduelles.

¹ KdT_{50} : temps d'exposition en minutes pour lequel 50% des individus testés sont "paralysés"

² KdT_{95} : temps d'exposition en minutes pour lequel 95% des individus testés sont "paralysés"

1-1) Mortalité

Pour tous les tests effectués, la mortalité dans le témoin n'a jamais dépassé 5%. De ce fait, aucune correction de la mortalité observée n'a été nécessaire. Pour la perméthrine, la lecture de la mortalité à 24h montre une sensibilité pour VK5 et les deux villages du Sourou. A Niassan, aucune différence significative n'apparaît entre les deux types de prélèvements (larves et adultes). A Bagré et VK7, les populations d'*An. gambiae* sl sont résistantes à la perméthrine. A VK7, entre juillet (I) et novembre (II) i.e. début et fin de saison des pluies, le taux de mortalité passe de 91% à 73% signe que le niveau de résistance augmente.

Toutes les populations d'*An. gambiae* sl testées apparaissent sensibles à la deltaméthrine, même celles de VK7 et de Bagré ayant montré une résistance à la perméthrine. Pour le DDT, toutes les populations testées (VK5, VK7 I et Di) sont résistantes à cet organochloré.

1-2) Effet knock-down (kd)

D'une manière générale, l'effet kd est bien corrélé aux temps d'exposition aux insecticides. Pour la perméthrine, les KdT₅₀ et KdT₉₅ notés à VK5, Bagré, Di et Niassan sont comparables à ceux de la souche Kisumu. Là encore, aucune différence significative n'apparaît à Niassan entre les deux types de prélèvements. A VK7, les temps de kd sont significativement plus élevés et augmentent au même titre que le niveau de résistance entre juillet et novembre 1999.

Pour la deltaméthrine, les temps de kd observés à Bagré, Di et Niassan sont comparables à ceux de Kisumu. Par contre, on observe une augmentation significative des KdT₅₀ et KdT₉₅ pour les deux prélèvements réalisés à VK7. Enfin, en ce qui concerne le DDT, les KdT₉₅ relevés à VK5 et à VK7 sont significativement plus élevés que ceux de la souche de référence.

2) Diagnostics d'espèces, de formes moléculaires et fréquence de la mutation kdr

Un total de 175 femelles d'*An. gambiae* si exposées à la perméthrine 1% a été testé par PCR à la fois pour l'identification "espèces", "formes" et "gène kdr" (tableau II). Les deux espèces *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont en sympatrie dans tous les sites avec des proportions variables. A Bama (VK5 et VK7), *An. arabiensis* est très peu représenté (3% à 4%). Dans le Sourou, *An. arabiensis* est plus présent avec 10% à Di et 13% à Niassan. A Bagré, *An. arabiensis* devient majoritaire avec 78% de l'échantillon testé contre 22% pour *An. gambiae*.

Au sein de l'espèce *An. gambiae*, l'analyse des formes M/S montre une grande variabilité selon les sites. A VK5 et Di, tous les spécimens d'*An. gambiae* testés (24 dans les deux sites) sont de la forme M. La forme M est aussi prépondérante (88%) à Niassan tandis qu'à Bagré parmi les 6 spécimens d'*An. gambiae* détectés, 4 appartiennent à cette même forme. A VK7, dans un bas-fond à proximité immédiate des casiers rizicoles, la proportion de M de 70% en juillet tombe à 37% en novembre au dépend de la forme S qui devient majoritaire.

Dans tous les sites, le gène kdr n'a pas été retrouvé ni chez *An. arabiensis* (31 spécimens testés), ni chez la forme M d'*An. gambiae* (100 spécimens testés). Seule la forme S exprime la mutation kdr et donc une résistance aux pyréthrinoïdes contrôlée par ce mécanisme. Aussi, le gène kdr est totalement absent à VK5 et à Di. A Bagré et à Niassan, la fréquence allélique du gène kdr au sein de l'échantillon testé (*An. gambiae* si) est très faible inférieure à 2%. A VK7, cette fréquence est plus élevée et augmente entre juillet (27%) et novembre (41%). Ceci correspond pour les tests de sensibilité aux niveaux de résistance à la perméthrine les plus élevés et aussi à une augmentation de ces niveaux de résistance entre juillet et novembre.

DISCUSSION

Une résistance à la perméthrine d'*An. gambiae* sl existe à Bama confirmant les données antérieures [5]. Cependant, deux cas de figure se posent. Dans le village central de VK5, la forme M constitue la quasi-totalité des *An. gambiae* sl récoltés dans les casiers rizicoles. Cette forme adaptée aux zones irriguées ou inondées en Afrique de l'Ouest n'exprime pas le gène kdr et en l'absence d'autres mécanismes de résistance se montre sensible à la perméthrine.

Dans le village périphérique de VK7, la forme S plus adaptée aux gîtes temporaires liés aux précipitations prédomine dans l'échantillon. Ces spécimens montrent lors des tests à la perméthrine un retard de l'effet kd et une baisse de la mortalité liés à une fréquence allélique élevée du gène kdr. Cette résistance croisée au DDT confirme l'implication du gène kdr.

Une étude menée en 1998 dans plusieurs sites du Burkina Faso [11] souligne que la résistance perméthrine/DDT avec une fréquence élevée du gène kdr est plus importante dans les sites ruraux du sud-ouest où l'utilisation passée (DDT) et actuelle (pyréthri-noïdes) des insecticides contre les ravageurs du coton est intense. Parallèlement, une résistance est aussi notée dans les deux plus grandes villes (Bobo-Dioulasso, Ouagadougou). Elle pourrait s'expliquer en partie par l'usage croissant des pyréthri-noïdes en hygiène domestique urbaine (tortillons, aérosols).

A VK7, la résistance à la perméthrine et la fréquence du gène kdr au sein de l'échantillon testé augmentent entre le début et la fin de la saison des pluies. Cette variation saisonnière de la résistance des populations d'*An. gambiae* sl en rapport avec la pression de sélection et l'occupation spatio-temporelle des espèces et des formes moléculaires a été démontrée par une étude récente réalisée sur plusieurs sites : rizicole, cotonnier et urbain [12].

