

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE  
DE BOBO-DIOULASSO**

*N° d'ordre*

**INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL**



**THESE**

**Pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE  
DE BOBO-DIOULASSO**  
(Doctorat Unique)

En

*Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques*

Par

**Moussa NAMOUNTOUGOU**

**Titre : Evolution de la résistance des populations d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides dans les faciès cotonniers du Burkina Faso**

Présentée et soutenue publiquement le 04 février 2013 devant  
le jury composé de :

**Président**: Pr Laya SAWADOGO, Professeur titulaire, Université de Ouagadougou

**Membres** :

Pr Georges Anicet OUEDRAOGO, Professeur titulaire, UPB

Dr Philippe SOLANO, Directeur de Recherche, IRD-CIRDES, Bobo-Dioulasso

Dr Anna COHUET, Maître de Recherche, IRD-IRSS, Bobo-Dioulasso

Dr Kounbobr Roch DABIRE, Maître de Recherche, IRSS (Directeur de thèse)

# Dédicaces

A la mémoire de mes très chers regrettés :

A mon père, Dioaro Boubacar NAMOUNTOUGOU

A ma mère, Timbendi Assétou DIANOU

A toute la famille

---

## Remerciements

Merci Seigneur DIEU pour m'avoir accordé cette grâce.

Le présent travail est la synthèse de plusieurs années d'étude réalisées à l'IRSS/Centre Muraz. Ces travaux ont bénéficié d'un appui financier de CORUS N°6015. Nous remercions l'IRD, du partenariat Nord-Sud tant en terme de formation à la recherche que d'appui financier à travers l'octroi d'une bourse du Département de Soutien à la Formation (DSF). Nous souhaitons remercier :

Monsieur le Directeur Régional de l'IRSS et Directeur Général du Centre Muraz, le *Professeur Jean Bosco OUEDRAOGO*, pour les facilités qu'il a bien voulu m'accorder au cours de la réalisation de ce travail. Vos critiques et suggestions ainsi que votre rigueur scientifique m'ont été grandement profitables au cours de mes travaux de recherches.

*Dr Roch K. DABIRE*, je vous remercie pour tous les efforts personnels et les moyens mis à ma disposition pour la réalisation de cette thèse. Depuis mon DEA, votre confiance à mon égard a été un véritable générateur de motivation et dont les résultats sont là aujourd'hui. Travailler dans votre équipe signifie rester en famille, je retiens de vous un encadreur dont les qualités professionnelles et morales suscitent le respect et l'admiration. C'est avec un grand enthousiasme que je vous témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir encadré avec fermeté comme un maître et guidé avec amour comme un père.

*Dr Frédéric SIMARD*, éminent spécialiste en génétique des populations, je suis honoré de faire partie de tous ces étudiants et chercheurs qui ont bénéficié des vos larges connaissances scientifiques. Votre rigueur et vos qualités exceptionnelles de scientifique ont fait de vous un chercheur remarquable.

*Pr Georges Anicet OUEDRAOGO*, Président de l'Université polytechnique de Bobo-Dioulasso, pour les différentes formations dont j'ai bénéficié. Vous avez su faire bénéficier de votre expérience scientifique ; mais au-delà de ces compétences, vos qualités humaines m'ont été d'un grand soutien. Il n'est pas aisé de vous remercier en quelques lignes.

*Pr Robert T. GUIGUEMDE*, Chef de l'Unité de Recherche « Paludisme et Maladies Tropicales Négligées » pour les différentes formations dont j'ai bénéficié. Veuillez accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

*Dr Abdoulaye DIABATE*, qui à travers de nombreux conseils et suggestions, a beaucoup contribué à ma formation. Merci car vos conseils m'ont permis de finaliser ces travaux.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour leur présence à ce jury, au Pr Laya SAWADOGO, Professeur titulaire, au Pr Georges Anicet OUEDRAOGO, Professeur titulaire, au Dr Philippe SOLANO, Directeur de Recherche, au Dr Anna COHUET, Maître de Recherche et Dr Kounbo Roch DABIRE, Maître de Recherche.

---

Je remercie tant, *Dr Léa PARE/TOE*, pour vos conseils et l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

*Dr Thierry BALDET* qui n'a ménagé aucun effort pour mener à bien ce travail, qu'il a suivi de très près du début à la fin. Merci de m'avoir fait partager vos connaissances dans le domaine de la résistance.

*Dr Halidou TINTO*, pour son soutien et ses conseils à mon égard. Trouvez dans ce document ma parfaite reconnaissance.

Je reconnais que ce travail n'aurait jamais été réalisé sans le concours et le dévouement de mes enseignants à qui j'exprime ici ma profonde gratitude ; je pense notamment au *Professeur Jean KOULDIATI* de l'Université de Ouagadougou (Burkina Faso), *Dr Didier FONTENILLE* de l'IRD de Montpellier (France) et *Dr Josiane ETANG* de l'OCEAC de Yaoundé (Cameroun).

*Dr Pierre KENGNE* qui m'a initié aux techniques de biologie moléculaire. Je suis très honoré d'avoir pu bénéficier ses compétences au cours de cette thèse. Je garde en mémoire ses grandes qualités tant humaines qu'intellectuelles et sa gentillesse.

Je remercie également *Drs Hermann SORGHO, Serge YERBANGA, Ollo DA, Cyril NDO, Léa BONKIAN, Anges YADOULETON, Guékoun LOUGUE* pour le soutien que vous m'avez accordé pendant tout le temps que j'ai consacré à ces travaux ; puisse cette atmosphère perdurer pour favoriser la formation d'autres cadres.

*Mr Ibrahim BALLO*, pour ta collaboration et aide précieuse dans le domaine de l'informatique.

Une attention particulière à toute l'équipe de l'IRSS/Centre Muraz : *Ali OUARI, Tanti Natogma TRAORE, Odile ZAMPA, Madina TRAORE, Baudoin DABIRE, Roger SANOU, Antoine NIKIEMA* (avec qui j'ai souvent chassé des caïmans pour des collectes de larves), *SOMDA Hervé, Marcel ROAMBA, DIASSO Ardiouma, Hamidou TRAORE, Hyacinthe GUEL, Séni ILBOUDO, Aboubacar NIKIEMA, Niama MILLOGO, Abdoulrasmané KABRE, Ibrahim DIABATE, Abdoulaye OUATTARA, Sougrinoma ZOUNGRANA, Fulgence DA, Ali OUEDRAOGO, Tahirou KABERO* pour votre amitié, votre aide et votre collaboration à ces travaux.

*Pegdéwendé S. SAWADOGO, Adama SANOU, Hyacinthe K. TOE, Hamidou MAIGA, Bienvenue YAMEOGO, François D Salle HIEN, Ibrahim SANGARE, Franc A. YAO, Mamai WADAKA, Lassina B. YARO* « dit commandant », *Hamidou IBOUDO, Jacques KABORE, Robert K. OUEDRAOGO, Abdoulaye NIANG, Fabrice SOME, Moussa SYLLA, Dieudonné D. SOMA* pour votre présence et soutien sans faille ; amis de tous les temps.

---

A toute ma famille plus particulièrement à mes frères et soeurs *Khadidiatou, Mohammed, Amsatou, Maïmouna* et *Alima* pour leur soutien et leurs encouragements constants durant toutes mes études ; je pense aussi à *Diagnaogou DIAGBOUGA, Yabri T. DIANOUE, Frédéric DIANOUE*; merci d'avoir été là quand il le fallait.

*Mr Vincent DABILGOU* pour vos soutiens et motivation apportés dans mon cursus universitaire et dans la réalisation de ces travaux. Je vous en suis infiniment reconnaissant. Trouvez dans ce document ma parfaite reconnaissance.

A mon épouse *Fatoumata NAMOUNTOUGOU/TRAORE* et mon fils *Djalil Khaled NAMOUNTOUGOU* pour leur soutien et pour avoir supporté avec patience mes multiples absences.

Pour finir merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

---

## Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>GENERALITES</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Les vecteurs du paludisme en Afrique</b> .....	<b>7</b>
1.1. Le complexe <i>Anopheles gambiae</i> .....	7
1.2. Le groupe <i>Anopheles funestus</i> .....	9
1.3. Autres vecteurs .....	10
<b>2. Bio-écologie des anophèles</b> .....	<b>10</b>
2.1. Cycle de développement des anophèles.....	10
2.2. Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> .....	11
2.3.1. Chez l'homme .....	12
2.3.2. Chez l'anophèle.....	12
<b>3. La lutte antivectorielle (LAV)</b> .....	<b>13</b>
3.1. La lutte anti-larvaire .....	14
3.2. Stratégies de lutte contre les stades adultes et les méthodes de protection .....	14
3.2.1. Les pulvérisations intradomiciliaires.....	14
3.2.2. Les moustiquaires imprégnées d'insecticides.....	15
3.2.3. Autres méthodes de protection contre les moustiques adultes.....	17
3.2.4. Les perspectives de lutte génétique .....	18
3.3. Insecticides utilisés en LAV .....	18
3.3.1. Les organochlorés.....	18
3.3.2. Les organophosphorés .....	19
3.3.3. Les carbamates .....	19
3.3.4. Les pyréthrinoides .....	19
3.3.5. Les autres insecticides .....	20
3.3.5.1. Bio-larvicides.....	20
3.3.5.2. Régulateurs de croissance .....	20
3.3.5.3. Nouvelles molécules insecticides.....	20
<b>4. Mécanismes de résistance aux insecticides</b> .....	<b>20</b>
4.1. Résistance métabolique.....	21
4.2. Résistance liée à la modification de la cible .....	22
4.2.1. Les mutations <i>kdr 1014F</i> & <i>1014S</i> .....	22
4.2.2. La mutation <i>ace-1G116S</i> .....	23
4.3. Autres mécanismes de résistance.....	23
<b>5. Situation de la résistance des vecteurs aux insecticides</b> .....	<b>23</b>
5.1. En Afrique .....	23
5.2. Au Burkina Faso .....	24
<b>6. Présentation de l'étude</b> .....	<b>25</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>27</b>
<b>1. Le Burkina Faso</b> .....	<b>28</b>
1.1. Données environnementales et climatiques .....	28
1.2. Hydrographie .....	28
<b>2. Aires cotonnières et différents types de cotons produits au Burkina Faso</b> .....	<b>29</b>
<b>3. Sites d'étude</b> .....	<b>32</b>

---

<b>4. Echantillonnage des moustiques .....</b>	<b>35</b>
<b>5. Tests de sensibilité aux insecticides.....</b>	<b>35</b>
<b>6. Identification des espèces d'<i>An. gambiae s.l.</i> et identification des formes moléculaires d'<i>An. gambiae s.s.</i> .....</b>	<b>37</b>
6.1. Détection des mutations <i>kdr</i> L1014F et <i>ace-1<sup>R</sup></i> .....	37
6.2. Détection de la mutation <i>kdr</i> L1014S-La technique Hot Oligonucleotide Ligation Assay (HOLA).....	37
6.3. Caractérisation de la résistance métabolique .....	39
<b>7. Analyses statistiques des données .....</b>	<b>40</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>41</b>
<b>Chapitre 1: Situation de la résistance d'<i>An. gambiae s.l.</i> aux insecticides en zones cotonnières dans les régions soudanienne et soudano-sahélienne à l'Ouest et au Centre-Est du Burkina Faso.....</b>	<b>42</b>
<b>1.1. Introduction .....</b>	<b>42</b>
<b>1.2. Matériels et Méthodes .....</b>	<b>42</b>
<b>1.3. Résultats .....</b>	<b>43</b>
1.3.1. Composition spécifique des vecteurs ( <i>An. gambiae s.l.</i> ) et leur répartition géographique .....	43
1.3.2. Résistance aux DDT et pyréthrinoïdes.....	46
1.3.2.1. Au DDT 4%.....	46
1.3.2.2. Aux pyréthrinoïdes .....	46
1.3.3. La sensibilité d' <i>An. gambiae s.l.</i> aux OP/CX .....	51
1.3.3.1. Au bendiocarb 0.1% .....	51
1.3.3.2. Au chlorpyrifos méthyl (CM) .....	52
1.3.4. La distribution géographiques des fréquences alléliques de la mutation <i>kdr</i> L1014F.....	54
<b>1.4. Discussion.....</b>	<b>61</b>
Conclusion partielle 1 .....	65
<b>Chapitre 2 : Mise en évidence de la mutation <i>kdr</i> L1014S au sein de populations naturelles d'<i>An. gambiae s.l.</i> du Burkina Faso .....</b>	<b>65</b>
<b>2.1. Introduction .....</b>	<b>65</b>
<b>2.2. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>66</b>
<b>2.3. Résultats .....</b>	<b>68</b>
2.3.1. Composition spécifique d' <i>An. gambiae s.l.</i> .....	68
2.3.2. Fréquences et distribution de la mutation <i>kdr</i> L1014F chez <i>An. gambiae s.l.</i> .....	68
2.3.3. Détection et distribution de la mutation <i>kdr</i> L1014S chez <i>An. gambiae s.l.</i> .....	69
<b>2.4. Discussion.....</b>	<b>72</b>
Conclusion partielle 2.....	74
<b>Chapitre 3 : Etude de la résistance d'<i>An. gambiae s.l.</i> aux insecticides en milieu urbain: cas de Bobo-Dioulasso.....</b>	<b>74</b>
<b>3.1. Introduction .....</b>	<b>74</b>
<b>3.2. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>76</b>
3.2.1. Sites d'étude.....	76

---

3.2.2. Collecte de moustiques .....	77
3.2.3. Analyses statistiques .....	78
<b>3.3. Résultats .....</b>	<b>78</b>
3.3.1. Distribution des espèces et formes moléculaires du complexe <i>An. gambiae s.l.</i> à Kodéni et Dioulassoba .....	78
3.3.2. Dynamique d'évolution des espèces et formes moléculaires du complexe <i>An. gambiae s.l.</i> à Kodéni et Dioulassoba .....	79
3.3.3. Sensibilité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> de Kodéni et Dioulassoba aux insecticides.....	80
3.3.4. Fréquence de mutation <i>kdr</i> L1014F chez les populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> .....	81
3.3.5. Fréquence de la mutation L1014S dans les populations d' <i>An. arabiensis</i> résistantes au DDT 4% à Dioulassoba .....	81
3.3.6. Fréquence de la mutation <i>ace-1<sup>R</sup></i> chez les populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> .....	83
<b>3.4. Discussion .....</b>	<b>84</b>
Conclusion partielle 3 .....	86
<b>Chapitre 4: Résistance métabolique et statut de multirésistance au sein des populations d'<i>An. gambiae s.l.</i> dans les faciès cotonniers du Burkina Faso .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1. Introduction .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2. Matériels et Méthodes .....</b>	<b>89</b>
4.2.1. Collecte des larves .....	89
4.2.2. Tests de sensibilité aux insecticides.....	89
4.2.3. Analyses biochimiques .....	89
4.2.4. Identification PCR des espèces d' <i>An. gambiae</i> et caractérisation des mutations <i>kdr</i> L1014F, L1014S et <i>ace-1<sup>R</sup></i> .....	90
<b>4.3. Résultats .....</b>	<b>90</b>
4.3.1. Diagnostic des espèces et formes moléculaires d' <i>An. gambiae s.l.</i> .....	90
4.3.2. Sensibilité aux insecticides - Les taux de mortalité au test OMS .....	94
4.3.3. Fréquences alléliques des mutations <i>kdr</i> L1014F et <i>ace-1</i> G119S.....	94
4.3.4. Estérases .....	95
4.3.5. Glutathion-S-Transférase (GST).....	96
4.3.6. Monooxygénases à cytochrome P-450 .....	97
<b>4.4. Discussion .....</b>	<b>99</b>
Conclusion partielle 4 .....	101
<b>CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>108</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>128</b>
<b>Sélection d'articles.....</b>	<b>129</b>

---



## Sélection d'articles

- 1 Namountougou M., Simard F., Baldet T., Diabaté A., Ouédraogo J-B., Martin T., K. Dabiré K.R., 2012. Multiple Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae s.l.* Populations from Burkina Faso, West Africa. *PLoS ONE* 7(11): e48412.
- 2 Namountougou M., Diabaté A., Etang J., Bass C., Sawadogo S.P., Gnankiné O., Baldet T., Martin T., Chandre F., Simard F., Dabiré K.R., 2012. First report of the L1014S *kdr* mutation in wild populations of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop* 125 : 123-127.
- 3 Dabiré K.R., Namountougou M., Sawadogo S.P., Lassina B.Y., Toé K.H., Ouari A., Gouagna L-C., Simard F., Chandre F., Baldet T., Bass C., Diabaté., 2012. Population dynamics of *Anopheles gambiae s.l.* in Bobo-Dioulasso city: bionomics, infection rate and susceptibility to insecticides. *Parasites & Vectors* 5:127.
- 4 Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Wondji C., Chandre F., Simard F., Ouédraogo J-B., Martin T., Weill M., Baldet T., 2012. Trends in Insecticide Resistance in Natural Populations of Malaria Vectors in Burkina Faso, West Africa: 10 Years' Surveys. In: Perveen F, editors. *Insecticides - Pest Engineering*. ISBN. InTech: pp. 479-502.
- 5 Jones C.M., Toé K.H., Sanou A., Namountougou M., Hughes A., Diabaté A., Dabiré K.R., Simard F., Ranson H., 2012. Additional Selection for Insecticide Resistance in Urban Malaria Vectors: DDT Resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS ONE* 7(9): e45995.
- 6 Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Toe K.H., Ouari A., Kengne P., Bass C., Baldet T., 2009a. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae s.l.* from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 1113-1120.
- 7 Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Kengne P., Simard F., Bass C., Baldet T., 2009b. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (*ace-1R*) in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso (West Africa). *Trop Med Int Health* 14, 396-403.

## Lexique des abréviations

- Ace-1: Acétylcholinestérase Insensible
- AChE: Acétylcholinestérase
- ADN: Acide Désoxyribonucléique
- ADNr: ADN ribosomal
- An.: *Anopheles*
- Bendio: Bendiocarb
- Bio: Zone de coton biologique
- Bt: *Bacillus thuringiensis*
- Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>: Calcium/magnesium
- CDNB: 1-chloro-2, 4-Dinitrobenzene
- CM: Chlorpyriphos méthyl
- CNaVdp: Canaux sodium voltage dépendant
- Conv: Zone de coton conventionnel
- CREC: Centre de Recherche Entomologique de Cotonou
- CX: Carbamate
- DDT: Dichloro-Diphényl-Trichloréthane
- DEET: N-diéthyl-3-methylbenzamide
- Delta: Deltaméthrine
- dNTP: Désoxy Ribonucléotides TriPhosphates
- DO: Densité Optique
- EDTA: Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
- GABA: Gamma-Amino-Butyric Acid
- GST: Glutation S-transférase
- HCH: Hexachlorocyclohexane
- HOLA: Hot Oligonucléotide Ligation Assay
- ITPS: Insecticide Treated Plastic Sheets
- IRSS: Institut de Recherche en Sciences de la Santé
- Kd: knockdown
- Kdr: knockdown resistance
- Kdr-Est: Mutation Kdr la plus fréquente en Afrique de l'Est
- Kdr-Ouest: Mutation Kdr la plus fréquente en Afrique de l'Ouest
- LAV: Lutte Antivectorielle

- Leu-Phe: Leucine-phénylalanine (ou Leucine-Fenylalanine en anglais donnant le *kdr* L1014F)
- Leu-Ser: Leucine-sérine (ou Leucine-Serine en anglais donnant le *kdr* L1014S)
- LLIN: Long Lasting Impregnated Net
- LSTM: Vector Group de la Liverpool School of Tropical Medecine
- METI: Mitochondrial Electron Transport Inhibitors
- MII: Moustiquaire Imprégnée d’Insecticide
- MILDA: Moustiquaire Imprégnée d’insecticides de Longue Durée d’Action
- Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>: Sodium/potassium
- Asp-Tyr: Asparagine-Tyrosine (donnant la mutation N1575Y)
- OC: Organochloré
- OMS: Organisation Mondiale de la Santé
- OP: Organophosphorés
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- Perm: Permethrine
- PID: Pulvérisations Intra – Domiciliaires
- PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme
- PY: Pyréthrinoides
- qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction
- RFLP: Restriction Fragment Length polymorphism
- RR: Génotype homozygote résistante
- RS: Génotype hétérozygote
- s.l: sensu lato (sens large)
- s.s.: sensu stricto (sens stricte)
- SS: Génotype homozygote sensible
- SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
- VK: Vallée du Kou
- WHO: World Health Organization
- WHOPES: World Health Organization Pesticides Evaluation Scheme

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Cycle biologique des anophèles (Mouchet <i>et al.</i> , 2004).....	11
<b>Figure 2:</b> Cycle de développement du Plasmodium (Mouchet <i>et al.</i> , 2004).....	13
<b>Figure 3:</b> Sites d'étude de la résistance d' <i>An. gambiae s.l.</i> aux insecticides.....	34
<b>Figure 4:</b> Différentes étapes du test de sensibilité (WHO, 1998).....	36
<b>Figure 5:</b> Technique HOLA.. ..	38
<b>Figure 6:</b> Génotypes de la mutation <i>kdr</i> obtenus par la technique HOLA. ....	38
<b>Figure 7:</b> Taux de mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> au DDT 4%.....	46
<b>Figure 8:</b> Taux de mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> à la perméthrine 0.75%.....	47
<b>Figure 9:</b> Taux de mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> à la deltaméthine 0.05% .....	48
<b>Figure 10:</b> Taux de mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> aux insecticides en fonction des faciès cotonniers du Burkina Faso .....	50
<b>Figure 11:</b> Dynamique de la résistance aux insecticides chez des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> en fonction des faciès cotonniers du Burkina Faso .....	51
<b>Figure 12:</b> Taux de mortalité d' <i>An. gambiae s.l.</i> observés avec le bendiocarb 0.1% .....	52
<b>Figure 13:</b> Taux de mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> au CM 0.4%. ....	53
<b>Figure 14:</b> Taux de mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> aux insecticides en fonction des faciès agro-climatiques du Burkina Faso .....	53
<b>Figure 15:</b> Dynamique de la résistance aux insecticides .....	54
<b>Figure 16:</b> Distribution de la mutation <i>kdr</i> L1014F chez les deux formes M et S d' <i>An. gambiae s.l.</i> en fonction des zones climatiques .....	56
<b>Figure 17:</b> Fréquence de la mutation <i>kdr</i> L1014F .....	57
<b>Figure 18:</b> Dynamique de la fréquence de la mutation <i>kdr</i> L1014F chez les deux formes M et S en fonction des faciès cotonnier du Burkina Faso .....	57
<b>Figure 19:</b> Distribution de la mutation <i>kdr</i> au sein du complexe <i>An. gambiae</i> .....	59
<b>Figure 20:</b> Distribution de la mutation <i>kdr</i> au sein du complexe <i>An. gambiae</i> .....	60
<b>Figure 21:</b> Comparaison de fréquence allélique de la mutation <i>kdr</i> L1014F au sein des populations naturelles d' <i>An. gambiae s.l.</i> .....	69
<b>Figure 22:</b> Situation géographique des deux sites d'étude à Bobo-Dioulasso .....	77
<b>Figure 23:</b> Variation mensuelle des espèces et formes moléculaires M et S d' <i>An. gambiae s.s.</i> à Kodéni (A) et Dioulassoba (B).....	79
<b>Figure 24:</b> Mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> .....	81
<b>Figure 25:</b> Sensibilité aux insecticides et distribution des espèces et formes moléculaires d' <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans 10 sites du Burkina Faso.....	92

<b>Figure 26:</b> Détection des estérases chez <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans 10 sites du Burkina Faso .....	96
<b>Figure 27:</b> Détection des monooxygénases chez <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans 10 sites du Burkina Faso .....	97
<b>Figure 28:</b> Détection des cytochromes P450 chez <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans 10 sites du Burkina Faso .....	98

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Calendrier des traitements et insecticides utilisés par SOFITEX, SOCOMA et FASOCOTON.....	31
<b>Tableau II:</b> sites d'étude de la résistance avec leurs géoréférences et les pratiques agricoles	32
<b>Tableau III:</b> Superficie occupée par les pratiques culturales du cotonnier au Burkina Faso .	33
<b>Tableau IV:</b> Récapitulatif du nombre et des dates des tests réalisés dans les différents sites	36
<b>Tableau V:</b> Distribution géographique des espèces d' <i>An. gambiae s.l.</i> et formes moléculaires d' <i>An. gambiae s.s.</i> .....	45
<b>Tableau VI :</b> Distribution de la fréquence du gène <i>kdr</i> dans le bassin cotonnier du Burkina Faso .....	58
<b>Tableau VII:</b> Répartition géographique des formes moléculaires M et S d' <i>Anopheles gambiae s.s.</i> et d' <i>An. arabiensis</i> des 10 sites d'étude au Burkina Faso.....	70
<b>Tableau VIII:</b> Distribution de la fréquence des mutations <i>kdr</i> L1014F et L1014S chez <i>An. gambiae s.l.</i> .....	71
<b>Tableau IX:</b> Composition de la faune anophélienne à Kodéni et Dioulassoba.....	78
<b>Tableau X:</b> Identification PCR des espèces d' <i>An. gambiae s.l.</i> et formes moléculaires M et S d' <i>An. gambiae s.s.</i> .....	82
<b>Tableau XI:</b> Fréquences alléliques et génotype du <i>kdr</i> L1014F au sein d' <i>An. gambiae s.l.</i> ...	83
<b>Tableau XII:</b> Fréquences et génotype de la mutation <i>kdr</i> 1014S dans les populations d' <i>An. arabiensis</i> .....	83
<b>Tableau XIII:</b> Fréquences alléliques et génotype de la mutation <i>ace-1<sup>R</sup></i> au sein des populations d' <i>An. gambiae</i> testées au bendiocarb 0.1% à Kodéni et à Dioulassoba .....	84
<b>Tableau XIV:</b> Distribution de la fréquence de la mutation <i>kdr</i> L1014F dans les populations d' <i>An.gambiae s.l.</i> de dix sites du bassin cotonnier du Burkina Faso. ....	98
<b>Tableau XV:</b> Distribution de la fréquence de la mutation <i>ace-1</i> G119S dans les populations d' <i>An.gambiae s.l.</i> .....	99

## Résumé

Au Burkina Faso, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides est connue depuis les années 60 où des cas de résistance d'*Anopheles funestus* et plus tard d'*An. gambiae* à la dieldrine et au DDT ont été observés dans l'Ouest du pays. Dans les années 80 le DDT a été remplacé par les pyréthrinoides (PYs) dans la lutte contre les ravageurs en agriculture mais aussi dans l'imprégnation des moustiquaires en santé publique. La résistance croisée aux PYs/DDT a été observée vers la fin des années 90 à l'Ouest du Burkina Faso avec la mutation *kdr* L1014F comme principal mécanisme de résistance à ces insecticides au sein des populations d'*An. gambiae s.l.*. Cette mutation avait été trouvée très élevée dans la forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* avec une expansion géographique dans les populations de la forme M et d'*An. arabiensis* au-delà des zones cotonnières de l'Ouest où elle avait jadis été prédominante. Son émergence avait été largement attribuée à l'utilisation intensive des insecticides en agriculture comme principale source de sélection.