A Bagré, la résistance à la perméthrine est en limite de seuil tandis que dans le Sourou, les populations d'*An. gambiae* sl sont sensibles. Dans les deux cas, l'effet kd est similaire à celui relevé pour la souche de référence. Ces différences de sensibilité par rapport à VK7 et plus

généralement par rapport aux autres localités rurales du sud-ouest reposent sur différents facteurs à commencer par une pression sélective moins importante. Bagré et le Sourou sont situés en dehors de la zone cotonnière et les pratiques agricoles d'implantation récente sont moins consommatrices d'insecticides quantitativement et historiquement. Aussi, la fréquence allélique du gène *kdr* au sein de la seule forme S d'*An. gambiae* reste faible comparé aux valeurs relevées à VK7. En second lieu, ces sites sont en situation plus septentrionales et/ou continentales. La proportion d'*An. arabiensis* au sein du complexe *An. gambiae* s'est plus importante. Hors le gène *kdr* n'a pour l'instant jamais été décelée chez cette espèce.

A VK7, nous n'avons pas décelé la mutation *kdr* chez la forme M d'*An. gambiae* bien que cette dernière se trouve en sympatrie (en l'occurrence dans le même gîte larvaire) avec la forme résistante S. Ceci peut s'expliquer (i) de par son adaptation aux gîtes permanents et notamment les casiers rizicoles, cette forme est moins exposée aux pressions de sélection insecticide que la forme S qui se développe dans les collections d'eau temporaire au contact des champs cotonniers ; (ii) les études des populations naturelles d'*An. gambiae* dans la même région soulignent les différenciations génétiques établies entre les deux formes et l'existence de mécanismes d'isolement effectifs probablement au niveau pré-copulatoire [13].

En ce qui concerne la deltaméthrine, la discordance observée notamment lors du prélèvement de novembre 1999 à VK7 entre une résistance à la perméthrine (73%) et une parfaite sensibilité à la deltaméthrine (100%) sur une population où la fréquence de la mutation *kdr* est élevée nous laisse penser que la dose diagnostique de 0,05% préconisée par l'OMS pour la deltaméthrine pourraient être trop élevée. Ce constat doit être toutefois plus documenté.

Enfin, en ce qui concerne le DDT, la résistance observée à Di sans retard notable de l'effet kd avec dans le même temps une sensibilité à la perméthrine nous laisse penser à l'implication des mécanismes de détoxification accrue spécifiques à cet organochloré tels que les GST.

CONCLUSION

Cette étude menée dans des hydro-aménagements au Burkina Faso confirme la présence d'une résistance à la perméthrine à Bama et dans une moindre mesure à Bagré tandis que les populations d'*An. gambiae* sl du Sourou demeurent sensibles. Les disparités spatiales et saisonnières de cette résistance reposent à la fois sur les pressions de sélection insecticide à usage agricole et aussi sur les variations de composition au sein du complexe *An. gambiae* sl. Cependant, il est difficile de présumer de l'efficacité réelle d'un insecticide en conditions opérationnelles sur le terrain à partir de résultats obtenus par de simples tests de sensibilité. On ne peut donc pas déconseiller pour l'imprégnation des moustiquaires l'utilisation des pyréthrinoïdes même en cas de résistance avérée. Une étude récente réalisée avec des cases-pièges en Côte d'Ivoire montre que les moustiquaires imprégnées restent toujours efficaces sur des populations d'*An. gambiae* résistantes avec une fréquence élevée du gène kdr [14]. Nous préconisons donc l'usage des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes pour lutter contre le paludisme dans les hydro-aménagements d'autant plus que la nuisance culicidienne élevée tout au long de l'année favorise l'adhésion des populations à cet outil de prévention. Toutefois, la résistance avérée dans certains sites souligne toute l'importance (i) d'une surveillance régulière de la sensibilité aux pyréthrinoïdes d'*An. gambiae* sl sans oublier les autres vecteurs et (ii) d'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et des facteurs favorisant l'évolution de la résistance. Une tel programme devrait se faire à l'échelle du pays entier parallèlement à la vulgarisation accrue des moustiquaires imprégnées.

BIBLIOGRAPHIE

1. **D'Alessandro U, Olaleye B, McGuire W *et al.*, 1995.** Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of a bednet programme. *Lancet* ; **345** : 479-83.
2. **Binka FN, Kubaje A, Adjuik M *et al.*, 1996.** Impact of permethrin treated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop Med Internat Health* ; **1** : 147-54.
3. **Nevill CG, Some ES, Mung'ala VO *et al.*, 1996.** Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Internat Health* ; **1** (2) : 139-46.
4. **Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K, 1993.** Resistance of *Anopheles gambiae* ss to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann Soc belge Med Trop* ; **73** : 291-4.
5. **Chandre F, Darriet F, Manga L *et al.*, 1999.** Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bull World Health Organ* ; **77** : 230-4.
6. **Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS *et al.*, 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Ins Mol Biol* ; **7** (2) : 179-84.
7. **Mouchet J, 1988.** Mini-review: agriculture and vector resistance. *Ins Sc Appl* ; **9** : 297-02.
8. **OMS, 1998.** Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12.
9. **Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993.** Identification of single specimens of *An. gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* ; **49** : 520-9.
10. **Favia G, della Torre A, Bagayoko M *et al.*, 1997.** Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Ins Mol Biol* ; **6** (4) : 377-83.

11. Diabaté A, Ouedraogo JB, Baldet T *et al.*, 2001. Pyrethroid susceptibility status of *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. *Med Vet Entomol* (sous presse).
12. Diabaté A, Baldet T, Chandre F *et al.*, 2001. The role of agriculture and household insecticide use in *An. gambiae* sl resistance to pyrethroids in Burkina Faso (West Africa). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (sous presse).
13. Touré YT, Petrarca V, Traoré SF *et al.*, 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia*, 40 : 477-11.
14. Darriet F, Guillet P, N'Guessan RN *et al.*, 1999. The impact of permethrin and deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae* ss on the efficacy of insecticide-treated mosquito nets. WHO/MAL/99.1088 ; 20 p.

Tableau I : Sensibilité de populations sauvages d'*An. gambiae* si aux insecticides de référence au cours de la saison des pluies 1999 (tests adulte OMS)

Insecticide	Perméthrine 1% ¹				Deltaméthrine 0,05% ¹				DDT 4% ¹			
	N Date	KdT ₅₀ (min)	KdT ₉₅ (min)	M (%)	N Date	KdT ₅₀ (min)	KdT ₉₅ (min)	M (%)	N Date	KdT ₅₀ (min)	KdT ₉₅ (min)	M (%)
Kisumu (référence)	100 08/99	14 [13-16]	20 [18-22]	100 S	100 08/99	10 [9-12]	15 [14-18]	100 S	100 08/99	30 [28-32]	50 [47-53]	100 S
Bama VK5 (casiers rizicoles)	95 07/99	17 [16-18]	31 [28-36]	97 S	-	-	-	-	54 07/99	33 [30-37]	94 [79-119]	85 R
Bama VK7 I (bas-fond)	70 07/99	19 [17-21]	64 [51-90]	91 R	57 07/99	19 [21-25]	64 [47-67]	98 S	96 07/99	36 [33-40]	94 [80-116]	90 R
Bama VK7 II (bas-fond)	81 11/99	23 [20-24]	94 [73-110]	73 R	50 11/99	22 [19-26]	72 [52-104]	100 S	-	-	-	-
Bagré (zone d'inondation)	104 09/99	14 [14-15]	26 [23-29]	93 R	79 09/99	12 [11-13]	23 [21-27]	100 S	-	-	-	-
Sourou Di (zone d'inondation)	96 11/99	14 [14-15]	24 [22-26]	98 S	95 11/99	19 [18-21]	37 [31-44]	100 S	97 11/99	32 [29-36]	64 [51-81]	89 R
Sourou Niassan L (bas-fond)	82 11/99	15 [13-18]	26 [20-33]	96 S	-	-	-	-	-	-	-	-
Sourou Niassan A (faune résiduelle)	51 11/99	15 [14-16]	23 [21-28]	100 S	53 11/99	18 [16-19]	36 [31-48]	100 S	-	-	-	-

¹ : Dose diagnostique OMS / N : Nombre d'individus testés / Date : Date de réalisation du test

KdT₅₀ : temps d'exposition en minutes pour lequel 50% des individus testés sont "paralysés" - [IC à 95%]

KdT₉₅ : temps d'exposition en minutes pour lequel 95% des individus testés sont "paralysés" - [IC à 95%]

M : Pourcentage de mortalité relevé à 24h après 1h d'exposition aux doses diagnostiques OMS

Statut : **S** = Sensible (95% < M ≤ 100%) ; **R** = Résistant (M ≤ 95%)

Tableau II : Diagnostics d'espèces, de formes moléculaires et fréquence de la mutation kdr chez des femelles d'*An. gambiae* s/l issues des tests de sensibilité à la perméthrine 1%

Site d'étude	<i>An. gambiae</i> s/l		<i>An. gambiae</i>		Forme S		Forme M		<i>An. arabiensis</i>	
	N	F (kdr)	%	F (kdr)	%	F (kdr)	%	F (kdr)	%	F (kdr)
Bama VK5 (casiers rizicoles)	30	0	97 (29)	0	0 (0)	-	100 (24)	0	3 (1)	0
Bama VK7 I (bas-fond)	30	27	97 (29)	28	30 (8)	93	70 (19)	0	3 (1)	0
Bama VK7 II (bas-fond)	28	41	96 (27)	44	63 (12)	92	37 (7)	0	4 (1)	0
Bagré (zone d'inondation)	27	1,8	22 (6)	8	33 (2)	25	67 (4)	0	78 (21)	0
Sourou Di (zone d'inondation)	30	0	90 (27)	0	0 (0)	-	100 (24)	0	10 (3)	0
Sourou Niassan L (bas-fond)	30	1,7	87 (26)	2	12 (3)	16	88 (22)	0	13 (4)	0

N : Nombre de femelles d'*An. gambiae* s/l testées

F (kdr) : Fréquence allélique de la mutation kdr au sein de l'échantillon $(RR+RS)/(RR+RS+SS)$

% : Pourcentage (*effectifs*) des espèces ou formes moléculaires reporté au nombre de femelles testées

ARTICLE 5

Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Guiguemdé TR, Guillet P, Hemingway J & Hougard JM (2002). First report of the Kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. Short note dans *Parassitologia*: sous presse.

**FIRST REPORT OF THE KDR MUTATION IN *ANOPHELES GAMBIAE* M
FORM FROM BURKINA FASO, WEST AFRICA**

A. DIABATE¹, T. BALDET¹, F. CHANDRE², RT.GUIGUEMDE¹, C. BRENGUES³, P.
GUILLET⁴, J. HEMINGWAY⁵,
. & JM. HOUGARD³

1 : Laboratoire d'Entomologie et de Parasitologie Centre Muraz BP153 Bobo-Dosso, Burkina Faso

2 : Institut Pierre Richet Bouaké BP 1500 Bouaké 01, Côte d'Ivoire

3 : LIN (IRD/Montpellier), 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

4 : World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland

5 : School of Biosciences, Cardiff University, Main College, Cardiff, UK

Running head : Kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form.

Key words : Kdr mutation, *Anopheles gambiae* M form, pyrethroid resistance, Burkina Faso