Après l'introduction de pratiques innovantes peu consommatrices d'insecticides tels le coton *Bt* et le coton biologique, l'objectif de notre travail était d'étudier l'impact de telles pratiques sur l'évolution de la résistance des populations d'*An. gambiae s.l.* dans ces faciès culturaux. La répartition des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* et d'*An. arabiensis* a été observée suivant un gradient Nord-Ouest où la forme moléculaire S est prédominante dans l'Ouest du pays vivant en relative égale proportion avec la forme M à la limite de la zone soudanienne. La forme M prédominait dans les autres sites de la zone soudano-sahélienne suivie d'*An. arabiensis* surtout dans les localités du Centre où elle a été trouvée en forte proportion. Toutefois notre étude révèle qu'*An. arabiensis* jadis trouvé en faible pourcentage dans la population vectorielle à l'Ouest du Burkina est entrain de remplacer *An. gambiae s.s.* comme vecteur majeur de paludisme dans la ville de Bobo-Dioulasso.

Nos résultats indiquent une généralisation de la résistance d'*An. gambiae s.s.* aux PYs dans les faciès cotonniers de l'Ouest et du Centre avec des fréquences alléliques de la mutation *kdr* L1014F souvent au-dessus de 80%. Rapportée par type de coton, une baisse aussi bien de la résistance et de la fréquence de la mutation *kdr* L1014F a été observée dans les faciès *Bt* au sein des populations de la forme S mais insuffisante pour inverser une tendance à la sensibilité. La mutation *kdr* L1014S a été aussi mise en évidence au sein des populations des deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* mais aussi chez *An. arabiensis* confirmant ainsi la circulation de la mutation L1014S au sein des populations d'*An. gambiae s.l.* en Afrique de l'Ouest.

Notre étude a aussi montré une situation de résistance multiple avec la présence concomitante des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* et des enzymes de détoxification (estérases, GSTs et cytochrome P450) dans ces populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* L'évolution globale de la résistance montre une résistance affichée aux PYs/DDT (avec des fréquences du gène *kdr* L1014F proches de la fixation) avec une baisse notable de sensibilité aux CX et un bon niveau de sensibilité aux OPs. Avec ce spectre de résistances nous nous acheminons inéluctablement vers un manque d'efficacité des outils actuels de lutte contre les vecteurs du paludisme à base d'insecticides (MILDA, PID) à très court terme.

Cette étude montre la nécessité de rechercher d'autres formulations d'insecticides ou de nouveaux insecticides mais aussi d'autres alternatives moins dépendantes des insecticides. Il est tout aussi urgent de promouvoir une meilleure gestion de l'environnement qui prendrait en compte les priorités de santé publique. Ceci passe par un rapprochement de tous les secteurs d'activité en agriculture et en santé pour une meilleure harmonisation de l'utilisation des pesticides.

Mots-clés: paludisme, vecteurs, *An. gambiae s.l.*, formes moléculaires M et S, résistance aux insecticides, *kdr*, *ace-1*, Burkina Faso.

## Abstract

In absence of effective vaccine, the most realistic strategy to control malaria is based on vector control relied on the use of synthetic insecticides. Unfortunately, due to the emergence of insecticide resistance in natural vector populations, many malaria vector control programmes are challenging field control failures. In West Africa *Anopheles gambiae s.s.* and *An. arabiensis* are the two main species of the complex of *An. gambiae* that transmit malaria. *An. gambiae s.s.* itself was split into two incipient units termed M and S molecular forms which display together with *An. arabiensis* large frequency differences for genes conferring resistance to insecticides. The cross resistance of *An. gambiae s.l.* to DDT and pyrethroids (PYs) is especially conferred by the L1014F *kdr* which was mainly associated to the intensive use of insecticides in agriculture in West Africa.

In Burkina Faso since 2008 two innovative cotton growth systems based on transgenic (*Bt*) and biological cotton were introduced using no or less insecticide for pest control prospects. In such context, a country-wide survey associating bioassays and molecular investigations carried out from 2008 to 2010 through 26 localities in Burkina Faso aiming to update the resistance status to DDT, PYs, and OP/CX and the distribution of L1014F *kdr* among *An. gambiae s.l.* from these different agro-ecosystems. Populations of *An. gambiae* tested showed during these three years survey a generalising resistance status to PYs (permethrin and deltamethrin) and decreased mortality to bendiocarb whereas they remained susceptible to OP (chlorpyrifos methyl and fenitrothion) irrespective to the area. The frequency of the L1014F *kdr* mutation was highest in the sudan region ranging from 0.75 to 0.99 and relatively moderated in the sudano-sahelian area. Compared to the level of 2000, the frequency of *kdr* mutation increased in the M form reaching high frequencies (0.65) with a geographic extend to the sudano-sahelian region where it was formerly absent. It was also increased in *An. arabiensis* (0.28) whereas it was formerly reported only from one specimen in 2000yr. Results showed also over-expression of detoxifying enzymes such as GST, oxygenases, cytochrome P450 in the populations of *An. gambiae s.s.* from the old cotton belt together with *kdr* and *ace-1<sup>R</sup>* mutations indicating the existence of multi-resistance in Burkina Faso. The characterization of *kdr* L1014S mutation indicated that it is present in sudan and sudano-sahelian areas both in *An. gambiae* M and S forms and also in *An. arabiensis* in relative low frequency less than 0.2. *An. arabiensis* was also found replacing *An. gambiae s.s.* in Bobo-Dioulasso city formerly dominated by *An. gambiae* S form. But the ecological mechanism governing such colonisation remained to be clarified.

Comparing the resistance level by cotton growing system, slight but significant increase of susceptibility to DDT and reduce *kdr* L1014F allele frequencies were observed in transgenic cotton growing areas suggesting reducing in insecticide selection pressure induced by such practises. But the level of such evolution remained too weak to induce a breakdown in resistance status especially for operational vector control prospects.

In conclusion the geographical distribution of resistance in *An. gambiae s.l.* populations was found in sites of cotton cultivation that has expanded dramatically in the last ten years. The role of agriculture in the selection of resistance in natural mosquito's populations was one again confirmed by our works. Until the discovery of new insecticides or formulations of existing insecticides, it is crucial to integrate the regional vector resistance status in the implementation of control interventions that will preserve a long term efficacy of these vector control tools. It is paramount to improve knowledge on the practices of people regarding the use of insecticides and to integrate common platform of insecticides use both by Agriculture and Health Departments to preserve environment and human health.

**Key-words:** *An. gambiae s.l.*, insecticides resistance, transgenic and biological cotton, vector control, Burkina Faso.



# INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire due par un hématozoaire du genre *Plasmodium* et demeure la cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde en particulier en Afrique (WHO, 2009). Cet agent pathogène est transmis à l'homme par piqûre infectante d'une femelle d'*Anopheles*. Quatre espèces de *Plasmodium* infectent l'homme: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. *P. falciparum* est la plus virulente et la plus répandue en Afrique sub-saharienne (Burkot *et al.*, 1987). La lutte contre le paludisme est considérée de nos jours comme un des objectifs du Millénaire (WHO, 2012).

En 1880, Lavéran découvrit l'agent pathogène du paludisme et le décrivit comme un protozoaire. Donald Ross, en 1897 démontra le rôle vecteur des anophèles dans la transmission du paludisme. Quoique la lutte contre les vecteurs existait déjà depuis la Grèce antique où certains aristocrates romains se retiraient en montagnes pendant l'été (qui rimait avec le développement de moustiques) pour éviter le paludisme, à partir de ces deux découvertes scientifiques, l'épidémiologie du paludisme a été mieux décryptée ce qui devrait théoriquement améliorer la lutte contre cette maladie. En effet, avant l'avènement du DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloéthane), la lutte antivectorielle était orientée vers une destruction des gîtes larvaires par aménagement de l'environnement, l'utilisation d'huiles minérales ou d'aceto-arséniate de cuivre et la pulvérisation intradomiciliaire à l'aide de pyréthrine contre les adultes de moustiques (Swalengrebel *et al.*, 1931 ; Park Ross, 1936). Le DDT dont les vertus insecticides ont été découvertes en 1939 (Muller, 1955), a écrit une page importante de l'histoire de la LAV. En 1955, l'OMS, dans le cadre de son Programme Mondial d'Eradication du paludisme adopta l'utilisation du DDT en pulvérisation intradomiciliaire comme stratégie majeure de lutte antivectorielle (Macdonald & Göckel, 1964). Ce programme fut un succès dans plusieurs pays notamment dans les régions tempérées d'Europe, aux Etats-Unis et dans certaines régions tropicales d'Amérique du Sud ou d'Asie. Cependant la situation était beaucoup plus complexe en Afrique, où des zones pilotes représentatives des différentes régions africaines avaient été retenues pour participer à ce programme ambitieux. Les succès de cette campagne pilote furent mitigés et très souvent marqués d'échecs dans les zones de savanes tropicales subsahariennes et surtout en Afrique de l'Ouest (Cavalié & Mouchet, 1961). Plusieurs raisons seraient à l'origine de ces échecs: i) une faible connaissance de la biologie et l'écologie des vecteurs; ii) une insuffisance de ressources financières et humaines qualifiées (Mouchet *et al.*, 2004); et plus tard iii) l'émergence de la résistance du vecteur majeur *An. gambiae* à la dieldrine (Choumara *et al.*, 1959 ; Cavalié & Mouchet, 1961) et au DDT qui coïncide avec l'introduction et l'utilisation intensive d'une

formulation à base de DDT et d'endrine dans la protection des plants de coton (Hamon *et al.*, 1970). Toutes ces raisons ont dû surseoir au slogan d'éradication du paludisme et ont permis de revoir la stratégie de lutte contre le paludisme qui est actuellement focalisée sur la réduction de la transmission à un seuil où il ne serait plus un problème de santé publique.

En l'absence d'un vaccin fiable, la lutte contre le paludisme repose essentiellement sur deux mesures: le traitement antipaludique et prévention par la chimioprophylaxie et la lutte antivectorielle. La lutte antivectorielle reste aujourd'hui la principale méthode de protection des populations. La stratégie actuelle de la lutte antivectorielle repose principalement sur la réduction du contact homme-vecteur quoique cette dernière décennie le retour aux traitements de masse par les pulvérisations intradomiciliaires a revu le jour dans beaucoup de pays africains (Guimaraes *et al.*, 2007 ; Sadasivaiah *et al.*, 2007). Les pyréthrinoides constituent la classe d'insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires, car ils sont efficaces à faibles doses, et très peu toxiques pour l'homme et l'environnement (Elliot, 1989). Conçues dans les années 80 au Burkina Faso (Darriet *et al.*, 1984 ; Carnevale *et al.*, 1988 ; Darriet, 1991), les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) ont été évaluées avec succès à large échelle avec un impact considérable sur la réduction de la morbidité et la mortalité palustre de 50 à 60% et la mortalité générale de 20% en Afrique (Alonso *et al.*, 1991 ; Alonso *et al.*, 1993 ; D'Alessandro *et al.*, 1995 ; Binka *et al.*, 1996). A partir de ces résultats impressionnants, l'utilisation de la MII a été adoptée par les chefs états africains comme stratégie de première intention dans la lutte contre le paludisme (WHO, 2012). Cependant la vulgarisation de cet outil a connu des difficultés opérationnelles entre autres le problème de ré-imprégnation qui a été réglé plus tard par la mise au point des moustiquaires imprégnées de longue durée d'action (MILDA) ou long lasting impregnated nets (LLINs) des anglosaxons mais surtout le problème de résistance des vecteurs à l'occurrence d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoides (Chandre *et al.*, 1999a&b). Si dans un passé récent, les MII avaient montré une bonne efficacité en zone de résistance d'*An. gambiae s.s.* en Côte d'Ivoire (Doannio *et al.*, 1999 ; Henry *et al.*, 2005), la situation a beaucoup évolué et des baisses d'efficacité de ces MII ont été observées au Bénin assez récemment (N'Guessan *et al.*, 2007). Cette situation de résistance rapportée du Bénin ne devrait pas être très différente du Burkina Faso où la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides s'est généralisée à toutes les classes d'insecticides atteignant des niveaux très élevés et pourrait ainsi constituer un facteur limitant à l'utilisation de ces MII à long terme (Dabiré *et al.*, 2009a, 2012a). Pour renforcer l'efficacité des MII dans un contexte de résistance observée surtout en Afrique de l'Ouest (Elissa *et al.*,

1993 ; Awolola *et al.*, 2002, 2005 ; Diabaté *et al.*, 2002 ; Fanello *et al.*, 2003 ; Czeher *et al.*, 2008 ; Yadouleton *et al.*, 2009) les pulvérisations intradomiciliaires ont refait leur apparition (Rogan & Chen, 2005 ; Walter & Aimin, 2005 ) avec en appoint l'utilisation du bendiocarb qui est un carbamate (WHO, 2012). Cet insecticide à rémanence moins prononcée connaîtrait déjà des problèmes de résistance en Afrique de l'Ouest (Casimiro *et al.*, 2006 ; Dabiré *et al.*, 2012a). Les mutations *kdr* L1014F et *ace-1<sup>R</sup>* ont été identifiées comme principaux mécanismes de résistance respectivement aux pyréthrinoides et aux CXs/OPs en Afrique de l'Ouest (Chandre *et al.*, 1999a ; Weill *et al.*, 2004 ; Djogbenou *et al.*, 2008b). L'utilisation intensive d'insecticides en agriculture est l'un des facteurs favorisant l'émergence et la diffusion de ces gènes de résistance au sein des populations naturelles de vecteurs exerçant ainsi une forte pression de sélection (Diabaté *et al.*, 2002 ; Chouaibou *et al.*, 2008) particulièrement dans les zones cotonnières et maraîchères d'Afrique de l'Ouest (Diabaté *et al.*, 2004b ; Yadouleton *et al.* 2011; Badolo *et al.*, 2012).

Au Burkina Faso l'émergence et la distribution de la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides chevauche parfaitement avec les zones cotonnières où on note une augmentation des fréquences alléliques des mutations *kdr* L1014F et *ace-1<sup>R</sup>* (Dabiré *et al.*, 2009a&b) avec ces cinq dernières années une extension géographique très poussée vers de nouvelles zones cotonnières jadis exemptes de résistance (Dabiré *et al.*, 2012a).

Au Burkina Faso, en 2008 le coton transgénique à base de *Bacillus thuringiensis* (coton *Bt*) a été adopté comme nouvelle pratique agricole visant une augmentation des rendements tout en réduisant les quantités d'insecticides et les fréquences d'utilisation dans le traitement des cotonniers grâce à la toxine *Bt* (Ouédraogo *et al.*, 2011). A côté de cette pratique innovante, le coton biologique utilisant exclusivement des fertilisants et des insecticides biologiques a été aussi expérimenté depuis 2004 et cultivé à plus ou moins grande échelle dans certaines régions. Ces deux pratiques agricoles ont été donc vulgarisées à côté du coton conventionnel qui utilise les traitements d'insecticides chimiques sur six fenêtres couvrant tous les stades phénologiques du cotonnier.

Si des preuves tangibles ne sont pas encore disponibles quant au coût génétique lié à la mutation *kdr* chez *An. gambiae s.l.*, il est admis que la mutation *ace-1<sup>R</sup>* porte un coût génétique (Labbé *et al.*, 2007 ; Berticat *et al.*, 2008 ; Djogbenou *et al.*, 2010). Les individus homozygotes à cette mutation seraient donc éliminés par le coût génétique ce qui expliquerait le fort taux d'hétérozygotes observés dans la nature pour cette mutation (Djogbenou *et al.*, 2008b ; Dabiré *et al.*, 2009b). Notre hypothèse de travail est qu'une baisse de pression de

sélection par une pratique agricole peu ou pas consommatrice d'insecticides dans ces zones agricoles pourrait reconstituer une population sensible avec une faible fréquence allélique de ces mutations. Et comme ces mutations sont pour une grande partie responsables du niveau de résistance observée dans ces zones agricoles (Diabaté *et al.*, 2002 ; Dabiré *et al.*, 2009a), les pratiques agricoles à base de coton *Bt* ou biologique œuvreraient à restaurer le niveau de sensibilité des vecteurs toute chose qui pourrait contribuer à améliorer l'efficacité des outils à base d'insecticides utilisés en lutte antivectorielle.

L'objectif général de notre travail est alors d'évaluer l'impact de l'introduction de ces deux nouvelles pratiques agricoles peu ou pas consommatrices d'insecticides (coton *Bt* et biologique) sur le niveau de résistance des vecteurs et la fréquence allélique des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* au sein des populations d'*An. gambiae s.l.* dans les zones cotonnières (bassin cotonnier de l'Ouest et nouvelles zones cotonnières du Centre et de l'Est) où elles sont pratiquées. Il s'agira spécifiquement de :

i) évaluer et suivre la résistance des populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* aux quatre classes d'insecticides homologués pour la lutte antivectorielle (OC, PY, et OP/CX) en fonction des types de cotonnier et à partir de l'année de vulgarisation (T1).

ii) évaluer la distribution des fréquences alléliques des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* et investiguer le rôle d'autres mutations (*kdr* L1014S) et mécanismes enzymatiques de détoxification qui n'avaient pas été prises en compte par les études antérieures (HOLA, techniques biochimiques).

iii) étudier la résistance d'*An. gambiae s.l.* dans le faciès urbain (cas de Bobo-Dioulasso)

iv) comparer l'évolution de la résistance et la distribution des fréquences alléliques des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* dans les faciès agro-écologiques des nouvelles et anciennes zones cotonnières.

# GENERALITES

## 1. Les vecteurs du paludisme en Afrique

Dans le monde il existe environ 400 espèces d'anophèles mais seulement une soixantaine d'entre elles peuvent être considérées comme vecteurs et une trentaine comme de bons vecteurs de paludisme (Rodhain & Perez, 1985). En fonction de leur importance épidémiologique, les vecteurs du paludisme sont classés en deux grands groupes : les vecteurs majeurs et les vecteurs secondaires (Hamon & Mouchet, 1961 ; Mouchet *et al.*, 2004). En Afrique le système vectoriel est assez complexe faisant intervenir un nombre assez important de vecteurs mais globalement le paludisme est transmis par cinq vecteurs majeurs : *Anopheles gambiae s.s.* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles, *An. nili* Theobald et *An. moucheti* (Hamon *et al.*, 1956 ; Coluzzi, 1984 ; Gillies & Coetzee, 1987 ; Mouchet *et al.*, 1993 ; Fontenille & Lochouart, 1999 ; Coetzee *et al.*, 2000). En raison de leur rôle épidémiologique considéré comme négligeable dans la transmission du paludisme certaines espèces sont dites vecteurs secondaires: *An. melas* sur les côtes lagunaires d'Afrique de l'Ouest, *An. merus* et *An. mascarensis* à Madagascar (Fontenille & Campbell, 1992 ; Pock Tsy *et al.*, 2003).

### 1.1. Le complexe *Anopheles gambiae*

Ce complexe jadis considéré comme un seul taxon est composé de sept espèces jumelles morphologiquement identiques avec une répartition géographique caractéristique à travers toute l'Afrique suivant certaines contraintes climato-écologique (Hunt *et al.*, 1998). Il s'agit de :

*An. gambiae s.s.* Giles, 1902

*An. arabiensis* Patton, 1904

*An. melas* Theobald, 1903

*An. merus* Doenitz, 1902

*An. bwambae* White, 1985

*An. quadriannulatus* A Theobald, 1911

*An. quadriannulatus* B Hunt *et al.*, 1998

*An. gambiae s.s.* vit en sympatrie avec *An. arabiensis* dans la quasi-totalité des savanes afro-tropicales (Touré *et al.*, 1994, 1998 ; Wondji *et al.*, 2002 ; Dia *et al.*, 2003 ; Diabaté *et al.*, 2004b ; Simard *et al.*, 2009). Cependant on note une prédominance d'*An. gambiae s.s.* dans

les zones de forêt et de savane humide (Coluzzi *et al.*, 1993 ; Wondji *et al.*, 2002) tandis que *An. arabiensis* se retrouve majoritairement dans les zones sahéliennes et désertiques où il montre des préférences zoophiles et exophiles. Les gîtes de prédilection de ces deux espèces sont des collections d’eaux douces stagnantes ensoleillées et peu chargées de matières organiques.

Cependant à la faveur de certaines activités anthropiques suburbaines et urbaines, il se crée des gîtes pollués, atypiques, très souvent chargés de matières organiques qui sont de plus en plus colonisés par *An. gambiae s.l.* avec une prédominance d’*An. arabiensis* (Robert *et al.*, 1998). Récemment des études menées au Burkina Faso dans les banlieues de la ville de Ouagadougou et dans un quartier central de Bobo-Dioulasso ont révélé que ces deux zones urbaines sont dorénavant colonisées en grande majorité par *An. arabiensis* suivi d’*An. gambiae* forme M et d’une faible proportion d’*An. gambiae* forme S (Fournet *et al.*, 2010 ; Dabiré *et al.*, 2012b). Ces cas particuliers de colonisation des villes par *An. gambiae s.l.* (largement dominé par *An. arabiensis*) généralement dans ces gîtes urbains sub-permanents pose le problème du paludisme urbain en Afrique (Fournet *et al.*, 2010 ; Robert *et al.*, 2003).

Les deux espèces *An. melas* et *An. merus*, vivent respectivement sur le littoral Ouest et Est de l’Afrique et leurs larves colonisent les eaux saumâtres. Quant à *An. bwambae*, ses larves colonisent les sources d’eau minérale de la forêt de Semliki en Ouganda (White, 1985). *An. quadriannulatus* A&B dont les larves vivent en eau douce sont rencontrés dans la partie orientale de l’Afrique méridionale et en Ethiopie. En général ces espèces sont isolées entre elles par de mécanismes d’isolement reproductif assez robustes (Coluzzi *et al.*, 1985) même si au sein d’*An. gambiae s.s.* il a été décrit l’existence d’un polymorphisme génétique qui pourrait être à la base d’un processus de spéciation à l’intérieur de cette espèce (Coluzzi *et al.*, 2000).

En fait le taxon *An. gambiae s.s.* lui-même issu du démantèlement du complexe *An. gambiae* a été très vite soupçonné de présenter certaines hétérogénéités génétiques qui confèreraient un certain niveau d’isolement reproductif. En effet en Afrique de l’Ouest, des investigations portant sur les bras chromosomiques, en particulier les inversions sur le bras droit du chromosome 2 (2R), ont révélé très tôt l’existence d’un polymorphisme au sein de cette espèce qui serait composée de plusieurs sous-populations non panmictiques (Coluzzi *et al.*, 1985, 2002 ; Petrarca *et al.*, 1987 ; Touré *et al.*, 1994). Ainsi un déficit systématique d’hybrides entraînant une déviation de l’équilibre d’Hardy-Weinberg a permis d’isoler cinq formes chromosomiques Bamako, Bissau, Forêt, Mopti et Savane sur la base des inversions



2Rbc, 2Ru, 2Rd. Considérées comme espèces en voie de spéciation (Coluzzi *et al.*, 1985, 2002), elles sont réparties en Afrique de l'Ouest suivant certaines caractéristiques environnementales (Touré *et al.*, 1994, 1998). Des études plus poussées utilisant des outils moléculaires ont permis de regrouper ces 5 formes chromosomiques en deux formes moléculaires nommées provisoirement M et S. Le marqueur moléculaire (PCR-RFLP) mis au point par Favia *et al.* (2001) pour ce démantèlement exploite la séquence des nucléotides des espaces intergéniques (IGS) et de l'espace intérieur transcrit (ITS) de l'ADN ribosomal. A l'instar des formes chromosomiques, ces formes moléculaires sont aussi considérées comme des espèces incipientes (della Torre *et al.*, 2001, 2002) et semblent vraisemblablement et génétiquement plus structurées que les formes chromosomiques (Wondji *et al.*, 2005 ; Slotman *et al.*, 2007).

Les deux formes moléculaires M et S rencontrées au Burkina Faso correspondent respectivement aux formes chromosomiques Mopti et Savane et leur répartition géographique semble se chevaucher parfaitement (della Torre *et al.*, 2005). Quoique vivant en sympatrie, les deux formes moléculaires ont un gradient de répartition Nord-Ouest avec une prédominance de la forme S à l'Ouest tandis que la forme M est rencontrée à de fortes proportions dans les aménagements hydro-agricoles et au Centre-Est du pays (Dabiré *et al.*, 2009a ; Costantini *et al.*, 2009).