Resistance of *Anopheles gambiae* ss to pyrethroid was first reported in Bouaké, Côte d'Ivoire (Elissa *et al.*, 1993). This phenotype results from a single point mutation in a gene that encodes the sodium channel (Martinez-Torres *et al.*, 1998), and confers the characteristic knockdown resistance (kdr). Following availability of rapid PCR-based diagnostic tests that allowed detection of the kdr mutation in field mosquitoes (Martinez-Torres *et al.*, 1998, Fanello *et al.*, 1999), several studies were conducted to estimate the prevalence and assess the current distribution of this mutation in natural *An. gambiae* populations from throughout the African continent (Chandre *et al.*, 1999; Weill *et al.*, 2000; della Torre *et al.*, 2001; Diabaté *et al.*, in press a). A serendipitous finding of these studies was that the kdr mutation seemed to occur in mainly one of the recently described molecular forms of *An. gambiae*, namely the S form (Favia *et al.*, 1997; 2001; della Torre *et al.*, 2001) despite similar insecticide pressure. This result thus provided strong evidence for restricted gene flow within the *An. gambiae* species (Chandre *et al.*, 1999) and strengthened earlier evidences for genetic heterogeneity within this major malaria vector (Coluzzi, 1985; Touré *et al.*, 1998). The issue of reproductive isolation of the M and S forms of *An. gambiae* (and, more broadly, of incipient speciation within this mosquito species) has indeed generated much debate and it is still unclear whether these forms can actually be considered as "true" species (Black and Lanzaro, 2001; della Torre *et al.*, 2001; Gentile *et al.*, 2001). Although M/S hybrids are extremely rare in nature and strong assortative mating within both molecular forms has been demonstrated (Tripet *et al.*, 2001), they mate freely in the laboratory (Chandre *et al.*, 1999). Trying to verify whether the kdr gene was transmissible from one form to the other, these authors have crossed in the laboratory the two molecular forms (identified by PCR-RFLP, Favia *et al.*, 1997) and found that they could interbreed freely. Then the F1 progeny (hybrid individuals) successfully reproduced lately in the laboratory (Chandre, data not published). Crossing

experiments between the chromosomal forms Bamako/Savanna and Mopti were successfully achieved in Mali where the molecular M form was found lately to correspond to Mopti and the S form to Savanna/Bamako (Touré *et al.*, 1998; della Torre *et al.*, 2001). Additionally, the *kdr* mutation was recently described from M mosquitoes collected in a tropical forest area from Benin, and subsequent molecular analysis of the DNA sequence of a large upstream intron suggested that this highly adaptive mutation arose in the M form through genetic introgression from the S form (Fanello *et al.*, 2000; Weill *et al.*, 2000). These are, to date, the only reports of the *kdr* mutation in *An. gambiae* mosquitoes from the M form.

In the present note, we aim at reporting a new case of the *kdr* mutation we observed at an heterozygous state in a mosquito from the M form. This event was detected in the framework of a large ongoing survey of the *kdr* mutation conducted throughout the year in Vallée du Kou, a rice field area in Burkina Faso. Mosquitoes were collected by the human bait catches sampling method from March 1999-February 2000 then a sample of 200 mosquitoes were processed as follows. Genomic DNA was extracted from single mosquitoes and PCR amplified to identify the species within the *An. gambiae* complex (Scott *et al.*, 1993), to determine the molecular (M or S) form within the species *An. gambiae* ss (Favia *et al.*, 2001) and finally to detect the *kdr* mutation (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Overall 39 (19,5%) *An. gambiae* S were identified and the *kdr* mutation occurred in this molecular form at 0.95 frequency (35RR+4RS). *An. gambiae* M represented 80,5% (161) of the mosquitoes and just one heterozygote individual for the *kdr* mutation was observed in this molecular form. We are confident that any possibility of contamination can be excluded because mosquitoes were stored properly in the field in individual tubes and the heterozygous resistant mosquito is clearly from the M form, and does not show an heterozygous (M/S) pattern. Repetitive PCR amplification consistently provided the same pattern. Previous studies in the

same area failed to identify the kdr mutation in the *An. gambiae* molecular M form (Diabaté *et al.*, in press a and b).

Coluzzi (1999) made a strong argument that there have been recent and dramatic changes in the structure of *An. gambiae* populations, mainly driven by human activities making new habitats available and selection on the mosquitoes to occupy these new ecological niches. The importance of this is difficult to evaluate, underlining the need of using independent estimates of gene flow (Taylor *et al.*, 2001).

As the kdr mutation undoubtedly provides strong fitness advantage to its carriers in areas of high insecticide pressure, it is extremely likely to spread quickly within the M population of our study area. We will continue to monitor this process using molecular techniques as a clear understanding of the rise and spread of such highly adaptive genes in such an important malaria vector is of paramount importance for both the epidemiology of the disease and the development of effective means to control its vectors, and will greatly improve our knowledge of the relationships between and within *An. gambiae* populations.

REFERENCES

- Black WC IV and Lanzaro GC (2001). Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss: introgressive hybridization, adaptative inversions or recent reproductive isolation? *Insect Mol Biol*, **10**, 3-7.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P & Guillet P, (1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west africa and futher evidence for reproductive isolation of the mopti form. *Parassitologia* **41** :319-322.
- Coluzzi M, Petrarca V & Di Deco MA (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* **52** : 45-63.
- Coluzzi M, (1999) The clay feet of the malaria giant and its african roots hypotheses and inferencies about origin spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia* **41** : 277-283.
- Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-Yovo J, Favia G, Petrarca V & Coluzzi M (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Mol Biol* **10(1)**, 9-18.
- Diabaté A, Ouédraogo JB, Baldet T, Guillet P, Guiguemdé TR. Pyrethroids resistance status of *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso (West Africa). *Med Vet Entomol* (in press a).
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemdé TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Graham SG and Hougard JM,. The role of agriculture and household use of insecticide in *Anopheles gambiae* sl resistance to pyrethroids in Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg* (in press b).
- Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY & Yao K, (1993). Resistance of *Anopheles gambiae* ss. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, **73** : 291-294.

- Fanello C, Kolaczinski J, Conway DJ, Curtis CF, Carnevale P (1999). The kdr pyrethroid resistance gene in *Anopheles gambiae* s.l. : tests of non-pyrethroid insecticides and improvement of the detection method for the gene. *Parassitologia* **41** : 323-326.
- Fanello C, Akogbeto M, della Torre A (2000). Distribution of the knockdown resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94** : 132
- Favia G, della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N'F, Touré YT & Coluzzi M, (1997). Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* **6(4)** : 377-383.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I & Louis C, (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Mol Biol* **10(1)**, 19-23.
- Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR and Caccone A (2001). Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* **10**, 25-32.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé J B, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N & Pauron D, (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, **7(2)** : 179-184.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993). Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **49** : 520-529.

- Taylor C, Touré YT, Carnahan J, Norris DE, Dolo G, Traoré SF, Edillo FE and Lanzaro GC, (2001). Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* **157** : 743-759.
- Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maïga HM, Sankaré O, Sow M, Di Deco MA & Coluzzi M, (1998). The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* **40** : 477-511.
- Tripet F, Touré YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G and Lanzaro GC (2001). DNA analysis transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, **10**, 1725-1732.
- Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pasteur N, Guillet P & Raymond M, (2000). The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol* **9**(5) : 451-455.