## **1.2. Le groupe *Anopheles funestus***

Le groupe *funestus* renferme 8 à 10 espèces morphologiquement très proches : *An. funestus s.s.*, *An. parensis* Gillies, *An. aruni* Sobti, *An. vaneedeni* Gillies & Coetzee, *An. rivulorum* Leeson, *An. brucei* Service, *An. confusus* Evan & Leeson, *An. fuscivenosus* Leeson, *An. lesoni* Evan et *An. fluviatilis* James (Gillies & Coetzee, 1987). Les larves d'*An. funestus s.s.* se développent dans des retenues d'eau permanente à semi-permanente à eau claire avec une végétation haute dressée ou ombrageant la surface de l'eau. Au Burkina, les populations d'*An. funestus s.s.* ont été observées en déséquilibre d'Hardy-Weinberg avec un déficit d'hétérozygotes qui a conduit à l'isolement de deux formes chromosomiques distinctes nommées Kiribina et Folonzo (Costantini *et al.*, 1999). Ces formes chromosomiques avec plus ou moins un taux d'hybrides élevé sur le terrain seraient des espèces incipientes (Costantini *et al.*, 1999, Guelbeogo *et al.*, 2005). Cependant cette structuration génétique à la base de l'isolement reproductif n'est suffisamment prononcée que dans le cas des populations d'*An. funestus* du Burkina Faso (Sharakhov *et al.*, 2001 ; Boccoloni *et al.*, 2002, 2005). *An. funestus ss* est largement impliqué dans la transmission du paludisme aussi bien en Afrique de l'Est

qu'en Afrique de l'Ouest et souvent joue le rôle de vecteur majeur au même titre qu'*An. gambiae s.s.* (Konaté *et al.*, 1994 ; Dia *et al.*, 2003). Au Burkina Faso son rôle dans la transmission du paludisme est plus prépondérant dans les régions Ouest du pays où il prend le relai à *An. gambiae s.s.* vers la fin de la saison des pluies (Dabiré *et al.*, 2007, 2008).

### **1.3. Autres vecteurs**

Dans la transmission du paludisme en Afrique certains vecteurs jouent un rôle secondaire mais se positionnent en vecteurs majeurs dans certaines zones. Ce sont : *An. mascarensis*, *An. moucheti* et *An. nili*. Antonio-Nkondjio *et al.* (2002) ont montré qu'*An. moucheti* pouvait assurer localement le rôle de vecteur majeur dans la transmission du paludisme au Cameroun. Au Burkina Faso d'importants travaux ont montré qu'*An. nili* était principalement localisé dans l'Ouest et le Sud-Ouest du pays avec un rôle très minime dans la transmission du paludisme (Dabiré *et al.*, 2007, 2008).

## **2. Bio-écologie des anophèles**

Les vecteurs du paludisme sont des Culicidés appartenant au genre *Anopheles*. Il existe près de 400 espèces dispersées dans le monde mais seulement une soixantaine d'entre elles peuvent être considérées comme vecteurs et une trentaine comme de bons vecteurs (Rodhain & Perez, 1985).

### **2.2. Cycle de développement des anophèles**

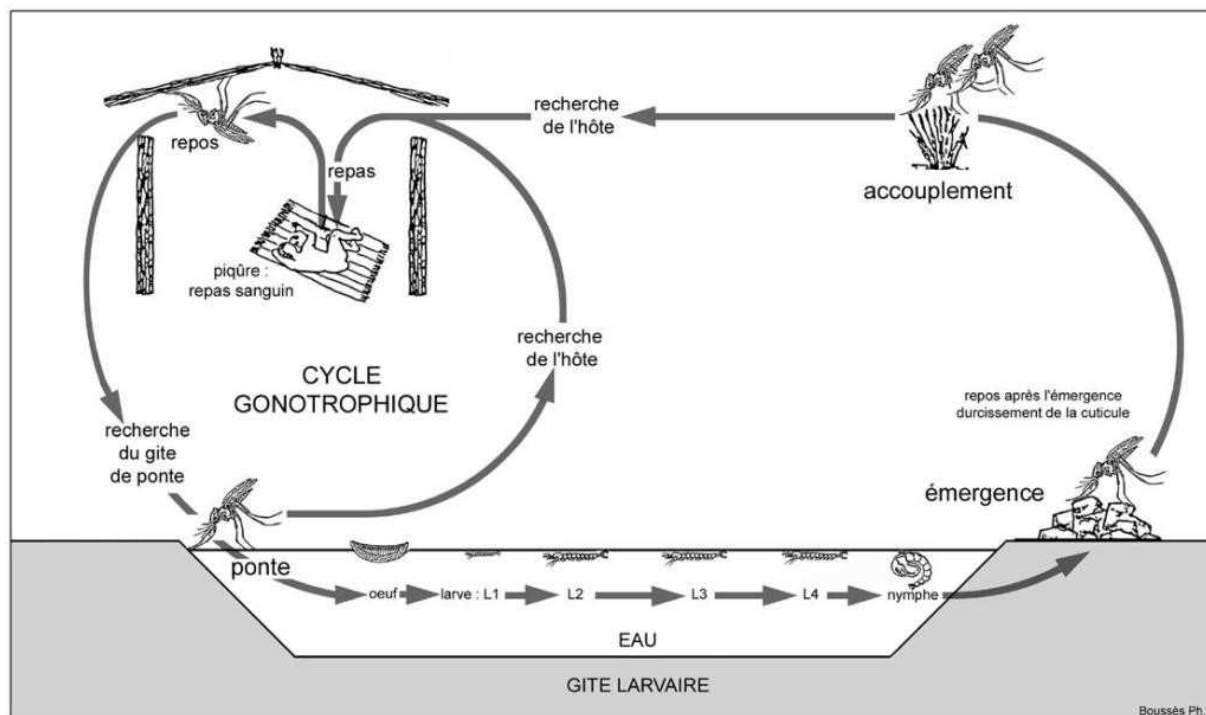
Les anophèles sont des insectes holométaboles dont le cycle de développement est marqué par une phase pré-imaginale aquatique (œufs, larves, nymphes) et une phase adulte (imago) (Figure 1).

#### ***La phase aquatique***

Les adultes nouvellement éclos, s'accouplent et les femelles fécondées prennent un ou plusieurs repas de sang, suivant les espèces, et pondent. De l'œuf sort une larve qui présente trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen dont le développement s'effectue en quatre stades séparés par trois mues successives. Les larves de premier stade ont une taille d'environ 1 mm et de 10 à 15 mm pour les larves de quatrième stade. Cette dernière mue ensuite en une nymphe (qui ne se nourrit pas) dont le stade nymphal dure moins de 48 heures. Ce stade constitue la période nécessaire à la mise en place des organes de la vie adulte. A la fin de ce stade, le tégument de la nymphe se fend sur le dos suivant une ligne longitudinale; par cette ouverture, le moustique adulte émerge et c'est le début de la phase aérienne.

### **La phase aérienne**

A l'éclosion, la nymphe s'immobilise à la surface de l'eau, allonge son abdomen puis le moustique adulte (imago), par une fente dorsale le long du thorax, dégage sa tête, ses ailes puis ses pattes, enfin son abdomen. L'imago a une taille qui varie entre 0,5 cm et 1,5 cm. Une observation morphologique des adultes permet de différencier facilement les mâles aux antennes plumeuses des femelles aux antennes glabres. Les femelles des anophèles se distinguent des autres femelles de Culicidés par leur corps oblique au repos et des palpes longues. La femelle après émergence recherche un hôte pour la prise d'un repas de sang préalable à la ponte des œufs. En fonction du mode de repas de sang on distingue : des espèces endophiles qui restent dans les habitations après le repas de sang par opposition aux espèces exophiles qui recherchent de préférence les abris extérieurs.



**Figure 1** : Cycle biologique des anophèles (Mouchet *et al.*, 2004).

### **2.3. Cycle de développement du *Plasmodium***

Dans la transmission du paludisme à l'homme trois facteurs sont indispensables ; l'homme, le vecteur et le parasite. De ces trois facteurs, seuls les vecteurs qui occupent une aire géographique bien déterminée sont limitant. Ces derniers déterminent le rythme, l'intensité et la période de transmission. L'aire de distribution du paludisme épouse celle de ses vecteurs,

justifiant l'absence de la maladie dans les zones tempérées où les conditions climatiques sont défavorables soit à la reproduction des vecteurs, soit au développement extrinsèque du parasite. Cependant deux phases se distinguent au cours du cycle de développement du plasmodium: une phase asexuée chez l'homme et une phase sexuée chez le moustique.

### **2.3.1. Chez l'homme**

Le moustique infectant, lors de son repas de sang injecte à son hôte des sporozoïtes qui restent moins d'une heure dans la circulation et gagnent les différents tissus cellulaires ; seuls survivent ceux qui passent dans le foie. L'évolution du parasite chez l'homme se fait en deux phases : la phase exo-érythrocytaire et la phase érythrocytaire. Les sporozoïtes gagnent les cellules hépatiques et se transforment en cryptozoïtes ; ces derniers augmentent de taille pour donner des schizontes. Le noyau de chaque schizonte se divise plusieurs fois et du cytoplasme s'élabore autour de chaque noyau : c'est la schizogonie. Cette phase de division cellulaire dure 10 à 15 jours environ et constitue la durée d'incubation du paludisme: c'est la phase exo-érythrocytaire.

Le schizonte mûr et la cellule infectée éclatent puis libèrent plusieurs mérozoïtes qui envahissent de nouvelles cellules. Certains mérozoïtes passent dans la circulation sanguine, pénètrent dans les hématies. Chez *P. vivax* et *P. ovale*, les schizontes peuvent rester plusieurs mois sous forme de cellules dormantes ou hypnozoïtes (Mouchet & Carnevale, 1988). Le mérozoïte qui pénètre dans l'hématie augmente de taille, son noyau se divise plusieurs fois et chaque noyau s'entoure d'un cytoplasme. Cette étape qui aboutit à la formation du schizonte mature ou "corps en rosace" est appelée la schizogonie érythrocytaire. Le schizonte mûr et l'hématie parasitée éclatent, les schizontes ou mérozoïtes libérés envahissent d'autres globules et le cycle asexué recommence. Cette phase qui commence par la pénétration d'un mérozoïte dans une hématie et finit par son éclatement dure 48h chez *P. vivax* et *P. falciparum* et 72h chez *P. malaria* : c'est la phase érythrocytaire. Après plusieurs cycles schizogoniques, certains mérozoïtes se différencient en éléments à potentiel sexué : les gamétocytes mâles et les gamétocytes femelles qui, pour poursuivre le cycle, doivent être ingérés par un moustique (Mouchet & Carnevale, 1988).

### **2.3.2. Chez l'anophèle**

A la faveur d'un repas de sang sur un sujet infesté, l'anophèle femelle absorbe les *Plasmodium* à différents stades de développement, mais seuls les gamétocytes poursuivront leur développement. Un quart d'heure après leur ingestion lors du repas de sang les

gamétocytes se transforment en gamontes qui évoluent rapidement en micro et macrogamètes au cours des trente minutes qui suivent cette prise de sang. La fécondation donne naissance à un oeuf mobile appelé ookinète qui traverse l'épithélium du mésentéron et s'enkyste pour donner l'oocyste. Ce dernier augmente de taille et se divise en plusieurs sporocystes qui se transforment en sporoblastes puis ceux-ci en sporozoïtes qui sont libérés dans l'hémolymphe après éclatement des oocystes; les sporozoïtes migrent vers les glandes salivaires qu'ils colonisent. Lors d'un nouveau repas de sang, l'anophèle injecte à l'homme des sporozoïtes qui restent moins d'une heure dans la circulation et gagnent les différents tissus cellulaires ; seuls survivent ceux qui passent dans le foie. Le cycle sporogonique du *Plasmodium* chez l'anophèle, dure environ 10 à 25 jours en fonction de l'espèce plasmodiale et de la température (figure 2).

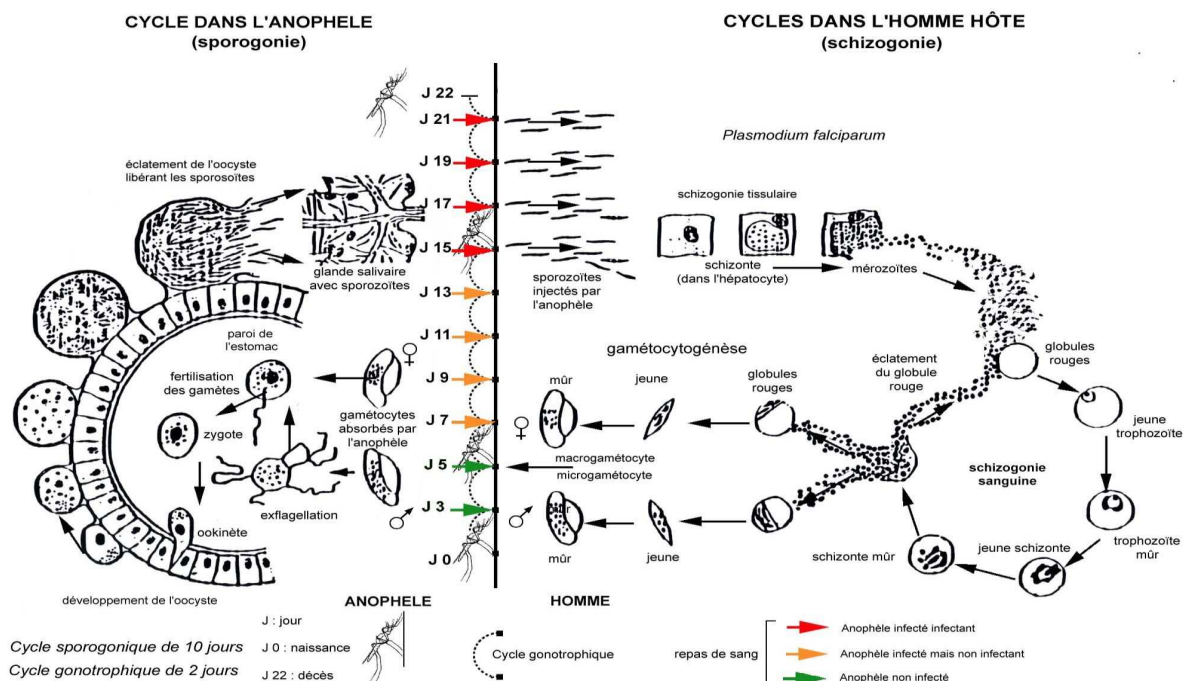


Figure 2 : Cycle de développement du *Plasmodium* (Mouchet *et al.*, 2004)

### 3. La lutte antivectorielle (LAV)

La lutte antivectorielle a pour rôle d'éradiquer localement la maladie en éliminant le vecteur ou en interrompant durablement la transmission ou encore en réduisant la transmission dans des proportions telles que la maladie ne soit plus un problème de santé publique, ni un obstacle au développement socio-économique. De nombreuses méthodes existent pour lutter contre les vecteurs mais pour répondre à des critères d'efficacité et de sélectivité la LAV doit

tenir compte de la bio-écologie et du comportement des espèces visées et surtout du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission (WHO, 1995). De ce fait elle peut alors se pratiquer à différents niveaux :

- la lutte larvicide ou lutte antilarvaire qui vise à réduire la production de vecteurs
- la lutte adulticide ou lutte contre les adultes qui vise à diminuer les densités des populations et/ou la longévité des femelles pour réduire ainsi leur capacité à transmettre certains agents pathogènes. Ces mesures comprennent entre autres, des mesures de protection individuelle ou collective, qui visent à limiter le contact homme-vecteur et diminuer la densité des femelles voir leur espérance de vie.

### **3.1. La lutte anti-larvaire**

Cette méthode n'est envisageable que lorsque les principaux gîtes larvaires sont en nombre limités, repérables et facilement accessibles. En Afrique, la lutte anti-larvaire est difficile à mettre en œuvre compte tenu de la très forte diversité des collections d'eau favorables à la reproduction des anophèles et à leur large distribution spatiale. Néanmoins elle peut être envisagée de trois manières :

- L'aménagement de l'environnement difficilement envisageable dans la plupart des pays en Afrique, elle concerne les grands travaux de drainage et l'hygiène péri-domestique ;
- La lutte biologique basée sur l'utilisation des prédateurs ou des bactéries entomo-pathogènes (poissons larvivores, champignons, *Bacillus sphaericus*.....) (Sinègre *et al.*, 1993 ; Baldet, 1995);
- La lutte chimique qui consiste à traiter les gîtes larvaires avec des insecticides chimiques. Le téméphos (OP) est le principal larvicide utilisé en raison de sa faible toxicité pour la faune non cible (Carnevale & mouchet, 1990).

### **3.2. Stratégies de lutte contre les stades adultes et les méthodes de protection**

Cette stratégie de lutte s'appuie principalement sur deux outils: la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides et la protection individuelle/collective même si on peut aussi citer la lutte génétique qui n'est pas encore effective pour les vecteurs du paludisme.

#### **3.2.1. Les pulvérisations intradomiciliaires**

La pulvérisation intradomiciliaire (PID) à l'aide de pyréthrinés a été pendant longtemps la principale méthode de lutte antivectorielle car bien adaptée aux vecteurs qui ont pour la plupart un comportement endophile (Swellengrebel *et al.*, 1931). A l'avènement du DDT cette

stratégie fut intensément utilisée pendant des décennies quoique la résistance des vecteurs à cet insecticide fut rapportée très tôt en Grèce dès 1951 (Livadas & Georgiopoulos, 1953). A l'interdiction du DDT dans les années 70 à cause de son accumulation dans les chaînes trophiques, son utilisation dans les PID fut stoppée à l'exception de quelques pays en Afrique de l'Est et Australe (Mabaso *et al.*, 2004) qui ont toujours continué cette pratique pour la prévention et le contrôle de la transmission surtout dans les régions à faciès de paludisme instable. Désormais la pulvérisation intradomiciliaire utilise les organophosphorés et les pyréthrinoides quoique l'utilisation du DDT est encore tolérée par l'OMS en traitement domiciliaire dans certains contextes, comme à Madagascar lors de l'épidémie de 1988 (Mouchet *et al.*, 1997).

### **3.2.2. Les moustiquaires imprégnées d'insecticides**

Face aux échecs des opérations pilotes du programme d'éradication du paludisme des années 50, aucun autre programme bien formalisé n'a remplacé les PID à base de DDT (Hamon *et al.*, 1963 ; Rugemalila *et al.*, 2006) jusqu'à l'apparition de la moustiquaire imprégnée d'insecticides (MII) dans les années 80 au Burkina Faso (Darriet *et al.*, 1984 ; Carnavale *et al.*, 1988 ; Darriet, 1991). Le concept de cet outil est de réduire au maximum le contact homme-vecteur en repoussant ou en tuant les moustiques qui tentent d'atteindre leur appât, ces vecteurs piquant la nuit et pour la plupart ayant un comportement endophile (Snow *et al.*, 1988 ; Robert & Carnevale, 1991 ; Karch *et al.*, 1993). Elles assurent deux niveaux de protection au sein de la population :

- à l'échelle de l'individu, elles protègent ceux qui les utilisent en repoussant les moustiques ou en les empêchant de piquer (protection individuelle)

- à l'échelle d'une communauté, elles réduisent les densités de vecteurs et la transmission du paludisme (protection collective). Mais cela nécessite une couverture d'au moins 80%, des moustiques sauvages sensibles et un insecticide efficace.

Ces MII sont sélectives pour les seuls insectes anthropophiles, car elles utilisent une faible quantité d'insecticide qui doit avoir un effet léthal rapide (« Knock down ») et une longue rémanence. Pour cela les MII sont imprégnées à la perméthrine et à la deltaméthrine par trempage ou par pulvérisation et restent efficaces pendant au moins six mois sans lavage. Au-delà de cette période d'utilisation il est nécessaire de ré-imprégner ces MII car des études ont montré que le lavage élimine une bonne partie de l'insecticide (Snow *et al.*, 1987) ainsi que les fibres synthétiques en l'occurrence le nylon fixent mieux l'insecticide et procurent une meilleure disponibilité des molécules contre l'insecte (Hossain *et al.*, 1986).

Testés avec succès à large échelle cet outil a montré un impact important considérable dans la réduction de la morbidité et de la mortalité palustre surtout dans la population cible que sont les enfants de 0-5ans (Alonso *et al.*, 1991, 1993 ; D'Alessandro *et al.*, 1995 ; Binka *et al.*, 1996). Cependant son application a suscité une réticence par certains auteurs qui ont soutenu que la diminution du nombre de piqûres retarderait l'acquisition de la prémunition antipalustre chez les enfants de moins de 5 ans (Snow & Marsk, 1995 ; Trape & Rogier, 1996 ; Merzger *et al.*, 1998 ; Snow, 2000 ; Askjaer *et al.*, 2001). Cette hypothèse a été battue en brèche quelques années plus tard par des études qui ont montré un niveau de prémunition similaire chez des enfants de 15 ans ayant bénéficié d'une protection sous MII dès leur plus jeune âges à ceux n'ayant reçu cette protection (Eisele *et al.*, 2005). La MII a été plus tard adoptée comme outil de première ligne dans la prévention contre le paludisme lors de la conférence des chefs d'Etats Africains à Abuja en 2000 (WHO, 2012). Cependant d'énormes problèmes ont rendu difficile la vulgarisation de ces MII, parmi lesquels nous avons la ré-imprégnation (Lines, 1996), le coût qui n'est pas très souvent à la portée des ménages et la distance à parcourir pour se rendre dans les rares centres d'imprégnation mis en place. Afin de palier à ces problèmes, les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) ou Long Lasting Impregnated Net (LLINs) ont vu le jour. Théoriquement ces MILDA, pré-imprégnées à l'usine devraient rester efficace toute leur durée de vie d'utilisation : deux à trois ans pour celles en polyester et quatre à six ans si elles sont en polyéthylène. A cela s'ajoute l'efficacité de ces moustiquaires qui persiste pendant des années malgré multiples lavages (Graham *et al.*, 2005 ; Gimning *et al.*, 2005). Actuellement un certain nombre de MILDA sont commercialisées mais au moins cinq d'entre elles ont reçu une spécification définitive ou intermédiaire de l'OMS (WHOPES) entre autres Olyset, Permanet 2, Netprotect, Interceptor, Permanet 3 etc. Ces MILDA sont imprégnées aux pyréthrinoides dont les plus utilisées sont la perméthrine, la deltaméthrine, l'alphacyperméthrine. Ces moustiquaires ont également permis d'obtenir une baisse significative de la prévalence parasitologique (Henry *et al.*, 2005). Leur efficacité est assez mitigée en zone de résistance où elles n'ont pas montré toutes le même niveau d'efficacité entomologique et de rémanence espérée (N'Guessan *et al.*, 2007). Le problème lié à l'acceptabilité et à l'utilisation réelle de ces MILDA par la population surtout en zone rurale pourrait être aussi un facteur limitant à la réussite des programmes de lutte basée sur cette stratégie (Tchinda *et al.*, 2012). En définitive les MILDA ont encore de beaux jours devant elles dans un contexte où aucune nouvelle molécule de rechange plus efficace contre les moustiques résistants n'est encore trouvée et où aucune autre stratégie plus opérationnelle, raisonnable et efficace n'est mise au point (les recherches sont



orientées sur plusieurs pistes et les résultats en dehors du vaccin antipaludique ne sont pas attendus pour demain).

### **3.2.3. Autres méthodes de protection contre les moustiques adultes**

#### ***Les répulsifs et bombes aérosols***

Le N-diéthyl-3-méthylbenzamide communément appelé DEET est un répulsif utilisé contre les piqûres des moustiques soit en application cutanée (Costantini *et al.*, 2004), soit en combinaison avec des pyréthrinoides ou autres molécules sur des moustiquaires afin de renforcer l'efficacité (Pennetier *et al.*, 2005). A côté des répulsifs on peut aussi citer les tortillons insectifuges qu'utilisent beaucoup de ménages ou d'individus pour lutter contre la nuisance et de fait contre les vecteurs en zones endémiques. Malheureusement peu d'études documentées existent sur le rôle et la place de ces outils sur la transmission du paludisme. Les insecticides composant ces tortillons sont supposés être principalement des pyréthrinoides mais leur origine douteuse ne permet pas d'établir avec exactitude la nature des insecticides qui entrent dans leur formulation. On peut aussi citer le cas des insecticides aérosols qui inondent le marché et constamment utilisés par les ménages avec pour première intention de lutter contre la nuisance culicidienne et contre les insectes domestiques (cafards) pour une meilleure hygiène familiale. Combinée aux outils de lutte antivectorielle telles les MILDA, l'utilisation de ces bombes pourrait jouer un rôle non négligeable mais non mesuré dans la protection contre les moustiques adultes et de façon générale dans la lutte antivectorielle (Dabiré, comm. pers.).

#### ***Les bâches imprégnées d'insecticides***

Les bâches imprégnées d'insecticides ou Insecticide Treated Plastic Sheets (ITPS) en anglais ont été expérimentées à la fin des années 90 contre les vecteurs en application intradomiciliaire (Bouma *et al.*, 1996 ; Graham *et al.*, 2004). Elles sont recommandées particulièrement dans des contextes de relogement communautaire de réfugiés en zones de conflits ou après calamités naturelles voire dans les installations militaires (Graham *et al.*, 2004). Cependant aucune étude d'impact n'a encore été réalisée sur cet outil quant à une réduction de morbidité ou de mortalité ou tout simplement sur la transmission du paludisme. A l'instar des MII, après une première série d'ITPS à base de pyréthrinoides et nécessitant une ré-imprégnation, une seconde classe d'ITPS a vu le jour à la lumière de la technologie « long lasting ». Ces outils ont été testés avec succès dans les zones où les vecteurs sont sensibles aux insecticides et ont montré une certaine efficacité entomologique acceptable en

zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoides au Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2006). Cependant une évaluation récente de ces bâches (DRWL à base de deltaméthrine) en zone de résistance à la Vallée du Kou a montré qu'elles étaient inefficaces avec un taux de mortalité largement en deçà de 50% (Dabiré, comm. pers, rapport IRSS 2010). Des recherches sont actuellement en cours pour tester des formulations d'insecticides en combinaison (pyréthrinoides + OP/CX) pour optimiser au mieux leur niveau d'efficacité (N'Guessan *et al.*, 2010 ; Kitau *et al.*, 2012).

#### **3.2.4. Les perspectives de lutte génétique**

La troisième stratégie, « la lutte génétique » ou les recherches sont en plein essor visant à rendre les populations d'anophèles incapables de transmettre le *Plasmodium* (Marreli *et al.*, 2007) et/ou de réduire la reproduction des anophèle par le lâcher de mâles stériles. Des moustiques transgéniques ont été obtenus par insertion d'une protéine SM1 qui empêche l'infection du moustique par le *Plasmodium* (Clarke, 2002). Le principe de cette lutte repose sur la diffusion d'un ou plusieurs gènes bloquant le développement du parasite au sein des populations naturelles. Cependant cette lutte génétique doit réussir l'interaction entre organismes génétiquement modifiés et les populations sauvages afin de réussir la diffusion de ces gènes d'intérêt dans les populations cibles (Moreira *et al.* 2004).

### **3.3. Insecticides utilisés en LAV**

Évalués à plus d'une dizaine de familles, les insecticides (produits synthétiques) tuent les insectes par contact ou par ingestion. Les insecticides sont incorporés à des excipients qui diffèrent suivant les conditions d'application. Pour les formulations liquides la matière active est dissoute dans un liquide. Dans les formulations solides la matière active est incorporée dans un support solide, tandis que les formulations multiphasés sont constituées d'une suspension stable de particules solides de matière active dissoutes dans un liquide (l'eau par exemple) pour emploi après dispersion dans l'eau. Les insecticides utilisés dans la lutte se regroupent au sein des familles suivantes :

#### **3.3.1. Les organochlorés**

Classé comme la plus ancienne famille d'insecticides, ce groupe comprend le dichloro-diphényl-trichloroéthane ou DDT et ses analogues, le lindane (hexachloro-cyclohexane ou HCH) et les cyclodiènes (dieldrine, endosulfan). Le DDT agit sur le système nerveux central et périphérique du moustique (Hassal, 1990) entraînant une perturbation des courants calcium/magnésium ( $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ ) et sodium/potassium ( $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ) le long de l'axone. Le

lindane et les cyclodiènes agissent sur le système nerveux central en inhibant les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui joue le rôle de neuromédiateur inhibiteur (Matsumura & Clark, 1985).

### **3.3.2. Les organophosphorés**

Deux sous-groupes se distinguent au sein de cette famille : les exothérapeutiques qui pénètrent directement dans l'organisme des culicidés par des voies divers et les endothérapeutiques qui pénètrent dans les végétaux et suivent les voies de la sève rendant toxiques ces plantes (pour les ravageurs). Dérivés organiques de l'acide phosphorique, les organophosphorés sont de bons neurotoxiques inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Eldefrawi, 1976) ; cette enzyme dégrade l'acétylcholine qui joue le rôle de neuromédiateur des synapses cholinergiques du système nerveux central des insectes. La forme oxydée de ces molécules se fixe sur l'acétylcholinestérase entraînant une 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. Ces insecticides qui ont progressivement remplacé les organochlorés dans les traitements continuent d'être assez largement utilisés. Parmi ces insecticides nous pouvons citer: le parathion, le malathion, le fénitrothion etc.

### **3.3.3. Les carbamates**

Dérivés de l'acide carbamique, les carbamates sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (comme les organophosphorés). Contrairement aux organophosphorés, les carbamates agissent directement sans oxydation préalable. Ils sont moins utilisés en santé publique à cause de leur coût de production et leur toxicité souvent plus élevée vis-à-vis des mammifères. De nos jours, le bendiocarb fait partie des insecticides les plus utilisés en pulvérisation intradomiciliaire comme alternative aux pyréthrinoides. Au Burkina Faso, depuis 2010 le bendiocarb est utilisé dans un site pilote dans le Sud-Ouest du pays, dans le district sanitaire de Diébougou.

### **3.3.4. Les pyréthrinoides**

Les pyréthrinoides sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs de chrysanthème, *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Deux grands groupes de pyréthrinoides se distinguent suivant la présence d'un groupement cyané en position  $\alpha$  de la liaison ester (groupe II: deltaméthrine, lambda-cyhalothrine) ou non (groupe I: perméthrine). Comme le DDT, les pyréthrinoides agissent sur le système nerveux central et périphérique

(Elliot & Janes, 1978) en modifiant la cinétique d'activation-inactivation du canal sodium le long de l'axone (Lund & Narahashi, 1983). Le canal une fois activé, entraîne un flux d'ions sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation de la membrane cellulaire dure quelques secondes et le canal se referme spontanément, provoquant une activation des CNaVdp situés à proximité et de proche en proche, engendrant une vague de dépolarisation assurant la propagation de l'influx nerveux (Chapman, 1969).

Les pyréthrinoides sont des candidats de choix en santé publique pour l'imprégnation des moustiquaires à cause de leur photostabilité, leur toxicité sélective et leur innocuité pour les vertébrés à sang chaud (Zaim *et al.*, 2000). La perméthrine et la deltaméthrine sont couramment utilisées dans l'imprégnation des moustiquaires à longue durée d'action. Cependant, un problème majeur pouvant être un facteur limitant à leur utilisation se pose avec l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoides (Chandre *et al.*, 1999a&b).

### **3.3.5. Les autres insecticides**

#### **3.3.5.1. Bio-larvicides**

Molécules d'origine biologique les plus utilisées en entomologie médicale sont les toxines bactériennes produites par la souche H-14 de *Bacillus thuringiensis* et la souche 2362 de *Bacillus sphaericus*. Ces deux bactéries produisent des toxines qui résistent assez bien à un stockage prolongé même en milieu tropical et ne deviennent efficaces que lorsqu'elles sont ingérées, n'ont aucun effet par contact et sont très sélectives.

#### **3.3.5.2. Régulateurs de croissance**

Les régulateurs de croissance sont des analogues d'hormones d'insectes. Il s'agit des juvénoïdes (méthoprène, pyriproxifen) et les ecdysoïdes (diflubenzuron). Ils empêchent le développement normal des larves, soit en inhibant la nymphose soit en bloquant la synthèse de la chitine.

#### **3.3.5.2. Nouvelles molécules insecticides**

Ce sont de nouveaux insecticides qui sont encore en expérimentation. Il s'agit de : i) néonicotinoïdes (imidacloprid, acetamiprid), inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, ils agissent par ingestion. Ces molécules ont un large spectre d'action et sont très peu toxiques pour les mammifères. ii) Mitochondrial Electron Transport Inhibitors (METIs) agissent par contact et

par ingestion sur les hémiptères et les lépidoptères. Ces molécules inhibent la respiration mitochondriale en bloquant le transport des électrons dans la mitochondrie. iii) fiproles (le fipronil), ces molécules agissent également par contact et par ingestion sur les récepteurs GABA.

#### **4. Mécanismes de résistance aux insecticides**

La résistance est une adaptation génétique aux modifications de l'environnement. Elle est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant l'apparition, dans une population, d'individus possédant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet léthal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce (Hamon & Mouchet, 1961). Toute molécule insecticide traverse plusieurs étapes (pénétration, transformation en métabolite actif, transport jusqu'à la cible et interaction avec cette dernière) avant d'interagir avec sa cible physiologique. Cependant tout mécanisme qui bloque l'un de ces processus conduit à une résistance. Chacune de ces étapes est sous contrôle génétique et toute mutation du (ou des) gène qui les gouverne peut conduire à l'apparition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance, conférant ainsi les types de résistance suivants (Haubruge & Amichot, 1998) :

##### **4.1. Résistance métabolique**

Elle correspond à un accroissement des processus de dégradation de molécules pouvant résulter soit d'une augmentation de la quantité d'enzyme (surproduction) soit d'une meilleure efficacité catalytique de l'enzyme (mutation ponctuelles). Ces mécanismes sont basés sur les systèmes enzymatiques que possèdent tous les insectes pour assurer la détoxification naturelle des xénobiotiques. Trois groupes principaux d'enzymes sont impliquées dans la détoxification des insecticides: les monooxygénases à cytochrome P450, les estérases et les glutathion-S-transférases (Hemingway *et al.*, 2004). Ces systèmes enzymatiques sont surproduits ou leur efficacité catalytique est augmentée chez les individus résistants par rapport aux individus sensibles. Cette transformation leur permet de métaboliser ou de dégrader les molécules d'insecticides avant qu'elles n'exercent un effet toxique.

Les monooxygénases à cytochrome P450 sont principalement impliquées dans la résistance aux pyréthrinoides et dans la moindre mesure, aux autres insecticides. Elles appartiennent à 6 grandes familles de gènes, parmi elles CYP4, CYP6 et CYP9 sont les seules familles qui jouent un rôle dans la résistance aux insecticides chez les insectes (Feyereisen *et al.*, 1999).

La surproduction des estérases entraîne une hydrolyse ou séquestration des molécules d'insecticides. Les estérases jouent un rôle important dans le métabolisme des organophosphorés, des carbamates et des pyréthrinoides dont ils dégradent rapidement les isomères trans.

Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont généralement impliquées dans le métabolisme des organophosphorés, du DDT et accessoirement des pyréthrinoides. Les GSTs sont des systèmes enzymatiques qui catalysent la conjugaison des insecticides avec le glutathion sous forme réduite, formant ainsi des métabolites moins toxiques.

De nos jours, il a été mis au point un outil très performant, le whole-genome microarray qui est utilisé dans la recherche de gènes candidats qui pourraient être associés à cette résistance métabolique (Muller *et al.*, 2008b ; Ayres *et al.*, 2011 ; Jones *et al.*, 2012).

#### **4.2. Résistance liée à la modification de la cible**

Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux. Ces mutations de la cible s'accompagnent de phénomènes de résistance croisée pour tous les insecticides agissant sur la même cible. Les cibles moléculaires connues dont les modifications conduisent à une résistance aux insecticides sont l'acétylcholinestérase, les canaux sodium voltage dépendants et les récepteurs GABA (Brogdon & Mc Allister, 1998; Hemingway & Ranson, 2000).

##### **4.2.1. Les mutations *kdr 1014F* & *1014S***

Les canaux sodium voltage dépendants (CNaVdp) sont des protéines transmembranaires qui interviennent dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. L'activation de ces canaux entraîne un flux d'ions sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intercellulaire, générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation provoque l'activation des CNaVdp situés à proximité et se propage de proche en proche engendrant une vague de dépolarisation qui assure la transmission de l'influx nerveux (Chapman, 1969). Les CNaVdp sont les sites d'action du DDT et des pyréthrinoides qui, une fois fixés, modifient la cinétique d'inactivation et entraîne à une paralysie très rapide ou effet knock-down (kd) chez la souche sensible (insecte). Chez les insectes résistants une mutation ponctuelle au niveau du gène codant pour le segment 6 du domaine II de la protéine se traduit par une résistance à l'effet kd de ces insecticides (mutation *kdr*). Cette mutation résulte du changement d'une leucine par une phénylalanine en position 1014 (L1014F). En Afrique de l'Est cette mutation se traduit par le remplacement de la leucine par la serine au niveau des mêmes séquences conférant la

résistance aux pyréthrinoides et au DDT mais qui serait moins marquée que celle de l'Afrique de l'Ouest (Ranson *et al.*, 2000). La mise au point de technique de diagnostic moléculaire (Martinez-Torres *et al.*, 1998) a permis d'étudier sa distribution au sein de populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* (voir chapitres 1,2 &3).

#### **4.2.2. La mutation *ace-1 G119S***

L'acétylcholinestérase cible des carbamates et des organophosphorés a pour rôle d'hydrolyser l'acétylcholine, médiateur chimique de la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses cholinergiques. Ces molécules appartiennent à deux familles d'insecticides qui agissent en inhibant l'acétylcholinestérase des synapses. Ils inactivent la phosphorylation de la serine catalytique au niveau du site actif de l'enzyme. Cette inhibition provoque une accumulation d'acétylcholine dans la fente synaptique, prolongeant l'influx nerveux et entraînant une tétanie mortelle chez les insectes (Massoulié *et al.*, 1993). Une diminution de l'affinité vis-à-vis des carbamates et des organophosphorés aurait pour conséquence une résistance à ces molécules. Deux types d'acétylcholinestérases ont été mis en évidence chez les Culicidae grâce aux investigations sur le séquençage du génome d'*An. gambiae* (Weill *et al.*, 2002). Chez les Diptères, deux gènes non homologues codent pour la synthèse de l'acétylcholinestérase : i) *ace-1* chez les diptères Orthorrhaphes dont les Culicidae ; ii) *ace-2* chez les diptères Cyclorrhaphes dont les drosophiles et les Muscidae (Huchard *et al.*, 2006). Le gène *ace-1* code la protéine AChE1, alors que *ace-2* code la protéine AChE2. La mutation *ace-1* serait la cible des carbamates et des organophosphorés chez *An. gambiae* (Weill *et al.*, 2003, 2004) et résulterait d'un remplacement de la glycine par la serine au niveau du segment 119 (mutation G119S) du gène codant l'acétylcholinestérase.

#### **4.3. Autres mécanismes de résistance**

Ce sont des mécanismes peu connus dont l'efficacité est relativement moindre et qui interviennent souvent en synergie avec les mécanismes précédents. L'insecte évite le contact avec le produit toxique ou limite la durée de ce contact : c'est la résistance comportementale. Nous pouvons citer également la pénétration réduite de l'insecticide à travers la cuticule de l'insecte et la modification du taux d'absorption ou d'excrétion de l'insecticide.

### **5. Situation de la résistance des vecteurs aux insecticides**

#### **5.1. En Afrique**

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides a été détectée depuis les années 50 en Afrique avec l'apparition de la résistance des anophèles à la dieldrine au Nigéria en 1954

et plus tard en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso (Armstrong *et al.*, 1958 ; Adam *et al.*, 1958 ; Hamon & Garrett-Jones, 1963 ; Hamon *et al.*, 1963, 1968a). Le premier cas de résistance au DDT a été détecté en 1967 à Bobo-Dioulasso, soit sept ans après l'arrêt complet de son utilisation en santé publique (Hamon *et al.*, 1969b). En plus l'apparition de la résistance au DDT coïncide avec son introduction massive en milieu agricole pour la protection du cotonnier. Quelques années plus tard la résistance au DDT a été observée dans d'autres pays : la Côte d'Ivoire, le Nigéria, le Mali, le Sénégal, le Soudan, la Tanzanie, l'Éthiopie et le Swaziland (Coz *et al.*, 1966, 1968 ; Touré, 1982, 1984 ; OMS, 1992). L'échec des stratégies d'éradication et de contrôle du paludisme a conduit à l'abandon du DDT, désormais les pyréthrinoides constituent la classe d'insecticides préconisée pour l'imprégnation des moustiquaires et en pulvérisations intradomiciliaires. Cependant, un problème majeur pouvant être un facteur limitant à leur utilisation se pose avec l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoides (Elissa *et al.*, 1993 ; Chandre *et al.*, 1999b). L'un des mécanismes de résistance aux pyréthrinoides le mieux caractérisé est la mutation *kdr*. Cette mutation qui provoque une résistance croisée aux pyréthrinoides et au DDT qui ont la même cible au niveau du système nerveux central des insectes. La mutation *kdr* L1014F est très fréquente chez les populations d'*An. gambiae* s.s. d'Afrique de l'Ouest (Chandre *et al.*, 1999a&b ; Diabaté *et al.*, 2004b ; Tripet *et al.*, 2007), alors que la mutation *kdr* L1014S est plus fréquente en Afrique Centrale et de l'Est (Ranson *et al.*, 2000 ; Verhaeghen *et al.*, 2006 ; Santolamazza *et al.*, 2008). De nos jours il existe des tests diagnostiques pour leur détection simultanée (Lynd *et al.*, 2005 ; Kazanidou *et al.*, 2009).

Ces techniques ont permis de détecter cette mutation L1014S dans les populations naturelles d'*An. arabiensis* au Bénin (Djègbè *et al.*, 2011).

A l'instar des pyréthrinoides, en Afrique le premier cas de résistance des vecteurs aux organophosphorés et carbamates (OP/CX) a été observé chez *An. arabiensis* vis-vis du malathion et du phenthoate au Soudan (Hemingway, 1983). Par la suite cette résistance a été mise en évidence en Côte d'Ivoire au sein des populations d'*An. gambiae* (N'Guessan *et al.*, 2003). La résistance aux OP et CX a pour principal mécanisme de résistance la mutation *ace-1<sup>R</sup>*, une mutation de cible touchant l'acétylcholinestérase, (Weill *et al.*, 2004 ; Djogbenou *et al.*, 2008a). Cette mutation a été trouvée à une très faible fréquence chez *An. gambiae* forme M à Parakou au Bénin (Corbel *et al.*, 2007) et à des fréquences plus élevées dans les deux formes M et S d'*An. gambiae* dans le Sud-ouest du Burkina Faso (Djogbenou *et al.*, 2008b ; Dabiré *et al.*, 2009b).



## 5.2. Au Burkina Faso

A l'avènement des pyréthrinoides, ces insecticides ont été largement utilisés dans les années 80 dans la lutte contre les ravageurs en agriculture et dans la lutte contre les vecteurs du paludisme en santé publique. Cependant, la résistance aux pyréthrinoides a été détectée pour la première fois chez *An. gambiae* au Burkina Faso en 1999 (Chandre *et al.*, 1999a). D'autres investigations plus poussées ont établi une corrélation entre la distribution de la mutation *kdr* L1014F et l'usage agricole des pyréthrinoides contre les ravageurs dans le bassin cotonnier du pays (Diabaté *et al.* 2002 ; Dabiré *et al.*, 2009a&b ; Dabiré *et al.*, 2012a). Cependant aucune preuve formelle n'a été apportée quant à la présence de résidus d'insecticides dans les gîtes larvaires, même si les zones où les plus fortes fréquences de la mutation *kdr* sont observées chez *An. gambiae*, correspondent aux zones où une pression de sélection provenant de l'agriculture semble la plus forte (zones cotonnières et maraîchères). Des travaux antérieurs menés au Burkina Faso ont montré que la mutation *kdr* L1014F était distribuée de façon prédominante dans les populations de la forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* à des fréquences très élevées de l'ordre de 80% tandis que chez la forme M elle avait été observée à une très faible fréquence au niveau d'un seul site, VK7 (Diabaté *et al.*, 2003). VK7 est un village situé à l'interface des périmètres rizicoles de la Vallée du Kou et de la savane environnante. Par la suite la même équipe a détecté pour la première fois la mutation *kdr* L1014F chez un seul spécimen d'*An. arabiensis* à l'état hétérozygote dans le Sud-Ouest du pays notamment dans un site cotonnier, Soumousso (Diabaté *et al.*, 2004a). Récemment, les résultats d'études plus récentes ont montré une extension géographique de la mutation *kdr* chez la forme M d'*An. gambiae s.s.* et au sein des populations d'*An. arabiensis* au Centre Est du pays à une fréquence relativement élevée de 30% à Manga (Dabiré *et al.*, 2009a, 2012a). L'augmentation de la fréquence *kdr* chez la forme M et dans une moindre mesure chez *An. arabiensis* serait probablement liée à l'extension des aires cotonnières et l'usage concomitant des pyréthrinoides dans les anciennes et nouvelles régions cotonnières du Burkina Faso (Dabiré, 2008).

La mutation *ace-1<sup>R</sup>* a été rapportée au sein des deux formes M et S d'*An. gambiae s.s.* surtout à l'Ouest du Burkina mais à des fréquences plus importantes chez la forme S (Djogbenou *et al.*, 2008b ; Dabiré *et al.*, 2009b). A l'instar de la mutation *kdr* la sélection de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* au sein des populations d'*An. gambiae s.s.* serait attribuée à l'utilisation intensive des OP et CX dans le traitement du coton en rotation avec les pyréthrinoides contre les ravageurs du coton (Dabiré *et al.*, 2012b).

## 6. Présentation de l'étude

Notre étude se propose d'étudier et de comparer la résistance des vecteurs principalement *An. gambiae s.l.* aux insecticides dans les différents faciès cotonniers (*Bt*, biologique, conventionnel) des zones agro-climatiques du Burkina: ancien bassin cotonnier de l'Ouest en zone soudanienne et nouvelle zone cotonnière du Centre, du Centre-Est et de l'Est en zone soudano-sahélienne.

Nos travaux vont s'articuler sur ces principaux axes en fonction des objectifs spécifiques:

i. réactualiser et comparer le statut de résistance des populations naturelles d'*An. gambiae* aux quatre classes d'insecticides homologués en santé publique pour la lutte antivectorielle (pyréthrinoides, organochlorés, organophosphorés et carbamates) dans les différents faciès cotonniers. Il s'agira de réaliser des tests de sensibilité en tube OMS sur des populations d'*An. gambiae s.l.* échantillonnées au stade larvaire dans les différents sites d'étude à partir des insecticides retenus aux doses recommandées par l'OMS.

ii. détecter les gènes impliqués dans les différents mécanismes de résistance dans les populations testées (mutations *kdr* L1014F, *ace-1<sup>R</sup>*) en appliquant des PCR spécifiques (voir la section Matériels et Méthodes). Leurs fréquences alléliques seront analysées et comparées par les tests de génétique de populations (hypothèse d'Hardy-Weinberg) et par les tests statistiques appropriés (Chi 2, Anova etc).

iii. d'étudier la résistance des populations d'*An. gambiae s.l.* en faciès urbain (cas de Bobo-Dioulasso)

iv. investiguer la présence d'autres types ou mécanismes de résistance non pris en compte par les travaux antérieurs en appliquant d'autres protocoles d'étude. Il s'agira de rechercher respectivement la résistance métabolique en appliquant la technique d'analyse biochimique et de détecter la présence de la mutation *kdr* L1014S par le protocole HOLA dans un contexte de multirésistance d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides

v. enfin de comparer l'évolution de la résistance dans ces faciès cotonnier et agro-écologiques.

# MATERIELS ET METHODES

### 1. Le Burkina Faso

Le Burkina Faso est un pays sahélien enclavé situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest et couvre une superficie de 274 200 km<sup>2</sup>. Il est limité au Nord et à l'Ouest par le Mali, au Nord-Est par le Niger, au Sud-Est par le Bénin et au Sud par le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire. L'économie du Burkina Faso repose essentiellement sur l'agriculture et l'élevage qui occupent plus des trois quarts de la population active.

#### 1.1. Données environnementales et climatiques

Plusieurs facteurs environnementaux et climatiques influençant la prolifération des vecteurs sont associés à l'endémicité du paludisme. Ces facteurs sont la pluviométrie, la température et le couvert végétal. Le Burkina Faso est sous un climat tropical de type soudanien dans lequel alternent une longue saison sèche (octobre à avril) et une courte saison humide (mai à septembre). La durée de la saison des pluies et la pluviométrie totale annuelle permettent de distinguer trois zones climatiques:

- une zone soudanienne, plus arrosée avec une pluviométrie comprise entre 1000 et 1300 mm sur une période qui s'étale sur au moins 5 mois. La végétation est composée de forêts claires et de galeries forestières en bordure de cours d'eau permanents ;

- une zone soudano-sahélienne, recevant une pluviométrie comprise entre 600 et 1000 mm sur une période d'environ 4 à 5 mois. La végétation est une juxtaposition de formations arbustives et herbeuses ;

- une zone sahélienne caractérisée par une pluviométrie annuelle comprise entre 400 et 600 mm sur une période de 3 à 4 mois. La bande sahélienne est caractérisée par une steppe arborée de balanite et acacias radia avec un tapis de graminées sur les dunes et le long des dépressions.

#### 1.2. Hydrographie

Le réseau hydrographique du Burkina s'organise en trois bassins qui drainent annuellement environ 8 milliards de m<sup>3</sup> d'eau. Ce sont : le bassin de la Volta, le bassin de la Comoé et le bassin du Niger. D'autre part de nombreuses mares temporaires et permanentes existent sur l'ensemble du territoire mais ne sont pas répertoriées. Il existe également des barrages hydroélectriques aux abords desquels des aménagements agricoles et maraîchers ont été

réalisés. Ces mares et aménagements sont souvent sources de prolifération des vecteurs dont l'anophèle.

## **2. Aires cotonnières et différents types de cotons produits au Burkina Faso**

Dans le but d'une meilleure gestion de la filière coton au Burkina Faso, les zones cotonnières ont été regroupées en 3 grandes régions gérées chacune par une société cotonnière : 20 provinces pour la SOFITEX dans l'Ouest du pays, 12 provinces pour FASOCOTON dans le Centre et 6 provinces pour SOCOMA dans l'Est. Ces 3 sociétés travaillent en étroite collaboration dans le but d'harmoniser les traitements insecticides pour de meilleurs rendements. Chaque région est subdivisée en zones dirigées chacune par un chef de zone; chaque zone est subdivisée en secteurs dirigés chacun par un chef de secteur et chaque secteur est subdivisé en blocs avec à la tête un chef d'équipe qui assure le bon déroulement du traitement dans son bloc. Ces trois sociétés appliquent une politique de gestion de la résistance aux insecticides (observée chez les populations des ravageurs) basée sur les combinaisons d'insecticides ayant des modes d'action différents appliqués de façon simultanée (mélange) et alternée dans le temps (traitements en fenêtre). Les pulvérisations sont faites dès l'apparition des boutons floraux chez les jeunes plants de coton, qui correspond généralement au mois d'août et sont répétées tous les 14 jours jusqu'à l'ouverture des premières capsules. Depuis 2008, deux régions cotonnières (SOFITEX et SOCOMA) sont engagées dans la culture du coton transgénique en association ou non avec les autres types de coton (tableau I).

*a) Le coton conventionnel* : c'est le mode de production industrielle de coton adoptée depuis l'histoire de la culture du coton au Burkina Faso. Il est basé sur une optimisation des traitements phytosanitaires organisés en itinéraire technique intégrant le choix des variétés de semences, les dates de semis, les apports d'intrants jusqu'aux traitements phytosanitaires (tableau I). Les traitements insecticides sont effectués sur six fenêtres de traitements en fonction de la densité et des espèces de ravageurs. Ces traitements sont appliqués en rotation d'insecticides incluant des pyréthrinoides et des OPs/CXs (Anonyme, 1997). Le calendrier des traitements s'effectue conformément aux fenêtres de traitements présentées dans le tableau I. Bien que le coton *Bt* soit en pleine extension, le coton conventionnel continue d'être produit dans les 3 zones cotonnières de l'Ouest, du Centre et du Centre-Est mais il est majoritairement produit dans la zone du Centre qui n'a pas encore vulgarisé le coton *Bt*.