ARTICLE 6

Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Dabiré KR, Kengne P, Simard F, Guiguemdé TR, Guillet P, Hemingway J & Hougard JM (2002). Kdr mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera, Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. *Journal of Medical Entomology*: sous presse.

KDR Mutation, a Genetic Marker to Assess Events of Introgression Between the Molecular M and S Forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the Tropical Savannah Area of West Africa

DIABATE ABDOULAYE,¹ BALDET THIERRY,¹ CHANDRE CHANDRE,²
DABIRE KOUMBOR ROCH,¹ KENGNE PIERRE,³ GUIGUEMDE TINGA ROBERT,¹
SIMARD FREDERIC,⁴ GUILLET PIERRE,⁵ HEMINGWAY JANET,⁶ AND HOUGARD JEAN MARC³

Laboratoire de Parasitologie et d'Entomologie du Centre Muraz BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

J. Med. Entomol. 39(6): 000-000 (2002)

ABSTRACT A sodium channel 'kdr'-type mutation was identified in the M form of *Anopheles gambiae* from Burkina Faso in the tropical savannah area belt. The molecular M form of *An. gambiae* is found at high frequencies in the flooded rice cultivation area of Kou Valley, where the insecticide selection pressure is limited. The spread of the mutation in the M population is an ongoing process, as it increased from a frequency of 0.006 in 1999 to 0.02 in 2000. The S molecular form occurs in sympatry in our study village, with the M form at a relatively low frequency. The common 'kdr' mutation was previously detected in this area in the S form, and has probably invaded the M population through genetic introgression. This impacts on the question of actual levels of gene flow between the two molecular forms in tropical savannah areas. A hybrid M/S individual was identified during the course of this study, which was homozygous for the 'kdr' mutation. Pyrethroid resistant *An. gambiae* were caught in October and November, which is the time of year that the molecular S form migrates into this area as rain-fed breeding sites in the cotton fields dry out.

KEY WORDS *Anopheles gambiae*, kdr mutation, molecular M form, tropical savannah area

PYRETHROID RESISTANCE IN *Anopheles gambiae* was first reported in West Africa (Elissa et al. 1993, Chandre et al. 1999a, Diabaté et al. 2002a). This resistance was probably initially selected by the intensive use of DDT and more recently pyrethroids for cotton crop protection (Chandre et al. 1999b). A survey in Burkina Faso demonstrated a spatial and temporal variation in pyrethroid resistance in *An. gambiae* in accordance with the intermittent use of these insecticides on cotton (Diabaté et al. 2002b). The resistance phenotype results from a single point mutation in the *para*-sodium channel gene (Martinez-Torres et al. 1998). Such pyrethroid resistance is often termed 'kdr', due to the knock-down resistant phenotype observed in houseflies with this type of mutation.

Several studies have been conducted to estimate the distribution and prevalence of this mutation in African *An. gambiae* populations (Chandre et al. 1999c, della

Torre et al. 2001, Diabaté et al. 2002a). The mutation was found in the molecular S form of *An. gambiae*, but was not in the sympatric M form (Chandre et al. 1999c, Diabaté et al. 2002a). This supported the hypothesis that the heterogeneity observed in *An. gambiae* populations was maintained by restricted or absent gene flow between the molecular forms of this vector (della Torre et al. 2001). The 'kdr' mutation was subsequently observed in the M form of *An. gambiae* from a tropical forest area of Benin and molecular analysis of the DNA sequence of the large intron immediately upstream of the mutation, suggested that it arose in the S form and moved through genetic introgression to the M form (Weill et al. 2000). The 'kdr' mutation is found in the M form only in areas of Benin and Côte d'Ivoire where insecticide selection pressure is exerted, which suggests that this population has been sampled in an unstable situation, where the spread of the 'kdr' allele in *An. gambiae* is ongoing (della Torre et al. 2001). Further monitoring of this process may provide important information on the gene flow and the ecological divergence of M and S forms.

Here we report detection of the 'kdr' mutation in an M population of *An. gambiae* from a tropical savannah area and elucidate the circumstances which facilitated its spread in this mosquito.

¹ Laboratoire de Parasitologie et d'Entomologie du Centre Muraz BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (e-mail: a_diabate@hotmail.com).

² Institut Pierre Richet Bouaké BP 1500 Bouaké 01, Côte d'Ivoire, France.

³ LIN (IRD/Montpellier), 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

⁴ OCEAC Yaoundé BP 288 Yaoundé, Cameroun.

⁵ World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

⁶ Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool, UK L3 5QA.

Table 1. Monthly change in the frequency of the *kdr* mutation and the relative frequency of the two molecular forms of *Anopheles gambiae* in 1999 and 2000

	1999						2000					
	S form ^a	KDR ^b	F(R) ^c	M form	KDR	F(R)	S form	KDR	F(R)	M form	KDR	F(R)
July	0 0%	-	-	40 100%	0	0	0 0%	-	-	33 100%	0	0
August	4 14%	3RR + 1RS	0.87	26 86%	0	0	2 7%	2RS	0.5	28 93%	1RS	0.02
September	3 10%	3RR	1	26 90%	0	0	1 4%	1RR	1	24 96%	2RS	0.04
October	6 19%	1RR + 2RS	0.83	25 81%	0	0	9 24%	9RR	1	28 76%	1RS	0.02
November	26 37%	25RR + 1RS	0.98	44 63%	1RS	0.01	14 19%	14RR	1	60 81%	0	0

^a Number of mosquitoes analysed, percentage of molecular forms of *An. gambiae*.

^b Number of mosquitoes analysed and the genotype of the *kdr* mutation.

^c Allele frequency of *kdr* mutation in mosquitoes analyzed.

Materials and Methods

Study Area. A survey was conducted in the Kou Valley of Burkina Faso, a rice cultivation area developed in 1970. It is characterized by wooded savannah and covers 1,200 ha between 4° 24' 59" longitude west and 11° 24' latitude and contains seven discrete villages. Between 1999 and 2000, larval collections and night catches were performed in VK7, a village located on the boundary of the rice and cotton areas. Mean annual rainfall is ≈ 1,200 mm and rice is the major crop. Few insecticides are used on this crop, but they are extensively used in the surrounding villages on cotton. Two seasons characterize the area, the rainy season extends from May to October and the dry season from November to April. The river Kou is a permanent source of irrigation and there are two rice crops per year (July–November and January–May). Because of the irrigation system, the rice fields form permanent mosquito breeding sites. Additional breeding sites are found in the depressions and ponds. The village has >600 inhabitants, mainly farmers. Sheep, goats, pigs, and a few cows are also present.

Mosquito Collections and Analysis. To achieve a representative sample, mosquitoes were regularly collected by human bait catches from July to December in 1999 and 2000. Genomic DNA was extracted from single field collected mosquitoes and polymerase chain reaction (PCR) amplified for species identification within the *An. gambiae* complex (Scott et al. 1993), to determine the molecular (M or S) form within *An. gambiae* (Favia et al. 2001) and to detect the standard Leu-Phe 'kdr' mutation (Martinez-Torres et al. 1998).

In 2000, larval field collections were transferred to the laboratory for adult emergence, to assess their adult pyrethroid resistance status. Permethrin (1% (25/75 *cis/trans*) impregnated filter papers prepared according to WHO specifications were provided by the Institut Pierre Richet de Bouaké, Côte d'Ivoire (IPR). WHO resistance test kits for adult mosquitoes were used (WHO 1970). All tests were undertaken on 2- to 5-d-old nonblood-fed female mosquitoes. The Kis susceptible reference strain of *An. gambiae* was pro-

vided by the Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN-Montpellier).

Results

A total of 399 mosquitoes was identified to species and molecular form and analyzed for the 'kdr' mutation. An average of 30 mosquitoes were analyzed per month over 2 yr. *An. arabiensis* was absent. Both the M and S molecular forms occurred, and the M form had the highest frequency (see Table 1). The S form was not detected in July, but appeared from August to November. In total it represented 20% of the mosquitoes in 1999 and 13% in 2000. The 'kdr' mutation occurred in both the M and S forms, but at very different frequencies. These ranged from 0.8 to 1 in the S form and from 0–0.04 in the M form (Table 1). The overall frequency of the 'kdr' mutation in the M form was 0.006 in 1999 and 0.02 in 2000. One M/S hybrid mosquito, which was homozygous for the 'kdr' mutation was identified in 2000.

The WHO discriminating dosage bioassay with permethrin produced 100% mortality in July to September and resistance was detected in October and November (Fig. 1). Although mosquitoes for the bioassay were collected as larvae, the resistance status coincides with the 'kdr' frequency analysis reported for human bait catches of mosquitoes. The permethrin resistance status observed from October to November is therefore co-incident with the high frequency of the molecular S form in these periods. The most likely hypothesis is that the 'kdr' mutation has invaded the M form through introgression from the highly resistant S form.

Discussion

The M and S molecular forms of *An. gambiae* occurred in sympatry in village VK7 with some variation in their relative frequencies. The M form was predominant and the S form increased in frequency in October to November. *An. gambiae* M occurs at high frequency in flooded/irrigated zones, characterized

T1

F1

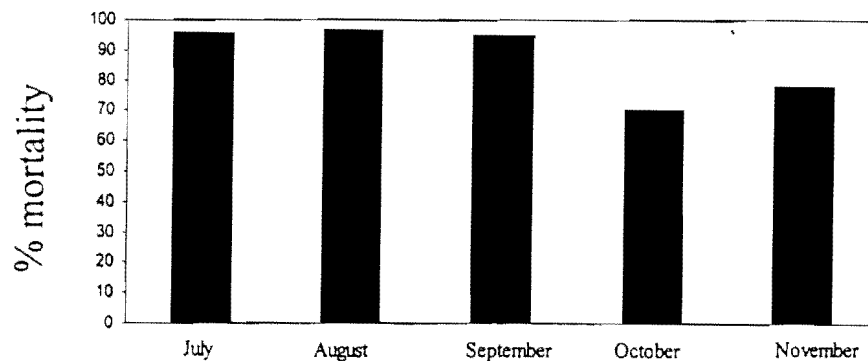


Fig. 1. Mortality levels in *Anopheles gambiae* sl. after a 1-h exposure to 1% permethrin papers in July through November 2000.

by intensive rice cultivation, while the S form is collected in rain-dependent breeding sites (Touré et al. 1995). As the S form in our study appeared in high frequencies at the end of rainy season, with very high frequencies of the 'kdr' allele, it probably migrated to our field site from the surrounding cotton area as the rain-dependent breeding sites dried-up (Diabaté et al. 2002b).

Permethrin resistant *An. gambiae* was detected previously in this location (Diabaté et al. 2002b) and the relative high frequency of the S form was the cause of the resistance in Kou Valley in October and November. The 'kdr' mutation has been found in the S form throughout west Africa in a large-scale study, but resistance was not detected in the sympatric M population (Chandre et al. 1999c). These results were later confirmed, with the exception of Benin, where the kdr mutation was found in the M form, which supported the hypothesis that there was reproductive isolation between the two forms in the dry savannah areas (Fanello et al. 2000, della Torre et al. 2001, Diabaté et al. 2002a). The presence of the 'kdr' mutation in the M form of Benin, in a forest belt, suggested genetic introgression between the S and M forms (Weill et al. 2000). This led to the hypothesis that near or in the forest belt, the Mopti and Savanna chromosomal forms fused with a single forest population, which could act as a bridge for gene flow (della Torre et al. 2001).