*b) Le coton transgénique Bt* : En 2008, compte tenu de la persistance de la résistance aux insecticides chez les populations des ravageurs, le coton transgénique a été introduit au

Burkina Faso. Cela dans l'optique d'un meilleur rendement agricole tout en réduisant d'au moins un tiers, l'usage d'insecticides dans le bassin cotonnier à base d'un transgène de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). *B. thuringiensis* est une bactérie qui se trouve naturellement dans les sols, et produit des toxines qui tuent les insectes, surtout les lépidoptères. Des travaux menés sur le génome de *B. thuringiensis* ont permis d'isoler certains gènes responsables de la production de ces toxines, notamment ceux des toxines Cry1Ac et Cry2Ab. Des outils de génie génétique ont été utilisés pour l'insertion de ces gènes dans le coton. Les plants de coton *Bt* qui en résultent, libèrent des toxines tout au long de leur cycle de croissance, toxines mortelles pour certains groupes de lépidoptères. Pour lutter contre les autres ravageurs des traitements insecticides sont quand même appliqués mais à de fréquences limitées ce qui réduirait logiquement la pression insecticide. D'où l'intérêt que nous accordons à cette pratique en terme de distribution de la résistance aux insecticides d'*An. gambiae s.l.* Cette culture est en ce moment la plus répandue dans les zones de l'Ouest et du Centre-Est (figure 3).

**c. Le coton biologique :** le coton biologique encore connu sous le nom de coton bio a été introduit au Burkina Faso depuis 2004 mais sa production à grande échelle a été boostée à partir de 2006 par le soutien de certains partenaires au développement qui en font la promotion. C'est le cas de la Société Helvetas qui est très active au près des producteurs pour fournir assistance technique et promotionnelle. Comme son nom l'indique, la culture du coton bio est basée sur l'utilisation maximale des intrants et insecticides biologiques exempts de tout apport chimique. Cette culture est majoritaire dans les zones cotonnières de l'Ouest et du Sud-Ouest du pays où des superficies relativement importantes lui sont réservées (tableau III) tandis que dans les trois régions cotonnières elle est cultivée sur de petites superficies à côté de grandes exploitations de culture vivrière et le plus souvent réservé aux femmes.

**Tableau I:** Calendrier des traitements et insecticides utilisés par SOFITEX, SOCOMA et FASOCOTON

Première fenêtre		Deuxième fenêtre		Troisième fenêtre	
Substances actives	(g/litre ou g/kg)	Substances actives	(g/litre ou g/kg)	Substances actives	(g/litre ou g/kg)
Malathion	880	Alphacyperméthrine + profenofos	15/200	Cyperméthrine + acétamipride	36/8
Flubendiamide + spirotetramate	100/75	Cyperméthrine + profenofos	30/200	Cyperméthrine + imidaclopride	36/35
Triazophos	375	Zetaméthrine + profenofos	12/200	Cyperméthrine + thiaclopride	36/48
Thiodicarb	500	Cyperméthrine + triazophos	30/200	Labdacyhalothrine + acétamipride	24/32
Profenofos	500	Deltaméthrine + triazophos	10/200	Labdacyhalothrine + acétamipride	120/64
Indoxacarb	150	Labdacyhalothrine + profenofos	12/200	Labdacyhalothrine + pyriproxifen	30/20
Indoxacarb	300	Labdacyhalothrine + triazophos	12/200	Bifenthrine + chlorpyriphos éthyle	30/150
Spinosad	480	Labdacyhalothrine + chlorpyriphos éthyle	15/200	Cyperméthrine + acéphate	36/750
Téflubenzuron	150	Cyperméthrine + chlorpyriphos éthyle	36/200	Fenpropathrine + pyriproxifen	190/10
Emamectine	19,2	Cyfluthrine + chlorpyriphos éthyle	18/200	Alphacyperméthrine + acétamipride	36/16
Emamectine benzoate	19,2	Betacyfluthrine + chlorpyriphos éthyle	7/200	Deltaméthrine + acétamipride	12/60
Diflubenzuron	480	Deltaméthrine + chlorpyriphos éthyle	12 /200	Betacyfluthrine + imidaclopride	45/100
		Indoxacarb + chlorpyriphos éthyle	25/300	Téflubenzuron + alphacyperméthrine	75/75
		Labdacyhalothrine + acétamipride + profenofos	60/32/600	Spinoteram + acétamipride	56/64
		Spinoteram + acétamipride	56/64	Bifenthrine + acétamipride	120/32
		Thiamethoxam + labdacyhalothrine	30/115	Buprofézine	250
		Lufénuron	50	Diafenthiuron	500
		Indoxacarb	150		
		Spinosad	480		

### 3. Sites d'étude

La résistance d'*An. gambiae s.l.* a été étudiée au cours d'un suivi longitudinal de 3 ans effectué de Juillet 2008 à Septembre 2010. Ce travail a été réalisé en quatre parties :

i) la première partie de l'étude s'est déroulée de Juillet 2008 à Septembre 2009 dans 28 sites repartis dans les trois faciès agro-climatiques couvrant les 3 pratiques culturales du cotonnier au Burkina Faso (figure 3):

- Zone de coton conventionnel : 14 sites
- Zone de coton transgénique *Bt* : 6 sites
- Zone de coton biologique : 4 sites.

ii) la deuxième partie de notre travail a porté sur la détection d'autres mécanismes de résistance précisément la mutation *kdr* L1014S déjà détectée chez *An. gambiae s.l.* dans plusieurs pays en Afrique notamment au Bénin, pays frontalier du Burkina Faso. La présence de cette mutation *kdr* L1014S a été investiguée dans des échantillons d'*An. gambiae s.l.* collectés en 2008 et provenant de dix sites cotonniers repartis dans les zones cotonnières de l'Ouest et du Centre Est indépendamment du type de coton qui y est produit. Il s'agit des sites suivants : Dano, Diébougou, Koubri, Koupéla, Fada, Orodara, Pô, Sidéradougou, Soumousso et VK7.

iii) la troisième partie de notre travail a porté sur l'étude de la résistance d'*An. gambiae s.l.* en zone urbaine, nous avons choisi pour exemple la ville de Bobo-Dioulasso (Dioulassoba et Kodené) où *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* vivent en sympatrie.

iv) la quatrième partie enfin pour étudier la multirésistance chez *An. gambiae s.l.* dans 10 sites choisis parmi les 28 sites retenus pour l'étude de la résistance entre 2008-2009. Toutefois, ces 10 sites ont été sélectionnés en ignorant le type de coton qui est produit mais en se basant sur l'appartenance aux zones cotonnières où la pression insecticide est l'une des plus élevée. Cette étude a été réalisée d'Août à Septembre 2010. Les différents sites sont : Banfora, Dédougou, Houndé, Koupéla, Nouna, Orodara, Samblatoukoro, Soumousso, Tiéfora et VK7.

Les sites où nous avons travaillé ont été tous géo-référencés avec les pratiques culturales en places et présentés dans le tableau II.

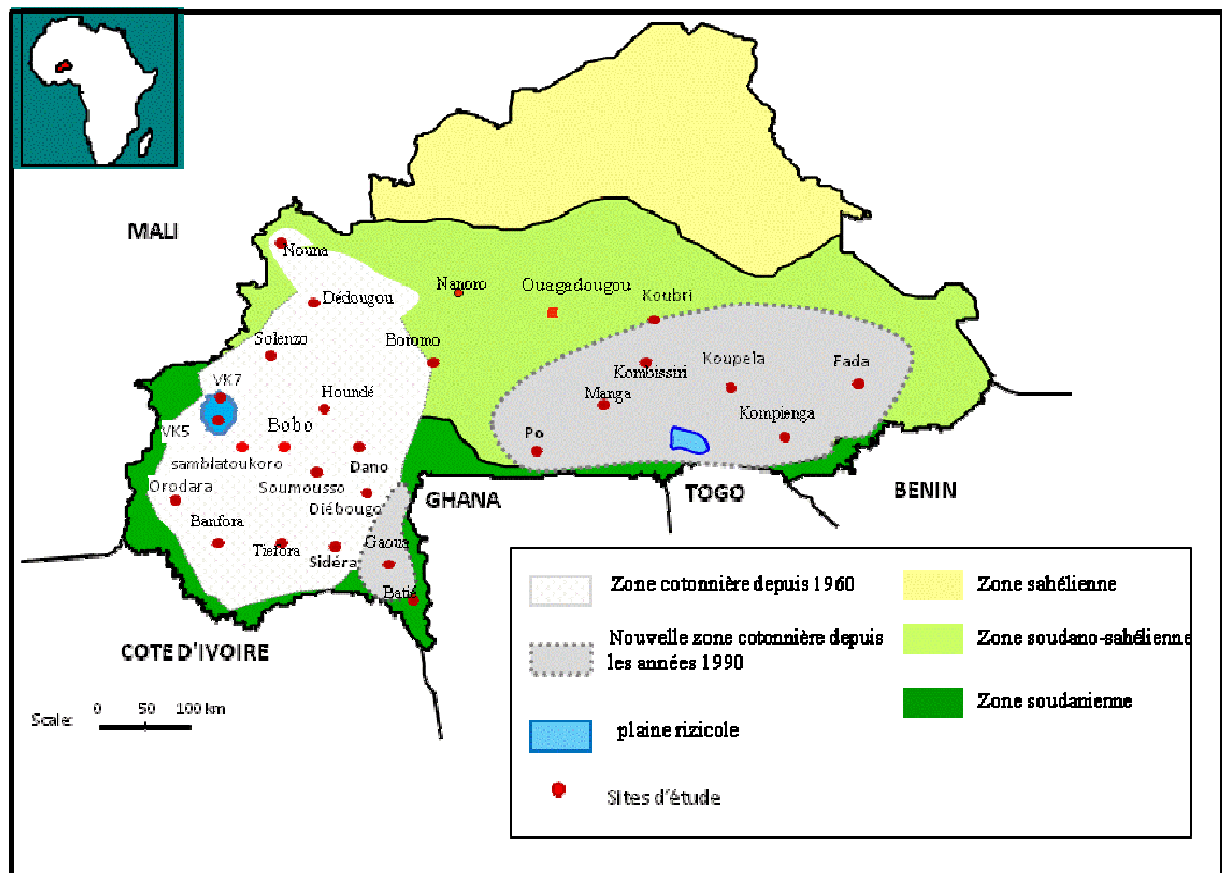


**Tableau II:** sites d'étude de la résistance avec leurs géoréférences et les pratiques agricoles

Zones climatiques	Sites	Géo-références	Production agricole
Zone soudanienne	Banfora	10°37'N, 4°45'W	Canne/Coton conventionnel
	Batié	9°27'N, 2°45'W	Vivrière/Coton conventionnel
	Dano	11°08'26"N, 3°03'50"W	Coton biologique
	Diébougou	10°58'N, 3°15'W	Coton conventionnel
	Dioulassobâ	11°11'N, 4°17'W	Maraîcher
	Gaoua	10°20'N, 3°11'W	Vivrière/Coton conventionnel
	Houndé	11°29'N, 3°31'W	Vivrière/Coton conventionnel
	Kuinima	11°11'N, 4°17'W	Maraîcher
	Samblatoukoro	11°25'N, 4°50'W	Bananaeraie/Coton conventionnel
	Orodara	10°97'N, 4°91'W	Fruitier/Coton conventionnel
	Sidéradougou	10°41'15"N, 4°15'45"W	Vivrière/Coton biologique
	Soumousso	11°01'46"N, 4°02'45"W	Coton conventionnel
	Tiéfora	10°38'1"N, 4°33'53"W	Vivrière/Coton biologique
	VK5	11°40'N, 4°41"W	Riz
VK7	11°40'N, 4°24"W	Riz/Coton conventionnel	
Zone soudano-sahélienne	Boromo	11°45'N, 0°52'W	Coton conventionnel
	Dédougou	12°28'N, 3°27'W	Coton conventionnel
	Fada	12°31'N, 0°21'E	Vivrière/Coton transgénique <i>Bt</i>
	Kombissiri	12°04'N, 1°21'3"W	Vivrière/Coton conventionnel
	Kompienga	11°25'N, 0°55'E	Vivrière/Coton transgénique <i>Bt</i>
	Komyanga	12°01'N, 0°41'E	Vivrière/Coton transgénique <i>Bt</i>
	Koubri	12°16'36"N, 1°38'69"W	Vivrière/Coton conventionnel
	Koupéla	12°11'N, 0°26'W	Vivrière/Coton transgénique <i>Bt</i>
	Manga	11°40'N, 1°05'W	Vivrière/Coton transgénique <i>Bt</i>
	Nanoro	12°27'N, 1°8'67"W	Vivrière
	Nouna	12°37'N, 3°55'W	Coton conventionnel
	Pô	11°10'N, 1°09'W	Vivrière/Coton biologique
	Solenzo	12°11'N, 4°05'W	Coton transgénique <i>Bt</i>

**Tableau III:** Superficie occupée par les pratiques culturales du cotonnier au Burkina Faso

Année		2007	2008	2009	2010
Coton conventionnel	Surface (ha)	580 500	565 000	465 500	130 500
	%	99	96	79	38
<b>Coton transgénique <i>Bt</i></b>	Surface (ha)	<b>0</b>	<b>15 000</b>	<b>115 000</b>	<b>450 000</b>
	%	<b>0</b>	<b>2.5</b>	<b>20</b>	<b>61</b>
Coton biologique	Surface (ha)	322	650	692	692
	%	< 1	< 1	< 1	< 1



**Figure 3:** Sites d'étude de la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides au Burkina Faso

#### 4. Echantillonnage des moustiques

Les larves d'*An. gambiae s.l.* ont été prélevées dans des gîtes situés dans les trois faciès agro-cultureaux. Entre 2008 et 2009, les différents sites d'étude ont été échantillonnés deux fois par saison agricole en fonction du calendrier des traitements des cultures : le premier round a été effectué avant le début des traitements insecticides (juillet) et le second à la fin des traitements (septembre). Cependant en 2010, un seul échantillonnage a été réalisé avant le début des traitements (tableau IV). La collecte des larves a été faite à l'aide d'une louche; les spécimens collectés ont été ensuite ramenés à l'insectarium de l'IRSS/Centre Muraz pour y être élevées jusqu'au stade adulte. Ces larves ont été nourries avec du TetraMinBaby® (aliment pour alevins). Les femelles adultes d'*An. gambiae s.l.* ont été séparées des autres culicidés par la clef de détermination morphologique de Gillies & Coetzee (1987). Les femelles d'*An. gambiae s.l.* âgées de 2 à 5 jours ont été utilisées pour les tests de sensibilité aux insecticides. Les moustiques testés aux insecticides (vivants et morts) ont été conservés dans du silicagel pour des analyses de biologie moléculaire d'identification spécifique du complexe *An. gambiae* et aussi pour les diagnostics des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>*. Par ailleurs en 2010, 80 spécimens triés de façon randomisée par site ont été conservés -80°C pour des analyses biochimiques.

#### 5. Tests de sensibilité aux insecticides

La sensibilité des populations d'*An. gambiae s.l.* a été testée avec les quatre familles d'insecticides utilisés en santé publique aux doses diagnostiques recommandées par l'OMS (WHO, 1998) (Figure 2). Il s'agit de :

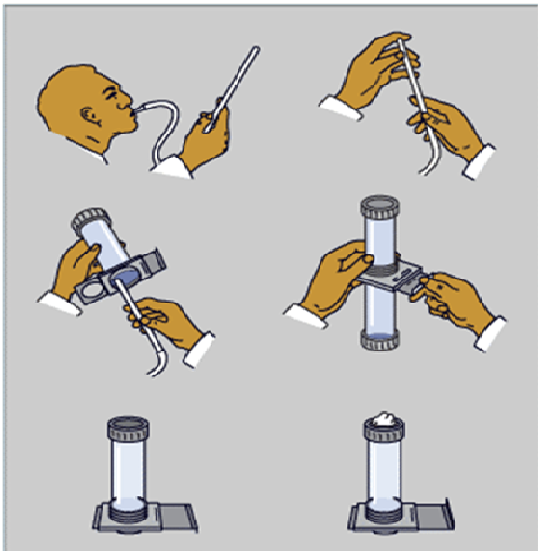
- deux pyréthrinoides (PY): la deltaméthrine 0.05% et la perméthrine 0.75% ;
- un organochloré (OC): le DDT 4% ;
- un carbamate (CX): le bendiocarb 0.1% ;
- deux organophosphorés (OP): le fénitrothion 0.1% et le chlorpyrifos-méthyl (CM) 0.4%.

A l'aide d'un aspirateur, 25 à 27 femelles âgées de 2 à 5 jours sont introduites dans un tube d'exposition tapissé de papier imprégné de l'insecticide à tester à la dose diagnostique. Pendant l'exposition à l'insecticide (1h) les moustiques assommés sont dénombrés à intervalles de temps réguliers de 5 minutes ou temps de *kd*. Après la période d'exposition, les moustiques sont à nouveau transférés dans les tubes d'observation pour une phase d'observation de 24h pendant laquelle elles sont nourries avec une solution de saccharose à 5%. Pour chaque test, 4 lots de moustiques ont été exposés à l'insecticide plus un lot témoin

exposé au papier contenant l'adjuvant qui a servi à l'imprégnation. Au terme de cette période d'observation post-exposition, les taux de mortalité dans les tubes témoin et tests ont été calculés. Lorsque la mortalité des témoins est inférieure à 5%, le test est validé, si elle est comprise entre 5 et 20%, la mortalité dans le lot traité est corrigée par la formule d'Abbott (1925). Si la mortalité des témoins est supérieure à 20%, le test est repris. Les taux de mortalité sont interprétés selon les critères proposés par l'OMS (WHO, 1998):

- mortalité < 80% = population résistante ;
- 80% < mortalité < 98% = résistance intermédiaire ;
- mortalité > 98% = population sensible.

$$\text{Mortalité corrigée} = \frac{\% \text{ de mortalité dans le lot exposé} - \% \text{ de mortalité dans le lot témoin}}{100 - \% \text{ de mortalité dans le lot témoin}}$$



**Méthode**

- femelles non-gorgées de 2-5 jours  
4 répliques (n=100)
- papiers imprégnés aux doses recommandées par l'OMS  
(Pemm 0.75%, Delta 0.05%, DDT 4%, Bendio 0.1%, CM 0.4%, Fénit 1%)

**Analyse**

- mortalité 24h plus tard
- seuil de sensibilité  
\*100-98%
- résistance intermédiaire (soupçonnée)  
à confirmer  
\* 98-80%
- résistance  
\* - 80%

Figure 4: Différentes étapes du test de sensibilité (WHO, 1998)

Tableau IV : Récapitulatif du nombre et des dates des tests réalisés dans les différents sites

Date	juil-08	sept-08	juil-09	sept-09	juil-10
Nombre de tests	73	69	77	67	37
Nombre de sites	24	20	19	20	10

## **6. Identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* et identification des formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.***

Les spécimens vivants et morts à l'issue des tests insecticides ont été identifiés par PCR à partir de l'ADN génomique extrait des moustiques pour caractériser les espèces d'*An. gambiae s.l.* à l'aide du protocole de Scott *et al.* (1993) et les formes moléculaires par le protocole de Favia *et al.* (2001). Trente à cinquante spécimens ont été analysés par localité, par date et par insecticide testé.

### **6.1. Détection des mutations *kdr* L1014F et *ace-1<sup>R</sup>***

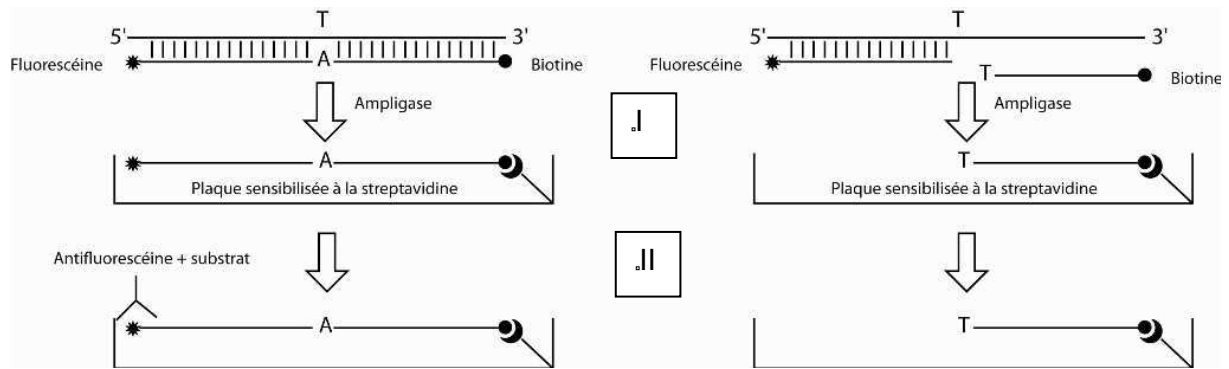
La détection des gènes de résistances impliqués dans la résistance aux insecticides a été également effectuée par PCR en appliquant le protocole de Martinez-Torres *et al.* (1998) pour la mutation *kdr* L1014F et celui de Weill *et al.* (2004) pour la mutation *ace-1<sup>R</sup>* G116S à partir des échantillons ayant déjà été identifiés pour les espèces et formes moléculaires.

### **6.2. Détection de la mutation *kdr* L1014S par la technique Hot Oligonucleotide Ligation Assay (HOLA)**

La technique HOLA décrite par Lynd *et al.* (2005) a été utilisée pour la détermination simultanée des allèles sensible (TTA, codant pour une Leucine), *kdr-Est* (TCA, codant pour une Sérine) et *kdr-Ouest* (TTT, codant pour une Phénylalanine) sur une dizaine de populations provenant de 10 sites par plaque de 96 puits (donc 96 spécimens par site).

#### ***Principe de la technique***

Deux oligonucléotides (détecteurs et rapporteurs) spécifiques de chacune des 2 mutations sont utilisés pour amplifier de la région de l'ADN entourant la mutation *kdr*. Les oligonucléotides sont marqués à la biotine à l'extrémité 5' pour les détecteurs et à la fluorescéine à l'extrémité 3' pour les rapporteurs. Le génotype est ensuite déterminé grâce à une réaction de ligation à chaud (58-60°C) entre les oligonucléotides détecteurs et les oligonucléotides reporteurs, une réaction de colorimétrie permet ensuite la lecture directe sur une microplaque préalablement traitée à la streptavidine (figure 4).

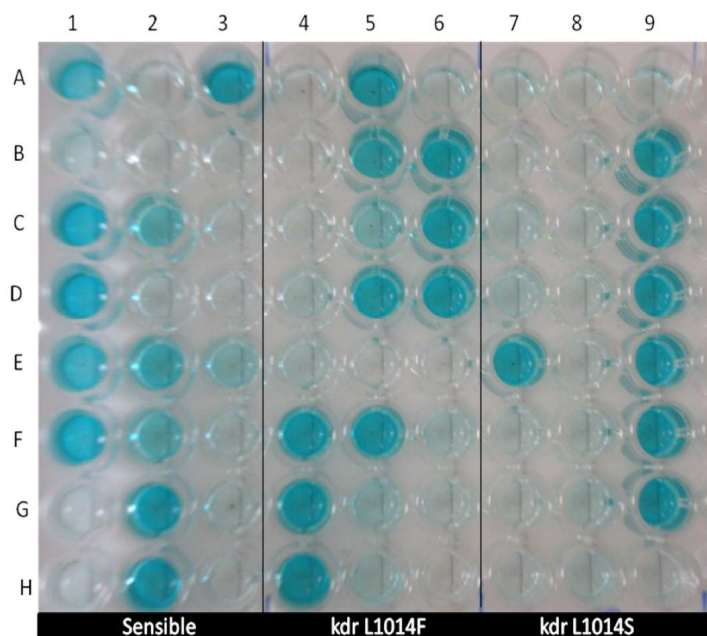


**Figure 5:** Technique HOLA. Le génotype est déterminé grâce à une ligation à chaud (58-60°C) en présence de l'ampligase, entre oligonucléotides détecteurs marqués à la biotine et oligonucléotides reporteurs marqués à la fluorescéine (I). Une réaction colorimétrique basée sur l'adjonction de l'anti-fluorescéine et du TMB (substrat) permet la lecture directe du génotype sur la microplaque de 96 puits préalablement traitée à la streptavidine (II).

### Interpretation

La plaque est scindée en trois parties pour l'identification des trois allèles *kdr*: 1014L, 1014F et 1014S. L'apparition de la coloration bleue à la fin de la réaction indique la présence d'un allèle :

- l'allèle 1014L est observé dans la partie notée sensible (sur la plaque)
- l'allèle 1014F est identifié dans la partie *kdr* L1014F
- l'allèle 1014S est identifié dans la partie *kdr* L1014S



**Figure 6 :** Génotypes de la mutation *kdr* obtenus par la technique HOLA.

**Moustiques 1A, 1C, 1D, 2E, 3A :** homozygotes sensibles Leu-Leu ;  
**Moustiques 1G, 1H, 2A, 2B, 2D :** homozygotes pour la mutation Leu-Phe ;  
**Moustiques 3F, 3G :** homozygotes pour la mutation Leu-Ser ;  
**Moustiques 1F, 2C, 2F :** hétérozygotes sensible/ mutation Leu-Phe ;  
**Moustiques 1E, 3E :** hétérozygotes sensible/ mutation Leu-Ser ;  
**Moustiques 3B, 3C, 3D :** hétérozygotes mutation Leu-Phe/ mutation Leu-Ser.

### 6.3. Caractérisation de la résistance métabolique

#### Principe

Le principe de cette technique biochimique est basé sur la réaction enzyme-substrat qui donne un produit final dont la révélation par un colorant indique l'activité enzymatique par lecture cinétique ou en point final. Les différentes colorations sont lues au spectrophotomètre à des longueurs d'ondes définies en fonction du substrat chromophore utilisé. L'activité des enzymes pour chaque individu testé est rapportée à la concentration en protéines pour cet individu. Les résultats de tous ces tests sont comparés à ceux obtenus en parallèle avec la souche sensible de référence, *An. gambiae* Kisumu maintenue en élevage à l'insectarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC).

#### Interprétation des résultats:

Les quantités d'enzymes dosées chez les spécimens sont calculées à partir de courbes étalons obtenues avec des concentrations connues en protéines.

#### *Les esterase*

La courbe étalon doit s'ajuster à une droite dont l'équation de la densité optique est :  $DO = ax+b$  où  $x$  est la quantité d'alpha-naphthol dans le puits, et  $a$  et  $b$  les constantes. A partir de cette droite, il est possible de déterminer la quantité  $\alpha$ -ou  $\beta$ -naphthol (en  $\mu\text{mol}$ ) produite par 10  $\mu\text{l}$  de broyat de moustique pendant 30 minutes (temps d'incubation).

#### *Les GSTs*

L'interprétation des données pour les GST fait appel au coefficient d'extinction molaire et à la loi de Beer (Hemingway, 1998):

$DO/\text{minute} = \epsilon cl = \text{coefficient d'extinction molaire} \times \text{concentration} \times \text{longueur d'onde de la solution}$ .  $\epsilon = 9,5$  pour le 1-chloro-2,4-Dinitrobenzene (CDNB) ;  $l = \text{profondeur du puits} = 0,6 \text{ cm}$  pour 210  $\mu\text{l}$  et  $c$  est la concentration molaire.

L'activité des GSTs  $x = c \times 210 \times 10^{-6}$  en mole ;  $x$  doit être rapporté à la quantité de protéines par puits c'est à dire pour 10  $\mu\text{l}$  de broyat.

#### *Le cytochrome P450*

La courbe étalon obtenue s'ajuste à la droite d'équation :  $DO = ax+b$  où  $x$  est la quantité de cytochrome P450 et  $a$  et  $b$  les constantes. A partir de cette courbe il est possible de déterminer la quantité de cytochrome P450 unités équivalentes (en nmol) produite par 20 l de broyat de

chaque moustique. Cette transformation est généralement faite automatiquement par les logiciels fournis avec le spectrophotomètre.

### **7. Analyses statistiques des données**

Pour chaque système enzymatique, l'activité moyenne a été comparée entre les populations collectées et la souche de référence *An. gambiae* Kisumu. La comparaison a été faite à partir du logiciel GraphPad en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Whitney. Ce test est choisi lorsque l'on désire comparer des moyennes observées sur plusieurs échantillons. La valeur de  $P < 0.05$  a été retenue comme seuil de significativité à 95% d'intervalle de confiance. La fréquence allélique de chaque mutation (*kdr* et *ace-1<sup>R</sup>*) au sein de l'échantillon  $(RR + RS) / (RR + RS + SS)$  suivant la formule  $F(R) = (2RR + RS) / 2n$  avec  $n$  = effectif total de la population. Le logiciel GenePop (version 4) a été utilisé dans le calcul de la probabilité exacte de rejet de l'équilibre d'Hardy-Weinberg.



# RESULTATS

# Chapitre 1: Situation de la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides en zones cotonnières dans les régions soudanienne et soudano-sahélienne à l'Ouest et au Centre-Est du Burkina Faso

## 1.1. Introduction

Le coton transgénique *Bt* a été adopté comme nouvelle pratique agricole au Burkina dans le but d'augmenter les rendements tout en réduisant les quantités d'insecticides et leurs fréquences d'utilisation dans le traitement des cultures de coton. Le coton biologique qui utilise exclusivement des fertilisants et des insecticides biologiques a été introduit depuis 2004 dans certaines régions. L'adoption de ces deux pratiques innovantes à utilisation réduite d'insecticide pourrait baisser la pression insecticide et contribuer à la restauration du niveau de sensibilité aux insecticides chez *An. gambiae s.l.*, vecteur majeur de paludisme en Afrique. Pour vérifier cette hypothèse nous avons conduit une étude longitudinale de Juillet 2008 à Septembre 2009 dans ces faciès cotonniers (conventionnel, *Bt* et biologique) pour : i) évaluer le niveau de résistance des populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* aux quatre classes d'insecticides homologués en santé publique pour la lutte antivectorielle (pyréthrinoides, organochlorés, organophosphorés et carbamates) ii) estimer la fréquence allélique et la distribution géographique de la mutation *kdr* L1014F, principal mécanisme impliqué dans la résistance croisée d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoides et au DDT et enfin iii) étudier l'évolution de cette mutation depuis l'introduction de ces nouvelles pratiques cotonnières en vue d'estimer une tendance quant à leur impact sur la gestion de la résistance des populations d'*An. gambiae s.l.* qui est largement tributaire du degré d'utilisation des insecticides en protection des végétaux.

## 1.2. Matériels et Méthodes

Les tests de sensibilité aux insecticides ont été réalisés par le protocole en tube OMS et à partir des femelles d'*An. gambiae s.l.* provenant des sites d'étude des cotons biologique, conventionnel et transgénique (*Bt*) repartis dans les différentes régions cotonnières du Burkina (voir sites d'études dans Matériels & Méthodes). Les insecticides retenus sont le DDT4% comme organochloré, la perméthrine 0.75% et la deltaméthrine 0.05% pour les PYs, le bendiocarb 0.1% pour les CXs et le chlorpyriphos méthyl (CM) 0.4% pour les OPs. La mutation *kdr* L1014F a été caractérisée par PCR en utilisant le protocole de Martinez-Torres *et al.* (1998) après avoir identifié les espèces d'*An. gambiae s.l.* et les formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.* respectivement par les protocoles de Scott *et al.* (1993) et de Favia *et al.*

(2001). Les fréquences alléliques de la mutation *kdr* issues de ces populations testées (vivants et morts) ont été comparées par faciès cotonnier (conventionnel, bio et *Bt*) et par zone agro-climatique: zone soudanienne et soudano-sahélienne (voir détails des protocoles dans la section Mat & Méth).

### 1.3. Résultats

#### 1.3.1. Composition spécifique des vecteurs (*An. gambiae s.l.*) et leur répartition géographique

##### En 2008

Au total 1312 *An. gambiae s.l.* ont été analysés en PCR pour l'identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* La forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* a été trouvée majoritaire, quasi-dominante à Orodara et à Batié à l'Ouest et au Sud-Ouest du pays à des proportions de plus de 95%. Elle est suivie par la forme moléculaire M qui est certes présente dans cette zone mais à de moindres proportions excédant rarement 25% sauf dans les sites rizicoles VK5 et VK7 où elle a été trouvée à des fortes proportions de 94% et 98% respectivement. *An. arabiensis* a été trouvée seulement dans quelques sites à des proportions assez faibles de 2.8% et de 2.7% respectivement dans les sites de Tiéfora et de Diébougou. Ailleurs dans cette zone la proportion de cette espèce n'a pas dépassé 1%.

En zone soudano-sahélienne, il a été observée une remarquable présence de la forme S dans les sites juxtaposant les limites de la zone soudanienne mais aussi au Centre et à l'Est du pays à des fréquences élevées variant entre 92% à Kompienga et 50% à Nouna. La forme M prédominait au Centre Nord et au Sud du pays à Dédougou, Pô, Solenzo et Nouna tandis que dans la plupart des sites de cette zone elle cohabitait majoritairement avec *An. arabiensis*. Dans le site de Nanoro, qui est une zone vivrière située au centre du pays, les deux formes moléculaires M et S vivent en sympatrie avec une prédominance de la forme M (45.65% vs 19.5%) et *An. arabiensis* (34.78%).

##### En 2009

Au total, 1084 *An. gambiae s.l.* ont été analysés en PCR dont 51.7% étaient de la forme moléculaire S, 33.5% de la forme moléculaire M et 14.66% de l'espèce *An. arabiensis*. Leur répartition dans les différents faciès agro-climatiques indiquait que la forme S prédominait dans la zone soudanienne avec en moyenne 61% la plus forte proportion étant obtenue à Batié avec 97.5% suivie de la forme M avec 27.3% majoritaire dans les sites rizicoles de la Vallée du Kou avec 94% et 98% respectivement à VK7 et VK5. *An. arabiensis* ne représentait que

11.6% et n'était trouvé que dans 4 sites à de très faibles proportions variant entre 2 et 9,7%, excepté les sites urbains de Bobo-Dioulasso. Le fait nouveau est la forte présence d'*An. arabiensis* dans les zones urbaines de Dioulassoba et Kuinima à Bobo-Dioulasso où nous avons noté une percée cette espèce à des proportions exceptionnelles de 70.27% et de 73.68% (à Dioulassoba et Kuinima respectivement) comparée aux sites de la même zone climatique (la résistance d'*An. arabiensis* fera l'objet d'une étude consacrée au chapitre 3).

En zone soudano-sahélienne c'était plutôt la forme M qui prédominait avec en moyenne 47% avec les plus fortes proportions observées au Centre et au Centre-Nord où cette forme atteignait entre 50 et 67% à Boromo, Nouna, Nanoro et Manga. Elle était suivie de la forme S qui atteignait en moyenne 31.9% avec les plus fortes concentrations au Centre-Est et à l'Est où la plus forte proportion de 71.7% a été enregistrée à Kombissiri. *An. arabiensis* représentait globalement 21.1% avec ses plus fortes concentrations au Centre-Nord où des proportions relativement élevées ont été observées respectivement 32%, 33% et 52.8% à Nanoro, Nouna et Dédougou.

Globalement au cours des deux années de collecte, la répartition des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* et d'*An. arabiensis* a été observée suivant un gradient Nord Ouest où la forme moléculaire S a été la plus prédominante à l'Ouest du pays et vivant en relative égale proportion avec la forme M à la limite de la zone soudanienne. La forme M prédominait dans les autres sites de la zone soudano-sahélienne suivie d'*An. arabiensis* surtout dans les localités du Centre (Koubri, Nanoro, Kombissiri) où elle a été trouvée en forte proportion (tableau V).

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

Sites	Géo- références	Production agricole	2008								2009								2008&2009								Zones climatiques
			Forme S			Forme M			<i>arabiensis</i>		Forme S			Forme M			<i>arabiensis</i>		Forme S			Forme M			<i>arabiensis</i>		
			Nb	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	Nb	%	Nb	%	Nb	%				
Banfora	10°37'N, 4°45'W	Canne/Coton	78	72	92.3	6	7.69	0	0	79	45	56.96	13	16.45	21	26.58	157	117	74.52	19	12.1	21	13.37	Soudanien			
Batié	9°27'N, 2°45'W	Vivrière/Coton	38	38	1	0	0	0	0	80	78	97.5	0	0	2	2.5	118	116	98.3	0	0	2	1.69				
Dano	11°08'26"N, 3°03'50"W	Coton	40	37	92.5	3	7.5	0	0	67	41	61.19	25	37.31	1	1.49	107	78	72.89	28	26.16	1	0.93				
Diébougou	10°58'N, 3°15'W	Coton	74	67	90.54	5	6.75	2	2.7	71	60	84.5	4	5.63	7	9.85	145	127	87.58	9	6.2	9	6.2				
Houndé	11°29'N, 3°31'W	Vivrière/Coton	40	29	72.5	10	25	1	2.5	-	-	-	-	-	-	-	40	29	72.5	10	25	1	2.5				
Dioulassoba	11°11'N, 4°17'W	Maraîcher	-	-	-	-	-	-	-	37	8	21.62	3	8.1	26	70.27	37	8	21.62	3	8.1	26	70.27				
Gaoua	10°20'N, 3°11'W	Vivrière/Coton	40	36	90	4	10	0	0	39	35	89.74	4	10.25	0	0	79	71	89.87	8	10.12	0	0				
Kuinima	11°11'N, 4°17'W	Maraîcher	-	-	-	-	-	-	-	38	10	26.31	0	0	28	73.68	38	10	26.31	0	0	28	73.68				
Orodara	10°97'N, 4°91'W	Fruitier/Coton	78	76	97.43	2	2.56	0	0	34	31	91.17	3	8.82	0	0	112	107	95.53	5	4.46	0	0				
Sidéradougou	10°41'15"N, 4°15'45"W	Vivrière/Coton	77	74	96.1	3	3.89	0	0	72	38	52.77	34	47.22	0	0	149	112	75.16	37	24.83	0	0				
Soumouso	11°01'46"N, 4°02'45"W	Coton	76	53	69.73	23	30.26	0	0	75	67	89.33	8	10.66	0	0	151	120	79.47	31	20.52	0	0				
Tiéfora	10°38'1"N, 4°33'53"W	Vivrière/Coton	35	25	71.42	9	25.71	1	2.85	41	35	85.36	5	12.19	1	2.43	76	60	78.94	14	18.42	2	2.63				
VK5	4°23'41"N, 11°24'13"W	Riz	43	0	0	43	1	0	0	36	2	5.55	34	94.44	0	0	81	2	2.46	79	97.53	0	0				
VK7	4°24'42"N, 11°23'14"W	Riz/Coton	77	0	0	77	1	0	0	70	1	1.42	69	98.57	0	0	147	1	0.68	146	99.31	0	0				
Boromo	11°45'N, 0°52'W	Coton	40	34	85	5	12.5	1	2.5	39	5	12.82	26	66.66	8	20.51	79	39	49.36	31	39.24	9	11.39		Soudano-sahélien		
Dédougou	12°28'N, 3°27'W	Coton	67	27	40.29	29	43.28	11	16.41	39	4	10.25	14	35.89	21	53.84	106	31	29.24	43	40.56	32	30.18				
Fada	12°31'N; 0°21'W	Vivrière/Coton	38	29	76.31	7	18.42	2	5.26	65	36	55.38	29	44.61	0	0	103	65	63.1	36	34.95	2	1.94				
Kombissiri	12°04'N, 1°21'3W	Vivrière/Coton	75	27	36	14	18.66	34	45.33	39	28	71.79	3	7.69	8	20.51	114	55	48.24	17	14.91	42	36.84				
Kompienga	11°25'N, 0°55'W	Vivrière/Coton	37	34	91.89	1	2.7	2	5.4	-	-	-	-	-	-	-	37	34	91.89	1	2.7	2	5.4				
Koubri	12°16'36"N, 1°38'69"W	Vivrière/Coton	37	3	8,1	16	43.24	18	48.64	-	-	-	-	-	-	-	37	3	8,1	16	43.24	18	48.64				
Koupéla	7°22'27"N, 5°45'54"W	Vivrière/Coton	49	33	67.34	15	30.61	1	2.04	48	13	27.08	26	54.16	9	18.75	97	46	47.42	41	42.26	10	10.3				
Manga	11°40'N, 1°05'W	Vivrière/Coton	38	25	65.78	12	31.57	1	2.63	39	17	43.58	20	51.28	2	5.12	77	42	54.54	32	41.55	3	3.89				
Nanoro	12°27'N, 1°8'67"W	Vivrière	46	9	19.56	21	45.65	16	34.78	37	7	18.91	18	48.64	12	32.43	83	16	19.27	39	46.98	28	33.73				
Nouna	12°37'N, 3°55'W	Coton	76	40	52.63	27	35.52	9	11.84	39	0	0	26	66.66	13	33.33	115	40	34.78	53	46.08	22	19,13				
Pô	44°58'12"N, 12°32'49"W	Vivrière/Coton	41	2	4.87	35	85.36	4	9.75	-	-	-	-	-	-	-	41	2	4.87	35	85.36	4	9.75				
Solenzo	12°11'N, 4°05'W	Coton	72	27	37.5	36	50	9	12.5	-	-	-	-	-	-	-	72	27	37.5	36	50	9	12.5				

### 1.3.2. Résistance aux DDT et pyréthrinoides

#### 1.3.2.1. Au DDT 4%

Les résultats des tests de sensibilité réalisés entre 2008 et 2009 montrent une résistance d'*An. gambiae* au DDT 4% dans tous nos sites d'étude avec des taux de mortalité compris entre 70% et moins de 10% largement au-dessous du seuil de 80% à l'exception de deux sites, Dédougou et Koubri (figures 7a,b,c,d). Dans ces deux sites, en 2008, les taux de mortalité observés étaient respectivement de 82% et de 85% indiquant ainsi une résistance intermédiaire (figure 7a). Par contre en 2009, la résistance observée au DDT 4% s'est généralisée avec des taux de mortalité compris entre 5% et 77% et ce quelque soit le site d'étude et le type de culture de coton en place (figure 7a).

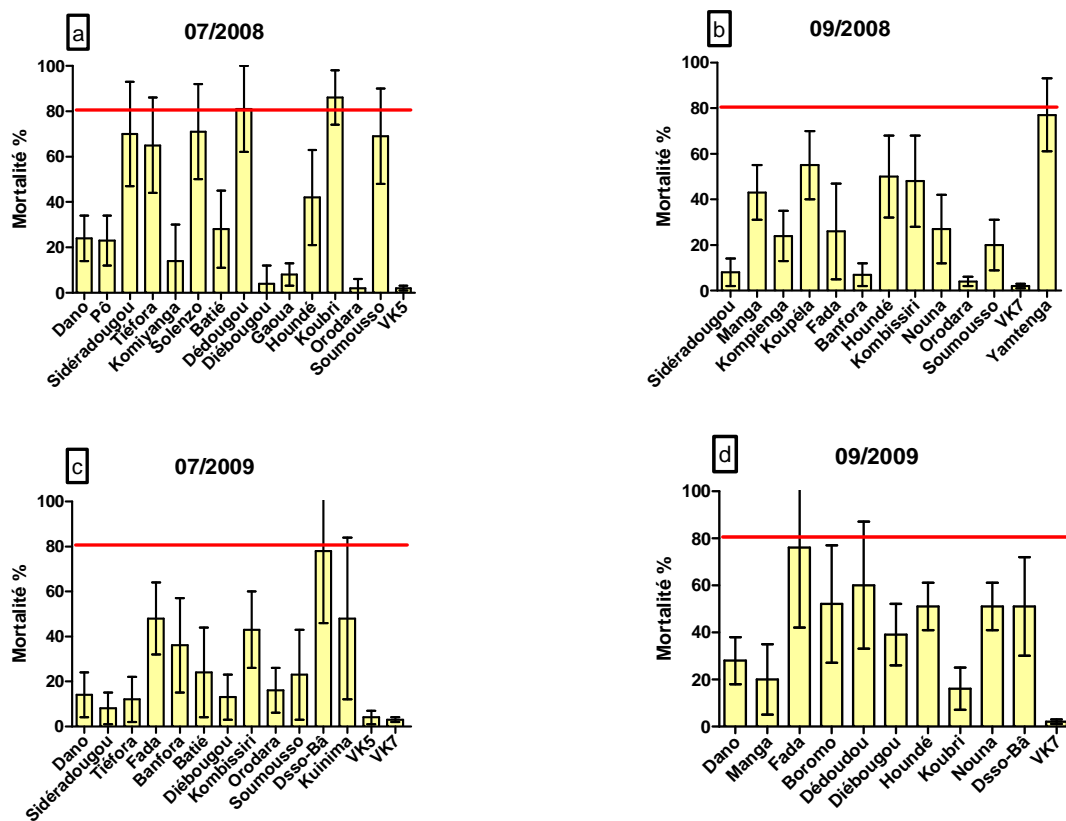


Figure 7: Taux de mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* au DDT 4%

#### 1.3.2.2. Aux pyréthrinoides

##### - A la perméthrine 0.75%

Le niveau de sensibilité des populations d'*An. gambiae s.l.* à la perméthrine 0.75% en Juillet 2008 était relativement bas dans l'ensemble variant entre 18% et 58% à l'exception de 6 sites (Sidéradougou, Banfora, Dédougou à l'Ouest et Nord-Ouest et Koubri, Manga Koupéla au

Centre du pays) où le taux de mortalité était au-dessus du seuil de 80% (figure 8a). Mais dès le second test et ce jusqu'en Septembre 2009, les taux de mortalité ont drastiquement baissé avec un niveau de résistance allant de moins de 10% à 60% et ce quelque soit le site (figure 8c,d) et le type de coton en présence (figure 8b).

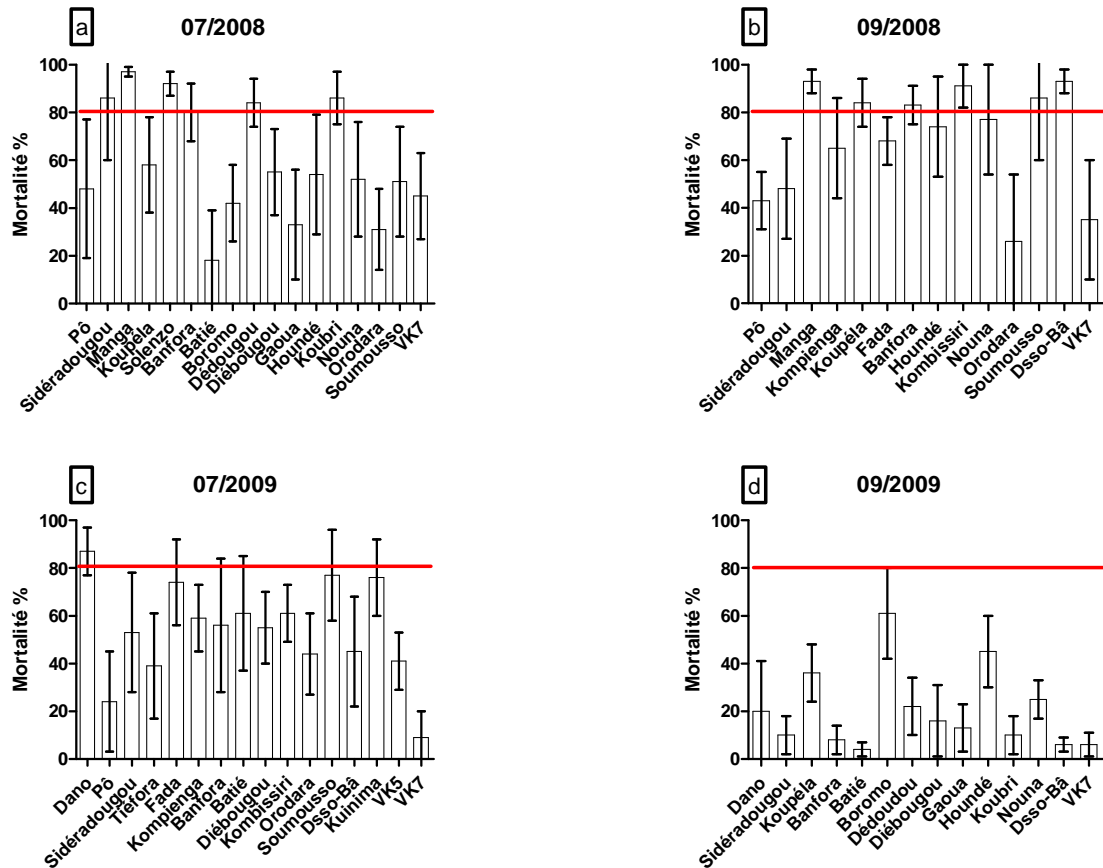
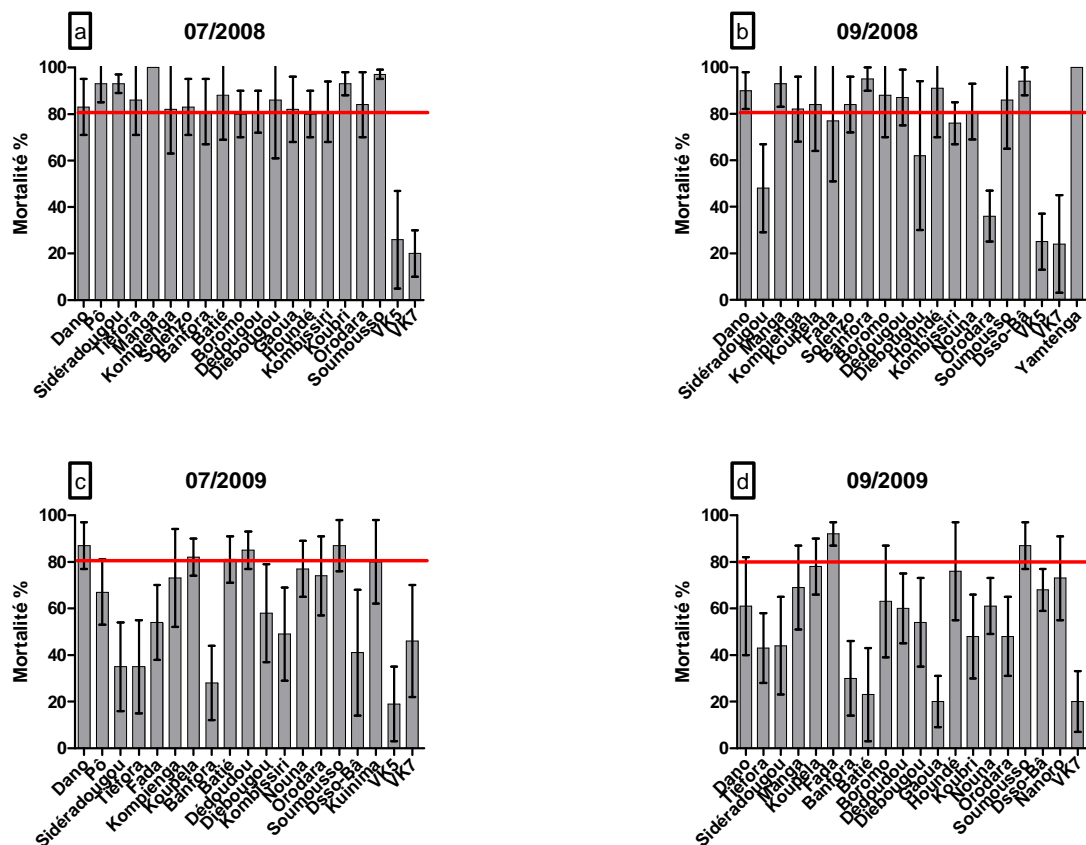


Figure 8 : Taux de mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* à la perméthrine 0.75%

#### - A la deltaméthrine 0.05%

Les taux de mortalité à la deltaméthrine 0.05% étaient assez élevés variant entre 80% et 100% dans la plupart des sites en juillet 2008 indiquant une sensibilité totale à intermédiaire, à l'exception des populations d'*An. gambiae* de VK5 et VK7 (figure 9a). Dans ces deux sites les taux de mortalité étaient très bas autour de 20% indiquant une très forte résistance d'*An. gambiae s.s.* à la deltaméthrine 0.05%. Une forte baisse de sensibilité a été ensuite observée au cours des trois derniers prélèvements pour afficher une situation globale de résistance à cette molécule avec des taux de mortalité en deçà de 80% sauf à Soumoussou à l'Ouest et à Koupéla au Centre-Est où la résistance restait toujours intermédiaire (avec 85% et 90% respectivement) (figures 9c,d). En comparant les types de cotons, aucune différence n'a été

observée entre ces pratiques et le résultat final indique qu'au bout de deux ans de suivi, les populations d'*An. gambiae s.l.* montraient plutôt un niveau de résistance qui s'est même accentué au cours du temps. Les zones jadis sensibles ont montré une baisse très nette de sensibilité qui est désormais sous la barre de 80% (seuil de résistance opérationnelle) (figure 9c).