Although the hybrid M/S is produced readily in the laboratory, and is detectable with a PCR-based diagnostic, very few hybrids were reported from the field (Favia et al. 2001, della Torre et al. 2001, Gentile et al. 2001). Postmating reproductive isolation, in the form of hybrid male sterility, has been demonstrated among *An. gambiae* sibling species, but mating between chromosomal forms produces fertile F_1 progeny (Di Deco et al. 1950). Tripet et al. (2001) found evidence of hybridization among the two molecular forms in the field and other authors noted that these hybridization rates were at least an order of magnitude greater than those in well-established species such as *An. gambiae* ss versus *An. arabiensis* (Taylor et al. 2001) and *Drosophila pseudoobscura* versus *D. persimilis* (Powell 1953). Black and Lanzaro (2001) hypothesized that the lack of M/S hybrids in the field could be due to

partial reproductive isolation among molecular forms, with gene flow occurring only in certain geographical locations or at certain seasons. The study area in the Kou Valley is very distinctive, being on the boundary of rice and cotton fields, with a very high density of the M form of *An. gambiae* throughout the year, in contrast to the cotton area which has predominantly the S population expressing a high frequency of the 'kdr' mutation. At the end of the rainy season, when the two molecular forms mix in the rice fields, this may facilitate the exchange of the 'kdr' allele between the populations. In our study, we identified a hybrid M/S mosquito, which we expected to be heterozygous for the kdr mutation, as the frequency of this mutation is very high in the S form and very low in the M form. However, the hybrid was homozygous for the 'kdr' mutation. This could result from a mating of an S and an M form both containing the kdr mutation, but the probability of this is low. The result could be a PCR artifact, but this was unlikely as mosquitoes had been individually stored after field collection.

The failure to find fixed differences between the S and M forms in several DNA regions raises questions about the taxonomic status of these two nonpanmictic units (Lanzaro et al. 1998, Gentile et al. 2001, Mukabayire et al. 2001). An obvious explanation for the lack of genetic definition, even if complete reproductive isolation existed between the forms, is that the isolation arose too recently to allow even noncoding DNA to have significantly diverged (Gentile et al. 2001). But can new taxa be justified on the basis of rDNA differentiation, when many studies demonstrate gene conversion among rDNA cistrons (Black and Lanzaro, 2001), which could lead to overestimates of genetic differences among populations? The presence of the 'kdr' mutation in the M form in Burkina Faso, where the two forms were considered as distinct units with strong reproductive barriers weakens the case for taxonomic status of these molecular forms. The kdr mutation in the M population of Benin already suggests genetic introgression from the S form (Weill et al. 2000), and our data now suggests gene flow between the two molecular forms in dry savannah areas where they are sympatric.

The sodium channel gene has been mapped to the 2-l^{iter} arm of the nurse cell polytene chromosomes

(Ranson et al. 2000), a different location to that of the inversions used to define the chromosomal forms (2R) and the rDNA sites (X chromosome, Collins et al. 1987) that characterize the molecular M and S forms, therefore this marker may be a good indicator for studies on the genetic structure of *An. gambiae* populations. Any survey of this marker needs to be accompanied by information on the bio-ecology and the insecticide selection pressure throughout the year alongside the relative frequencies of the different forms.

Acknowledgments

This study was supported by the Multilateral Initiative on Malaria, the Ambassade du Danemark au Burkina Faso and grant from l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) to A.D. for his training in Montpellier.

References Cited

- Black, W. C., IV, and G. C. Lanzaro. 2001. Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss: introgressive hybridization, adaptative inversions or recent reproductive isolation? *Insect Mol. Biol.* 10:3-7.
- Chandre, F., F. Darriet, L. Manga, M. Akogbeto, O. Faye, J. Mouchet, and P. Guillet. 1999a. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bull. WHO* 77: 230-234.
- Chandre, F., F. Darriet, S. Manguin, C. Brengues, P. Carnevale, and P. Guillet. 1999b. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 53-9.
- Chandre, F., S. Manguin, C. Brengues, J. Dossou Yovo, F. Darriet, A. Diabaté, P. Carnevale, and P. Guillet. 1999c. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the mopti form. *Parassitologia* 41: 319-322.
- Collins, F. H., A. M. Mendez, M. O. Rasmussen, P. C. Me-haffey, N. J. Besansky, and V. A. Finnerty. 1987. Ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 37-41.
- della Torre, A., Fanello, C., Akogbeto, M., Dossou-Yovo, J., Favia, G., Petrarca, V., and M. Coluzzi. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Mol. Biol.* 10:9-18.
- Diabaté, A., J. B. Ouédraogo, T. Baldet, P. Guillet, and T. R. Guiguemdé. 2002. Pyrethroids resistance status of *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso (West Africa). *Med. Vet. Entomol.* (in press).
- Diabaté, A., T. Baldet, F. Chandre, M. Akogbeto, T. R. Guiguemdé, F. Darriet, C. Brengues, P. Guillet, J. Hem-ingsway, G. Small, and J. M. Hougard. 2002. The role of agricultural insecticides in *Anopheles gambiae* sl resistance to pyrethroids in Burkina Faso, West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press).
- Di Deco, M. A., V. Petrarca, F. Villani, and M. Coluzzi. 1980. Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di *Anopheles al-levati* in laboratorio. *Parassitologia* 22: 304-306.
- Elissa, N., J. Mouchet, F. Riviere, J. Y. Meunier, and K. Yao. 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* ss. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 73: 291-294.
- Fanello, C., M. Akogbeto, and A. Della Torre. 2000. Distribution of the pyrethroid knockdown resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 132.
- Favia, G., A. Lanfrancotti, L. Spanos, I. Sidén-Kiamos, and C. Louis. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Mol. Biol.* 10: 19-23.
- Gentile, G., M. Slotman, V. Ketmaier, J. R. Powell, and A. Caccone. 2001. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 10: 25-32.
- Lanzaro, G. C., Y. T. Touré, J. Carnahan, L. Zheng, G. Dolo, S. Traoré, V. Petrarca, K. D. Vernick, and C. E. Taylor. 1998. Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in West Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14260-14265.
- Martinez-Torres, D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Bergé, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur, and D. Pauron. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 7: 179-184.
- Mukabayire, O., J. Caridi, X. Wang, Y. T. Touré, M. Coluzzi, and N. J. Besansky. 2001. Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single-copy loci. *Insect Mol. Biol.* 2: 247-257.
- Powell, J. R. 1983. Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 492-495.
- Ranson, H., B. Jensen, X. Wang, L. Prapanthadara, J. Hem-ingsway, and F. H. Collins. 2000. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 9: 499-507.
- Scott, J. A., W. G. Brogdon, and F. H. Collins. 1993. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 520-529.
- Taylor, C. E., Y. T. Touré, J. Carnahan, D. E. Norris, G. Dolo, S. F. Traoré, F. E. Edillo, and G. C. Lanzaro. 2001. Gene flow among population of the malaria vector *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* 157: 743-750.
- Touré, Y. T., V. Petrarca, S. F. Traoré, A. Coulibaly, H. M. Maïga, O. Sankaré, M. Sow, M. A. Di Deco, and M. Coluzzi. 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477-511.
- Tripet, F., Y. T. Touré, C. E. Taylor, D. E. Norris, G. Dolo, and G. C. Lanzaro. 2001. DNA analysis transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol. Ecol.* 10: 1725-1732.
- Weill, M., F. Chandre, C. Brengues, S. Manguin, M. Akogbeto, N. Pasteur, P. Guillet, and M. Raymond. 2000. The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol. Biol.* 9: 451-455.
- WHO. 1970. Résistance aux insecticides et lutte antivecto-rielle. Dix-septième rapport du comité OMS d'experts des Insecticides. 1970. OMS, série de rapports techniques 443. Organisation Mondiale de la Santé, Geneva, Switzerland.