**Figure 9 :** Taux de mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* à la deltaméthrine 0.05%

En comparant le niveau de résistance aux pyréthrinoides par zone climatique, il apparaît que les sites de l'Ouest en zone soudanienne affichent les plus faibles taux de mortalité aux deux molécules (figures 14b,c). Même si la situation générale indique une résistance généralisée dans toutes les zones climatiques, le niveau de résistance est plus accentué à la perméthrine qu'à la deltaméthrine 0.05% où les taux de mortalité sont majoritairement entre 50 et 85% vs < 50% pour la perméthrine 0.75% avec une résistance confirmée pour les deux molécules en zone soudanienne (figure 14b,c).

L'évolution de cette résistance sur les deux ans de suivi indique pour les deux pyréthrinoides une augmentation drastique de la résistance entre Juillet 2008 et Septembre 2009 avec des

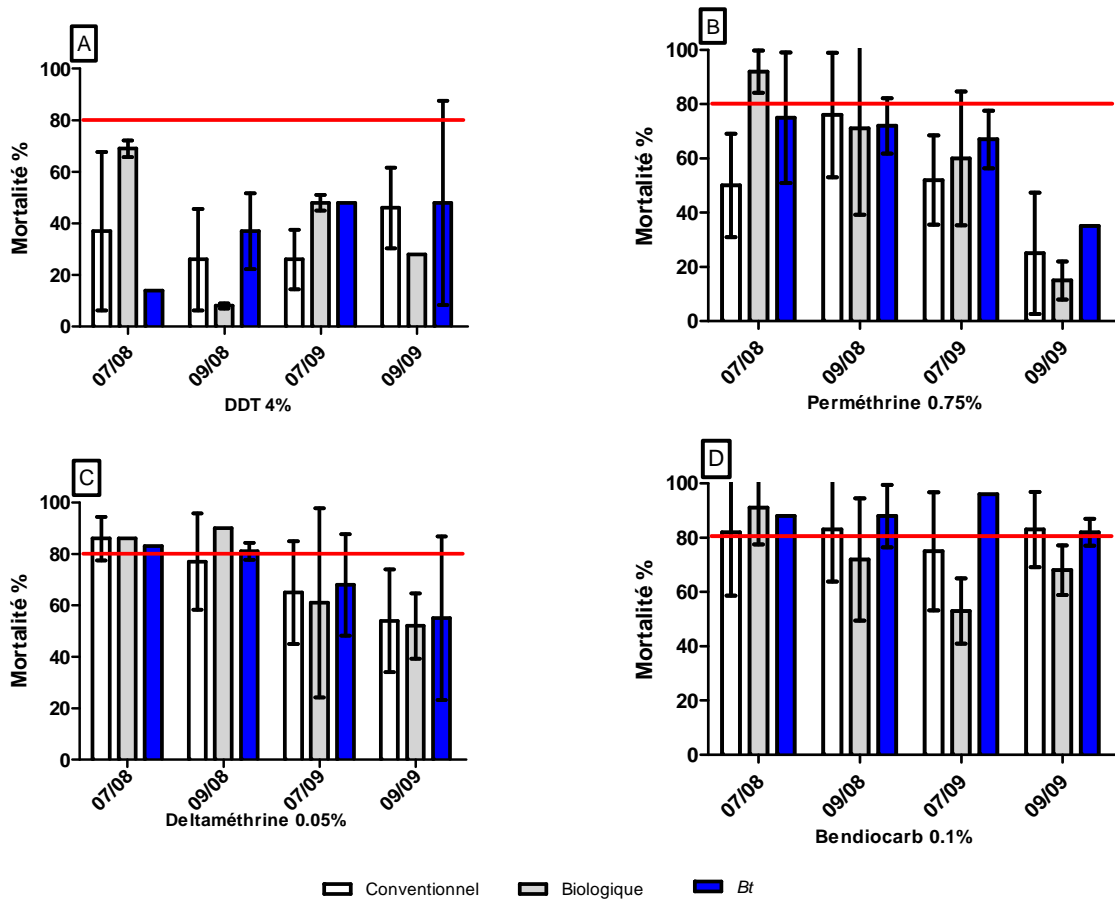


taux de mortalité de moins de 20% pour la perméthrine et de 50% pour la deltaméthrine en zone soudanienne. Elle est aussi critique en zone soudano-sahélienne où en définitive en 2009, le niveau de résistance était aussi élevé atteignant <40% pour la perméthrine et 70% pour la deltaméthrine. Comparant l'évolution de la résistance au DDT 4% les niveaux de résistance étaient autour de 40 et 50% respectivement en zones soudanienne et soudano-sahélienne cependant avec un petit regain de sensibilité de 10% en zone soudanienne (figure 14a).

En analysant l'évolution de la résistance aux PYs par type de culture de coton, il ressort que la situation est similaire à celle décrite par zone climatique avec une augmentation drastique de la résistance à la perméthrine et à la deltaméthrine respectivement à des taux de mortalité finaux en 2009 de <40% et <60% et ce quelque soit le type de coton mis en place (figure 10). Dans le cas du DDT, on peut tout de même observer un regain de sensibilité progressif dans les faciès coton transgénique *Bt* entre Juillet 2008 et Septembre 2009 tandis que la tendance variait en dent de scie avec les deux autres types de coton (figure 10a).

L'évolution de la résistance au bendiocarb de Juillet 2008 en Septembre 2009 indique une baisse légère de la sensibilité dans le faciès soudano-sahélien mais toujours à l'intérieur de la marge de sensibilité sauf pour le faciès soudanien où le seuil initial était déjà légèrement en-deçà de 80% (figure 15). Dans cette zone soudanienne le niveau de sensibilité obtenu à la fin de l'étude présentait une résistance à cette molécule avec un taux de mortalité globale légèrement en dessous de 80% (figure 15d).

Comparant l'évolution de la résistance par type de coton, la tendance était très similaire à celle décrite pour les zones climatiques où le niveau de sensibilité était toujours acceptable en zone *Bt* et bio avec une baisse de sensibilité dans le faciès coton conventionnel en deçà du seuil de 80% (figure 11). Ces sites de coton conventionnel où la résistance au bendiocarb est observée sont tous situés en zone soudanienne.



**Figure 10 :** Taux de mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides en fonction des faciès cotonniers du Burkina Faso

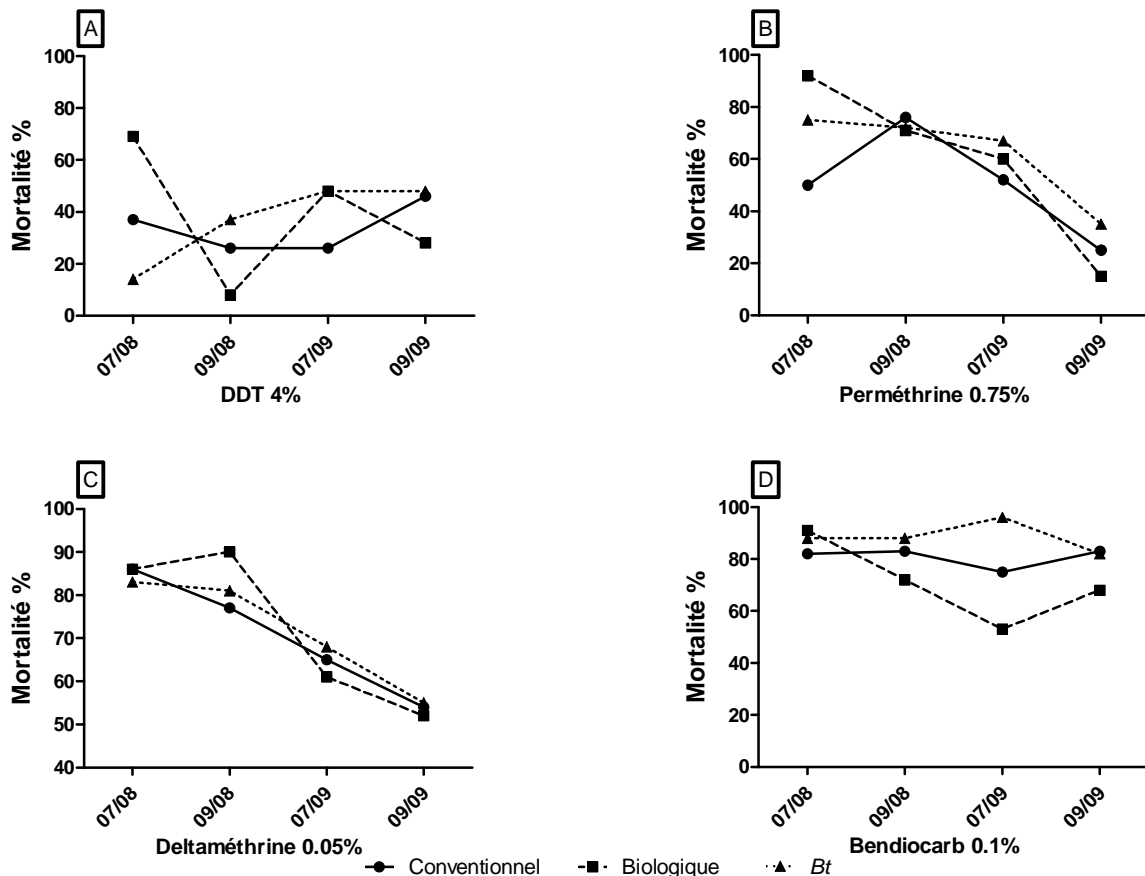


Figure 11 : Dynamique de la résistance aux insecticides chez des populations d'*An. gambiae s.l.* en fonction des faciès cotonniers du Burkina Faso

### 1.3.3. La sensibilité d'*An. gambiae s.l.* aux OP/CX

#### 1.3.3.1. Au bendiocarb 0.1%

En Juillet 2008, le niveau de sensibilité des populations d'*An. gambiae s.l.* au bendiocarb 0.1% a été le plus souvent au-dessus du seuil de 80% avec des taux de mortalité atteignant 98-100% dans plus de 10 sites surtout ceux situés au Centre et à l'Est du pays (en zone soudano-sahélienne) (figure 12).

En zone soudanienne, une résistance a été observée très tôt à cette molécule à Orodara avec moins de 20% de mortalité mais aussi dans la plupart des sites de l'Ouest du pays avec des taux de mortalité inférieurs à 80% rapportés dans cinq sites dont Batié, Dano, Diébougou, Gaoua et Orodara (figure 12a). Au dernier test en Septembre 2009, une extension de la résistance a été observée dans d'autres sites de l'Ouest du pays tels Banfora, Dano, Orodara, Tiéfora, Sidéradougou, Solenzo, et Soumousso (figure 12d). La situation dans les autres sites en zone soudano-sahélienne montrait par contre un niveau de sensibilité intermédiaire à totale

avec des mortalités allant de 80 à 100% et ce quelque soit la pratique culturale de coton en place (figure 12).

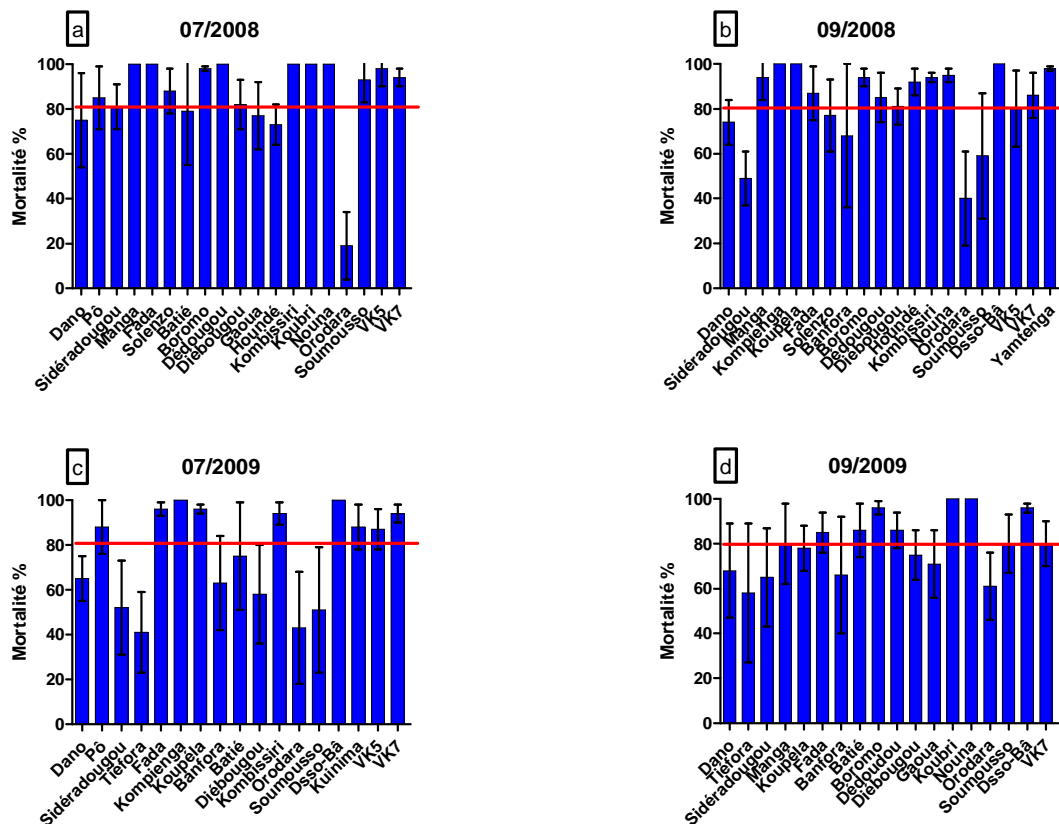


Figure 12 : Taux de mortalité d'*An. gambiae s.l.* observés avec le bendiocarb 0.1%

### 1.3.3.2. Au chlorpyriphos méthyl (CM)

Les taux de mortalité observés avec cette molécule ont révélé que dans tous les sites d'étude, les populations d'*An. gambiae s.l.* étaient totalement sensibles au CM 0.4% avec des taux de mortalité compris entre 98% et 100% et ce quelque soit le type de coton cultivé et la zone agro-climatique (figure 13).

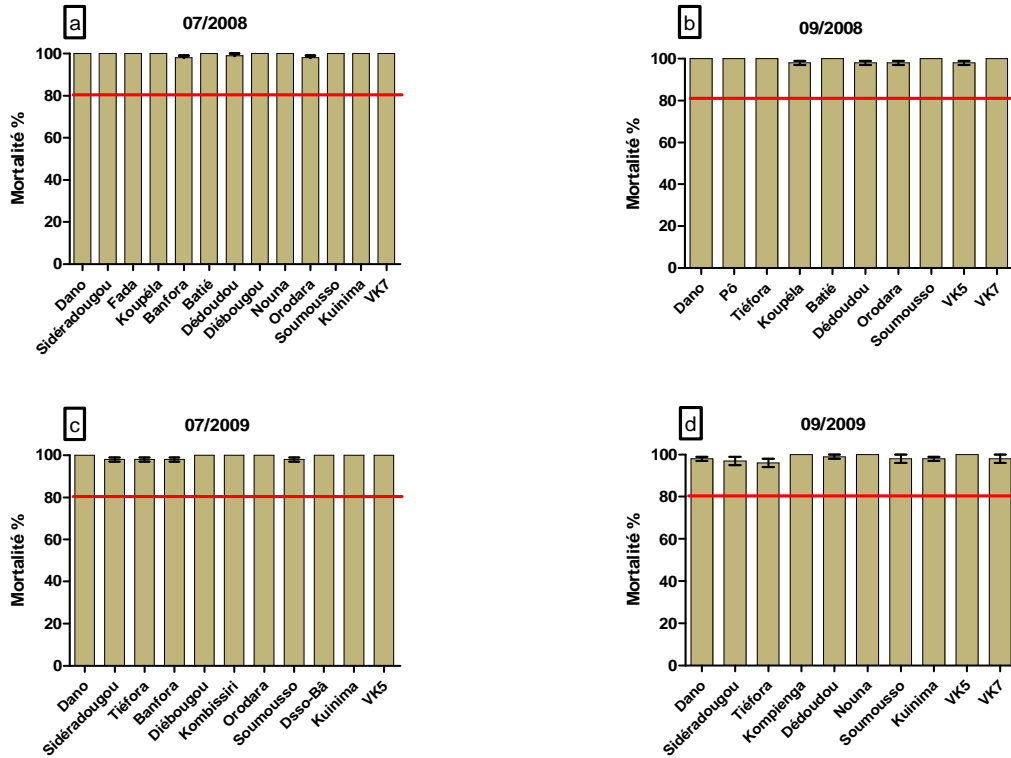


Figure 13 : Taux de mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* au CM 0.4%.

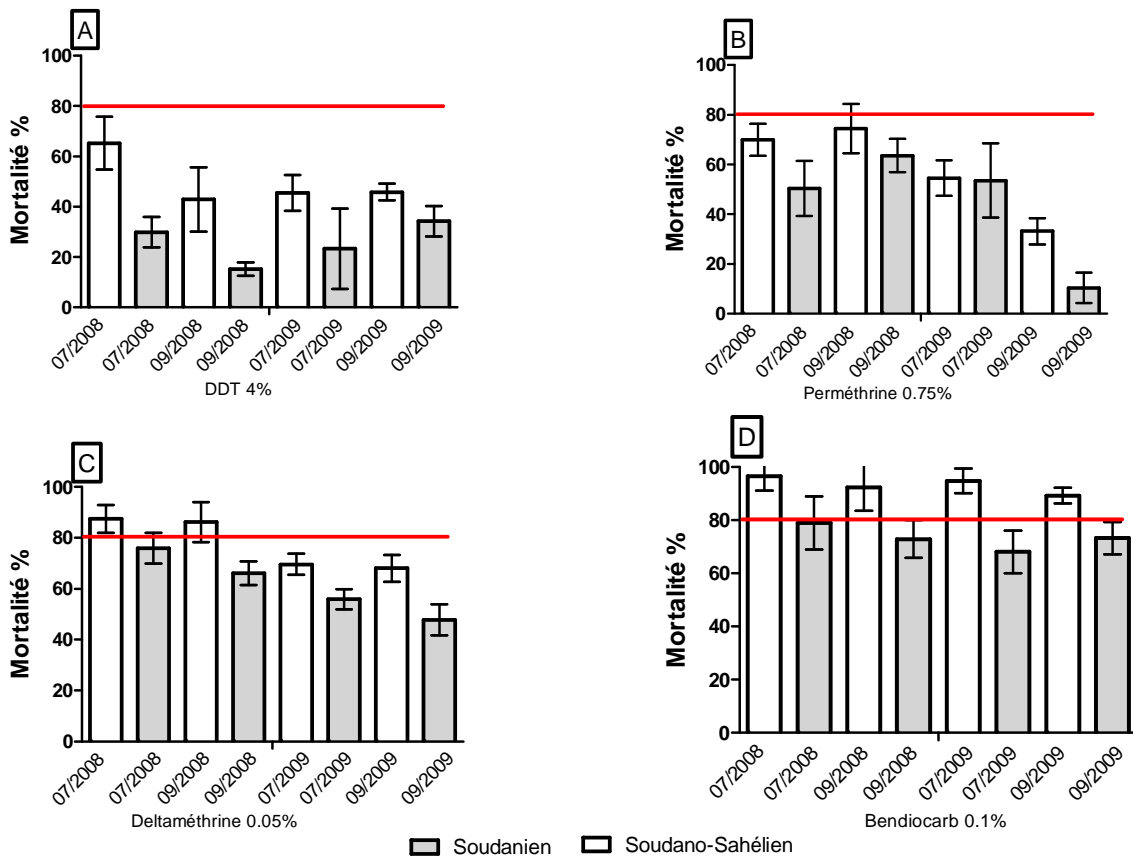
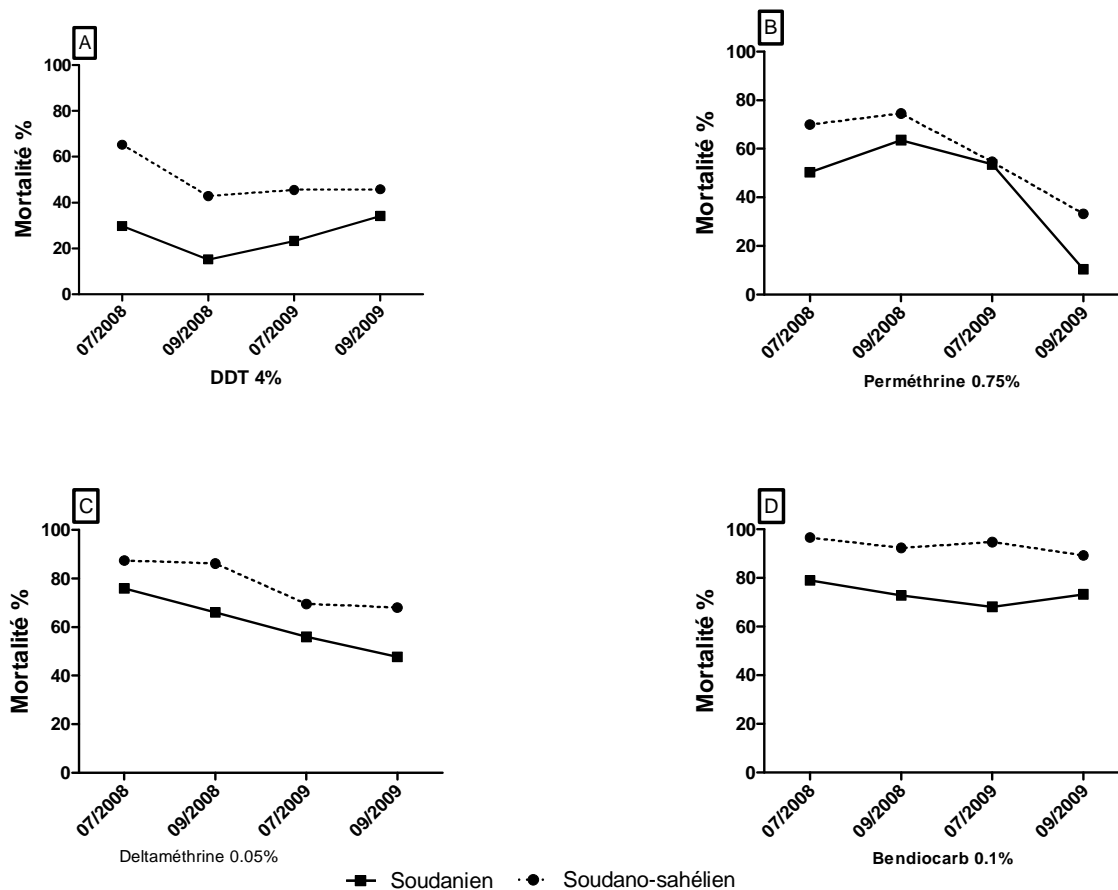


Figure 14 : Taux de mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides en fonction des faciès agro-climatiques du Burkina Faso



**Figure 15 :** Dynamique de la résistance aux insecticides chez des populations d'*An. gambiae s.l.* en fonction des zones écologiques

### 1.3.4. La distribution géographiques des fréquences alléliques de la mutation *kdr* L1014F

#### En 2008

La mutation *kdr* L1014F a été observée à des fréquences variant entre les espèces et les formes moléculaires (tableau VI). Elle était plus élevée chez la forme S d'*An. gambiae s.s.* indépendamment des zones climatiques ( $\chi^2 = 73.41$ , ddl = 1,  $P < 0.000001$ ) (figure 17). Dans la zone soudanienne, la mutation *kdr* L1014F a été observée en fréquence plus élevée chez la forme S atteignant des valeurs  $>90\%$  dans la plupart des sites à l'Ouest du pays tels Orodara, Banfora, Sidéradougou, Tiefora et Houndé. C'est à Gaoua et à Dano au Sud-Ouest que les fréquences ont été relativement plus faibles chez cette forme avec respectivement 31% et 63%. Chez cette forme S, le *kdr* L1014F a été toujours trouvé à des fréquences significativement plus élevées que celles de la forme M dans cette zone ( $\chi^2 = 37.39$ , ddl = 1,  $P < 0.000001$ ) sauf dans les sites rizicoles de VK5 et VK7 où elles étaient aussi élevées que celles de la forme S. De même elle a été trouvée à des fréquences similaires de celle de la forme M à Soumousso et Sidéradougou même si pour ces deux dernières localités la taille

d'échantillons analysés pour les spécimens de la forme M a été très faible. Aucun *An. arabiensis* n'a été trouvé portant cette mutation en zone soudanienne où dans tous les cas elle était très minoritaire.

Chez la forme S, la mutation *kdr* L1014F a été trouvée à des fréquences plus élevées en zone soudanienne qu'en zone soudano-sahélienne (respectivement, 83.11% et 67.5%,  $\chi^2 = 25.19$ , ddl = 1,  $P < 0.000001$ ) (figure 16). Une même tendance a été observée chez la forme M, avec une fréquence plus élevée dans la zone soudanienne (63.8%) que celle de la zone soudano-sahélienne (38.75%) ( $\chi^2 = 22.49$ , ddl = 1,  $P = 0.000002$ ). Cependant une extension géographique de la mutation *kdr* a été observée chez cette forme M dans presque tous les sites en zone soudano-sahélienne. Contrairement à la zone soudanienne, la mutation *kdr* a été trouvée dans les populations d'*An. arabiensis* dans 8 sites sur un total de 12 analysés avec des fréquences variables de 75% à Dédougou à <1% à Koubri et Kombissiri respectivement.