Received for publication; accepted.

ARTICLE 7

Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Dabiré KR, Simard F, Ouédraogo JB, Guillet P, & Hougard JM (2002). The kdr mutation detected in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. Short note dans *American Mosquitoes Control Association*: soumis

THE KDR MUTATION DETECTED IN *ANOPHELES ARABIENSIS* FROM
BURKINA FASO, WEST AFRICA.

A. DIABATE^{1&2}, T. BALDET¹, F. CHANDRE³, KR. DABIRE¹, F. SIMARD⁴,
JB. OUEDRAOGO¹, P. GUILLET⁵, . & JM. HOUGARD⁶

1 : Laboratoire d'Entomologie et de Parasitologie Centre Muraz 01 BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

2 : Institut de Recherche en Sciences de la Santé, BP 545 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

3: Institut Pierre Richet Bouaké BP 1500 Bouaké 01, Côte d'Ivoire

4 : OCEAC Yaoundé BP 288 Yaoundé, Cameroun

5 : World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland

6 : LIN/IRD, 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Key words : Kdr, *Anopheles arabiensis*, pyrethroid resistance, Burkina Faso

Identified since 1954 in *Musca domestica*, the knock-down resistance to DDT is characterised by a marked reduction in the intrinsic sensitivity of the insect nervous system to this compound (Milani, 1954). It confers resistance to DDT and pyrethroids which share a similar mode of action. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* has been first reported from Côte d'Ivoire by Elissa *et al.*, (1993) and *kdr* involvement subsequently found by Martinez-Torres *et al.*, (1998). It has probably been selected by the intensive use of DDT and, later pyrethroids for cotton crop protection. Recently, a survey in Burkina Faso demonstrated that *An. gambiae* pyrethroid resistance patterns were in accordance with the agricultural use of these insecticides (Diabaté *et al.*, accepted^a). Following the availability of a molecular diagnostic test for detection of *kdr*, several studies were conducted on prevalence and distribution of this mutation in *An. gambiae* s.l. populations from Africa (Chandre *et al.*, 1999; Diabaté *et al.*, accepted^b). The *kdr* mutation was first detected in the recently described S molecular form of *An. gambiae* (Chandre *et al.*, 1999., Favia *et al.*, 2001) only, while it was not observed neither in the sympatric M molecular form, nor in *An. arabiensis*. These results, observed in the savannah area of West Africa, provided strong evidence for restricted gene flow within the *An. gambiae* species and forms (Coluzzi *et al.*, 1985; della Torre *et al.*, 2001). Then, in a subsequent study, carried out in South forest area of Benin, the *kdr* mutation was identified in the M molecular form, and sequencing of a large upstream intron suggested that this highly adaptive mutation arose in the M form through genetic introgression from the S form (Weill *et al.*, 2000). This was so far the situation of the *kdr* mutation in *An. gambiae* complex from West Africa.

For the first time, we have detected the *kdr* mutation in the species *An. arabiensis*. The mutation was observed at heterozygous status in one *An. arabiensis* specimen collected in Eastern Burkina Faso, a dry savannah area where agricultural

insecticides are massively used for cotton protection. Both resistant *An. gambiae* (0.4, *kdr* frequency) and susceptible *An. arabiensis* were found in sympatry, but *An. arabiensis* was largely predominant (60%, 54, number of mosquitoes tested). Mosquito samples were collected at larval stage, brought back to the laboratory for rearing to adult stage. Genomic DNA was extracted from single mosquito and PCR amplified for species identification within the *An. gambiae* complex (Scott *et al.*, 1993) and *kdr* detection (Martinez-Torres *et al.*, 1998).

This first report of *kdr* occurring in *An. arabiensis*, a second major vector in Africa, is of great significance at both fundamental and applied levels. Its potential impact on the efficacy of malaria vector control interventions will have to be evaluated and results taken into consideration by malaria control programmes. Further characterisations of this new allele is needed to further investigate history of the onset and spread of this gene within species and forms of the *An. gambiae* complex.

REFERENCES

- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P & Guillet P (1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west africa and further evidence for reproductive isolation of the mopti form. *Parassitologia* **41**: 319-322.
- Coluzzi M, Petrarca V & Di Deco MA (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* **52** : 45-63.
- Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-Yovo J, Favia G, Petrarca V & Coluzzi M (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Molecular Biology* **10**(1), 9-18.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemdé TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Graham SG and Hougaard JM,. The role of agricultural use of insecticide in *Anopheles gambiae* sl resistance to pyrethroids in Burkina Faso, West Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (accepted^a).
- Diabaté A, Ouédraogo JB, Baldet T, Guillet P, Guiguemdé TR. Pyrethroids resistance status of *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso (West Africa). *Medical and Veterinary Entomology* (accepted^b).
- Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY & Yao K, (1993). Resistance of *Anopheles gambiae* ss. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, **73** : 291-294.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I & Louis C, (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Molecular Biology* **10**(1), 19-23.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé J B, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N & Pauron D, (1998). Molecular characterization of pyrethroid

knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular biology*, 7(2) : 179-184.

Milani R (1954). Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT : correlazione tran abbattimento e mortalia in *Musca domestica* L. *Riv Parasitol* 15 : 513-542.

Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993). Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49 : 520-529.

Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pasteur N, Guillet P & Raymond M, (2000). The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology* 9(5) : 451-455.