#### En 2009

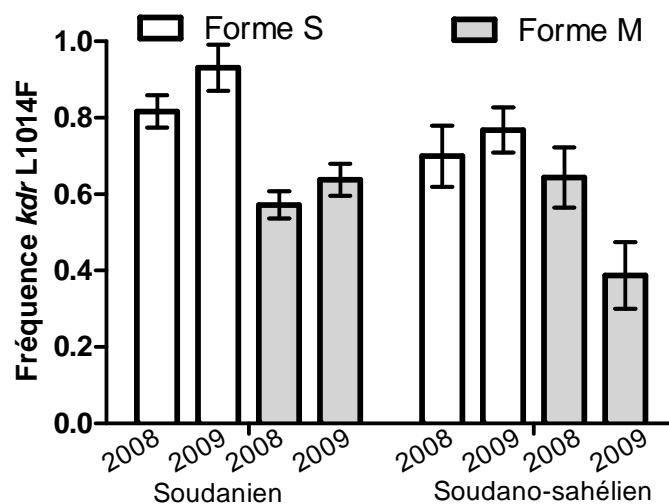
Chez la forme S, les fréquences ont été similaires à celles observées en 2008 toutefois avec une nette augmentation donnant des valeurs très élevées au seuil de la fixation (>90%) en zone soudanienne (figures 19 & 20). Les fréquences observées en zone soudano-sahélienne étaient relativement plus faibles avec en moyenne 76% mais significativement plus élevées que celle de la forme M dans cette zone climatique avec 38% ( $\chi^2 = 89.23$ , ddl = 1,  $P < 0.000001$ ). Très peu d'échantillons d'*An. arabiensis* ont été trouvés porteurs de cette mutation même si le nombre de sites échantillonnés en 2009 a été réduit (tableau VI).

Comparant l'évolution et la distribution de cette mutation par année et par zone climatique, on peut noter une augmentation notable du *kdr* chez la forme S d'*An. gambiae s.s.* qui est désormais au-dessus de 77% quelque soit la zone climatique, frôlant le seuil de fixation en 2009 en zone soudanienne (figure 16). Son augmentation chez la forme M est moins perceptible entre 2008 et 2009 ( $\chi^2 = 0.61$ , ddl = 1,  $P = 0.43$ ) mais il a été observé une extension géographique de cette mutation qui a pratiquement couvert tous les sites du Centre et du Centre Est où une fréquence moyenne de 38-40% a été observée. La même tendance a été enregistrée au sein des populations d'*An. arabiensis* ( $\chi^2 = 0.75$ , ddl = 1,  $P = 0.38$ ) toutefois avec une extension géographique considérable de cette mutation qui a envahi tout le plateau central et les sites du Nord-Ouest avec une fréquence moyenne de 17.9%.

Comparant les fréquences de la mutation *kdr* L1014F chez la forme S par culture de coton, l'évolution de cette fréquence n'était différente entre les trois types de culture *Conv*, *Bio* et *Bt* en 2008 et les fréquences observées étaient exactement similaires à celles décrites pour les

zones climatiques ( $\chi^2 = 1.04$ , ddl = 1,  $P = 0.3$ ). Cependant en 2009, il y a eu un léger décrochage mais significatif de la fréquence *kdr* dans le faciès *Bt* qui a baissé pour se stabiliser à moins de 60% en Septembre 2009. En d'autres termes, les fréquences du *kdr* ont régressé régulièrement et significativement de Juillet 2008 à Septembre 2009 de >85% à 58% en moyenne ( $\chi^2 = 11.7$ , ddl = 1,  $P = 0.00083$  ; figure 18b) ce qui était significativement différent des autres cultures où les fréquences ont été similaires d'une année à l'autre ( $\chi^2 = 0.24$ , ddl = 1,  $P = 0.625$ , figure 18b).

L'évolution des fréquences au sein de la forme moléculaire M par type de coton a varié en dents de scies d'une année à une autre. En 2008, elle ne différait pas significativement entre type de culture ( $\chi^2 = 1.65$ , ddl = 1,  $P = 0.5$ , figure 18a). Mais en Septembre 2009 au dernier prélèvement, la fréquence du *kdr* L1014F était relativement et significativement moins élevée dans le faciès *Bt* avec une fréquence de 25% ( $\chi^2 = 10.84$ , ddl = 1,  $P = 0.0015$ , figure 18a).



**Figure 16 :** Distribution de la mutation *kdr* L1014F chez les deux formes M et S d'*An. gambiae s.l.* en fonction des zones climatiques



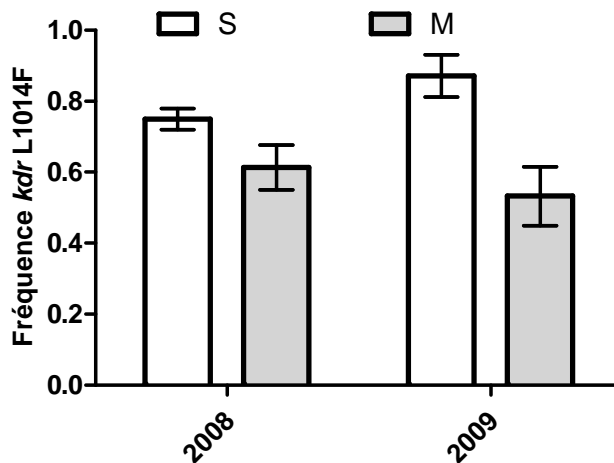


Figure 17 : Fréquence de la mutation *kdr* L1014F chez les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s*

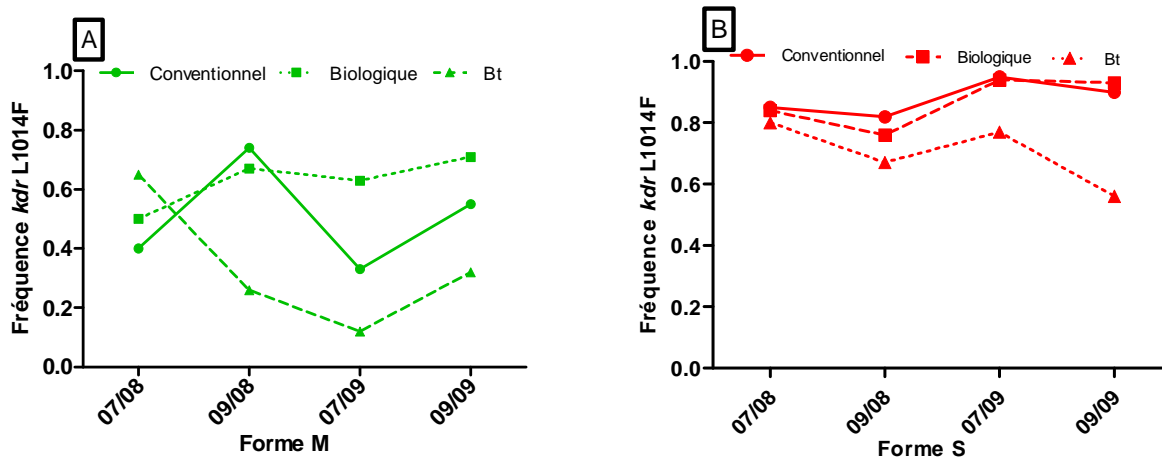


Figure 18 : Dynamique de la fréquence de la mutation *kdr* L1014F chez les deux formes M et S en fonction des faciès cotonnier du Burkina Faso

**Tableau VI : Distribution de la fréquence du gène *kdr* dans le bassin cotonnier du Burkina Faso**

Sites	<i>kdr</i> L1014F-2008			<i>kdr</i> L1014F-2009		
	Forme S	Forme M	<i>arabiensis</i>	Forme S	Forme M	<i>arabiensis</i>
Banfora	0.965	0.615	-	0.95	0.435	0
Batié	0.97	-	-	0.975		0
Dano	0.63	0	-	0.935	0.46	0
Diébougou	0.84	0.46	0	0.97	0.63	0
Dioulassobâ	-	-	-	0.98	0.5	0
Gaoua	0.31	0.25	-	0.98	0.63	0
Kuinima	-	-	-	0.89	-	0
Orodara	0.97	0	-	0.98	0.5	0
Sidéradougou	0.91	0.3	-	0.88	0.94	-
Soumousso	0.835	0.91	-	0.905	0.69	-
Tiéfora	0.92	0.28	0	0.98	0.6	0
VK5	-	0.79	-	0.75	0.75	
VK7	-	0.97	-	0	0.885	-
Houndé	0.97	0.9	0	-	-	-
Boromo	0.84	0.9	0	0.8	0.4	0
Dédougou	0.845	0.185	0.75	0.98	0.57	0.02
Solenzo	0.73	0.65	0.28	-	-	-
Nouna	0.31	0.435	0.28	-	0.52	0
Nanoro	0	0	0	0.93	0.5	0
Kombissiri	0.95	0.98	0.075	0.96	0.33	0
Kompienga	0.9	0	0.25	-	-	-
Koubri	0.33	0.53	0.06	-	-	-
Koupéla	0.5	0.4	0	0.62	0.17	0
Manga	0.66	0.67	0	0.35	0.33	0
Pô	0.75	0.93	0.13	-	-	-
Fada	0.61	0.5	0.25	0.735	0.28	-

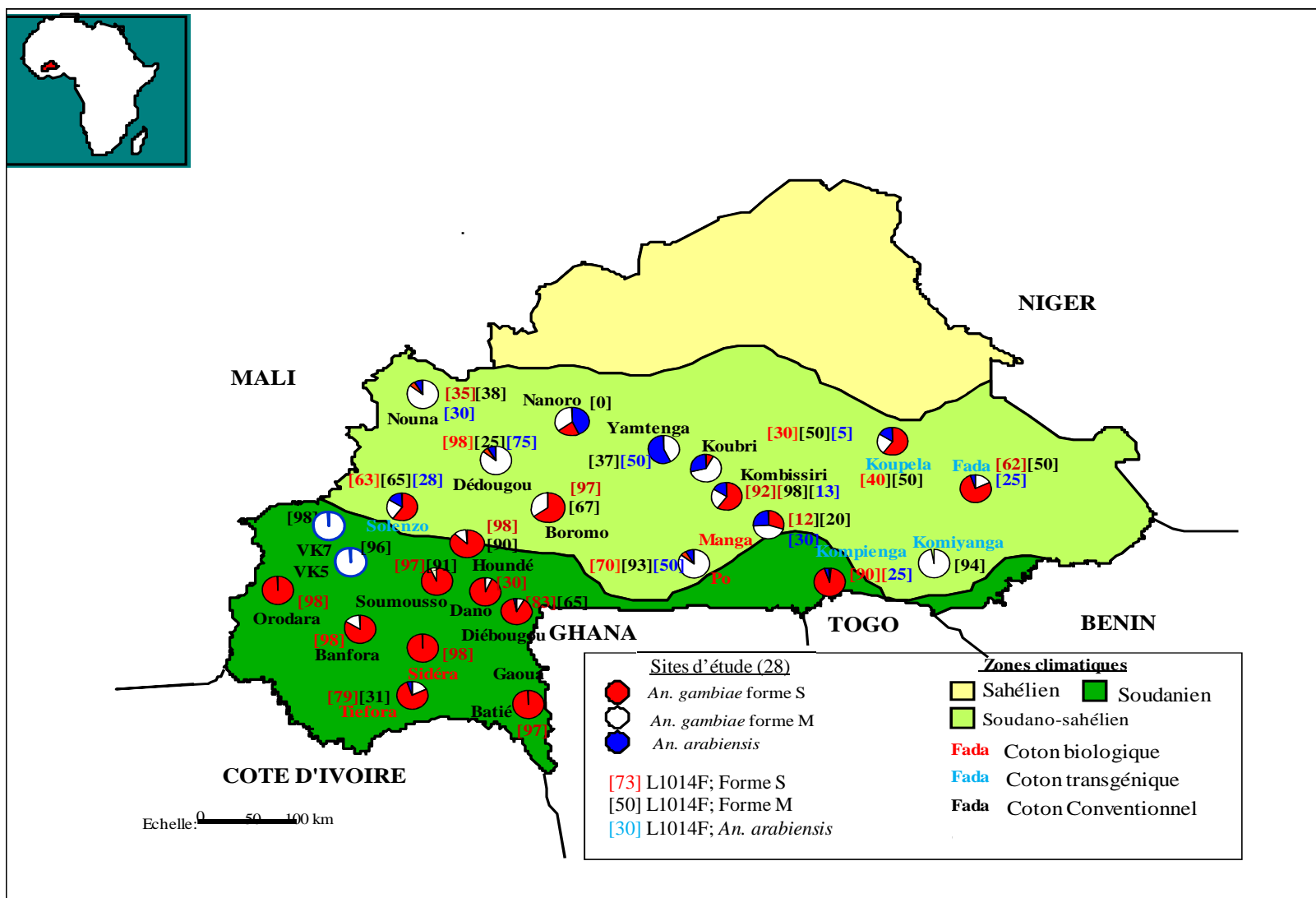
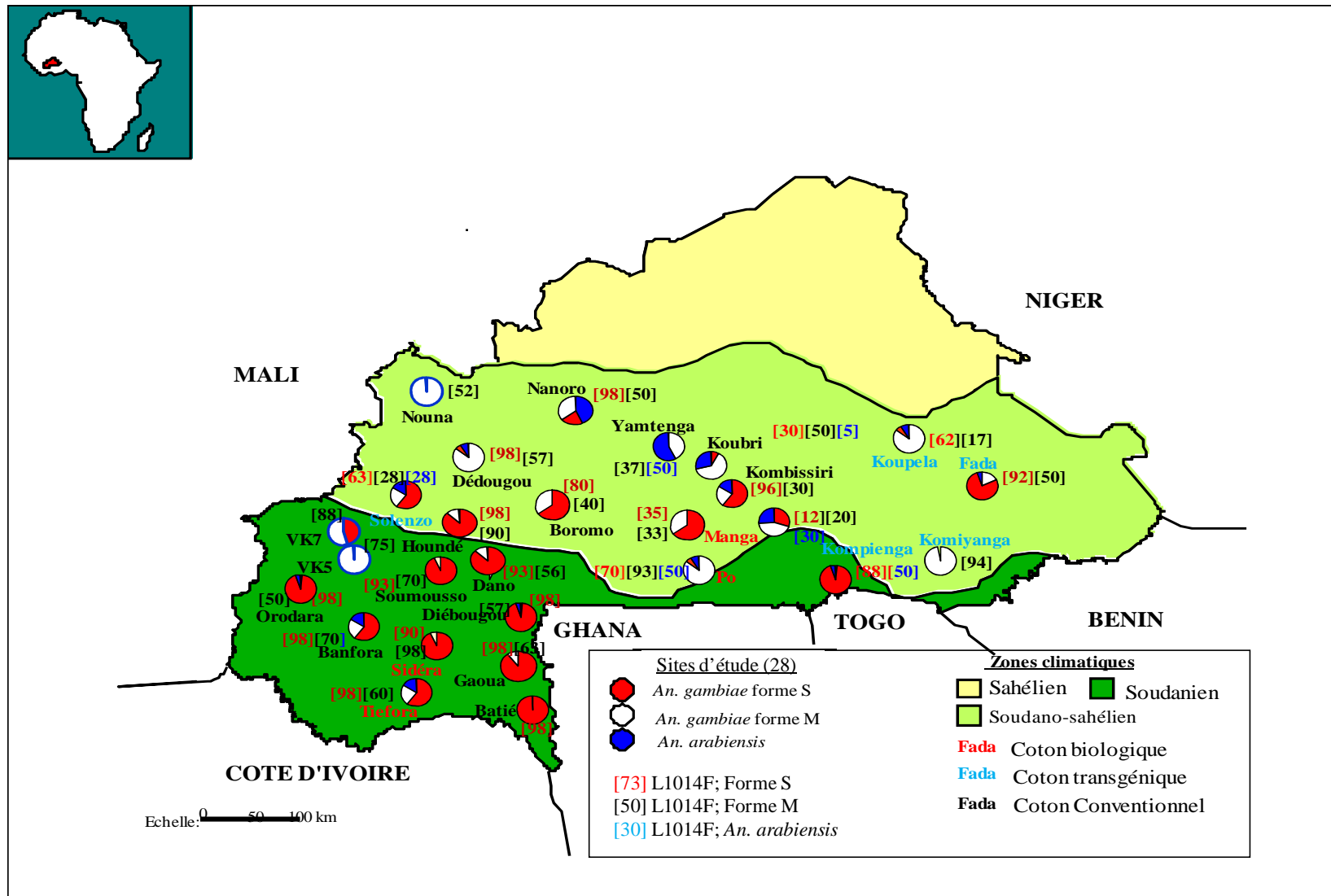


Figure 19 : Distribution de la mutation *kdr* au sein du complexe *An. gambiae* suivant les différents facies cultureux du coton en 2008



**Figure 20 :** Distribution de la mutation *kdr* au sein du complexe *An. gambiae* suivant les différents facies cultureux du coton

## 1.4. Discussion

### 1.4.1. De la composition spécifique du complexe *An. gambiae* au Burkina Faso

Les espèces du complexe *An. gambiae* identifiées sont *An. gambiae* s.s. formes moléculaires M et S et *An. arabiensis*. Leur distribution géographique n'a pas beaucoup varié au cours de ces dix dernières années (Diabaté *et al.*, 2004b ; Dabiré *et al.*, 2012a). En effet la répartition des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* affiche un gradient Nord-Ouest et Sud-Est où la forme moléculaire S d'*An. gambiae* prédomine à l'Ouest et au Sud-Ouest du pays (zone soudanienne) en sympatrie avec la forme moléculaire M dans des proportions respectives de 70% et 30%. Le Centre et le Centre Est du pays en zone soudano-sahélienne montrent plutôt une prédominance de la forme moléculaire M d'*An. gambiae* s.s. majoritairement en sympatrie avec *An. arabiensis*. Cette dernière espèce est plus fréquente dans la partie Nord Ouest et Centre-Est du pays avec des fréquences relativement élevées de 51.5% à Fada N'Gourma, 42.9% à Nanoro, 28.5% à Koubri, 26% à Manga et 16.7% à Kombissiri. L'installation des barrages et retenues d'eau permanentes ont aussi favorisé la forme moléculaire M d'*An. gambiae* inféodée aux zones inondables ou d'irrigation (Touré *et al.*, 1994, 1998) comme c'est actuellement le cas à la Vallée du Kou où nous avons effectué notre échantillonnage. Le faciès de répartition des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* semble être modifié dans le milieu urbain depuis quelques décennies aussi bien à Ouagadougou et à Bobo-Dioulasso. En effet sous l'influence de l'anthropisation intense ou de l'adaptation à la pollution, à Ouagadougou *An. gambiae* s.l. est dominé par *An. gambiae* forme moléculaire M pour 70% suivi d'*An. arabiensis* qui est majoritaire dans certains quartiers précaires de la ville (Fournet *et al.*, 2010). Ceci n'était pas le cas il y a deux décennies où la forme chromosomique Savane (correspondant à la forme moléculaire S) était encore prédominante avec la faible représentation d'*An. arabiensis*. L'émergence de certains quartiers précaires en zone non lotie et l'installation du maraîchage péri-urbain au niveau des bancôtières ont dû contribuer au remodelage de cette structure des populations d'*An. gambiae* s.l. dans cette ville. A Bobo-Dioulasso, la situation semble plus spécifique et nous assistons au remplacement d'*An. gambiae* s.s. (formes moléculaires M et S) par *An. arabiensis* qui est devenu au bout d'une décennie la principale espèce du complexe et ceci pratiquement dans bon nombres de quartiers surtout au niveau central (Dabiré *et al.*, 2012b). Nous avons donc jugé utile de consacrer un chapitre entier pour cette étude à Dioulassoba et Kodéni, deux quartiers de la ville de Bobo-Dioulasso (voir Chapitre 3). Quoique notre étude ne se soit pas particulièrement intéressée aux vecteurs autres qu'*An. gambiae* s.l., nous remarquons que la distribution globale des vecteurs du paludisme au Burkina Faso a connu une légère

modification au niveau national avec des changements plus profonds au niveau des centres urbains à péri-urbains (Dabiré *et al.*, 2012b).

#### **1.4.2. Statut de résistance d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoides et au DDT**

L'étude de la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoides a été initiée pour la première fois à la fin des années 90 où Chandre *et al.* (1999b) avaient déjà détecté des populations d'*An. gambiae* résistantes au DDT et à la perméthrine (avec sensibilité à la deltaméthrine) dans l'Ouest du Burkina Faso. Plus tard d'autres études plus structurées couvrant les régions représentant l'échelle du pays ont montré une résistance d'*An. gambiae s.l.* aux DDT/pyréthrinoides avec un gradient plus accentué à l'Ouest du pays dans la zone soudanienne en particulier dans le bassin cotonnier de l'Ouest. L'analyse moléculaire des spécimens vivants et morts avait montré que cette résistance était plus développée au sein des populations d'*An. gambiae s.s.* plutôt que chez *An. arabiensis* et l'agriculture avait été largement impliquée dans l'émergence de cette résistance croisée DDT/pyréthrinoides (Diabaté *et al.*, 2002; Diabaté *et al.*, 2004b). Plus récemment en réactualisant le statut de résistance des vecteurs aux insecticides élargis aux CXs et OPs, il a été observé une résistance quasi généralisée aux pyréthrinoides dans la plupart des zones cotonnières de l'Ouest comme du Centre-Est avec une baisse de sensibilité au bendiocarb à l'Ouest du pays (Dabiré *et al.*, 2012a). En effet nous avons observé une augmentation de la résistance pendant les périodes de traitements agricoles cependant aucune différence n'a été observée en fonction des pratiques agricoles (coton *Bt*, biologique et conventionnel). Ce spectre de résistance est d'autant plus inquiétant que la culture de coton et ou le maraîchage qui sont de grands consommateurs d'insecticides se répandent à l'échelle du pays ce qui n'est pas sans conséquence pour les stratégies de lutte antivectorielle à base d'insecticides (MILDA ou PID). Cette situation d'augmentation et d'extension géographique de la résistance aux pyréthrinoides/DDT et dans une moindre mesure aux OPs/CXs requiert plus que jamais un monitoring annuel pour contribuer à une meilleure gestion de la résistance en lutte antivectorielle. Ceci pourrait doré et déjà laisser présager une éventuelle rotation des classes insecticides surtout en PID mais aussi la nécessité de trouver de nouveaux insecticides capables d'endiguer ce phénomène au profit d'une efficacité des stratégies de lutttes mises en place par le PNLP. La non observation de baisse de résistance des vecteurs aux pyréthrinoides dans les zones de production de coton *Bt* ou biologique qui sont des pratiques de faibles utilisations d'insecticides serait due au fait que ces surfaces sont encore mal circonscrites et toujours placées au milieu de cultures conventionnelles de coton à utilisation intense de

pesticides. Ceci ne procure pas encore une plus-value en terme de gestion de la résistance mais dans les années à venir où une organisation plus structurée des associations de producteurs de coton travaillant davantage à formaliser les itinéraires techniques et les superficies, on pourrait s'attendre à voir un regain de sensibilité d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides. En fait les champs de coton *Bt* et surtout de bio visités sont encore insérés dans un environnement globalement dominé par le coton conventionnel largement répandu et qui continue de «polluer» ces faciès *Bt* ou bio par les traitements insecticides qu'ils continuent de pratiquer. De plus il n'est pas encore acquis que certains producteurs par peur de voir se développer certaines familles de ravageurs non ciblés par le *Bt*, traitent en cachette leurs champs en dehors des fenêtres imposées par l'itinéraire technique. Pour le DDT on a une toute petite tendance à l'augmentation des taux de mortalité qui sont remontés de 25-30% à 45-50% pour le coton *Bt*. Ceci ne peut encore se traduire par un regain de sensibilité à un niveau opérationnel mais donne une fois encore la preuve que le maintien de la résistance des vecteurs aux insecticides est liée en grande partie à l'utilisation intensive de l'insecticide pour la protection des végétaux. En attendant, en dehors des OP et dans une moindre mesure les CXs dans certaines régions, la résistance aux pyréthrinoides et au DDT s'est généralisée au Burkina et risque de poser à court terme un grave problème d'inefficacité des stratégies de lutte antivectorielle basées sur l'utilisation des insecticides (MII et PID) tout au moins dans l'Ouest du pays. Des études futures sont tout aussi nécessaires pour investiguer le problème de la redistribution des vecteurs du paludisme en l'occurrence *An. gambiae s.l.* dans le milieu urbain et de façon générale dans toutes les agglomérations à activités anthropiques consommatrices d'insecticides. Ceci est important d'une part pour réviser la cartographie des vecteurs au Burkina et d'autre part pour voir aussi le rôle de l'agriculture péri-urbaine sur la sélection de la résistance des vecteurs aux insecticides et *in fine* de récaractériser le faciès de transmission du paludisme à la lumière de tous ces résultats.

#### **1.4.3. Fréquences alléliques des mutations *kdr* L1014F au sein des populations d'*An. gambiae s.l.***

Les fréquences alléliques de la mutation *kdr* L1014F principale mutation mise en cause dans la résistance croisée DDT/pyréthrinoides au Burkina Faso n'ont cessé d'augmenter au cours de ces cinq dernières années et de se répandre dans des zones géographiques où celle-ci était jadis inexistante (Diabaté *et al.* 2004b, Dabiré *et al.*, 2012a). On notera que cette mutation avait été détectée à une fréquence élevée dans les populations de la forme S d'*An. gambiae s.s.* où elle frôle la fixation dans de nombreux sites et à des fréquences assez faibles dans la

forme moléculaire M uniquement dans le site de la Vallée du Kou. Ces observations ont suggéré que son passage dans la forme moléculaire M était due au phénomène d'introgression de la forme S vers la forme M (Weill *et al.*, 2000 ; Diabaté *et al.*, 2004b). A l'époque elle était quasi inexistante au sein des populations d'*An. arabiensis* où un seul spécimen avait été trouvé porteur de cette mutation à l'état hétérozygote et associée à un évènement mutationnel indépendant (Diabaté *et al.*, 2004a). De nos jours la fréquence de cette mutation *kdr* a significativement augmenté aussi bien dans la forme moléculaire M que chez *An. arabiensis* avec une extension géographique allant de l'ancienne zone cotonnière vers d'autres sites récemment enrôlés dans la culture du coton (Dabiré *et al.*, 2012a).

En comparant les fréquences alléliques du gène *kdr* L1014F par culture de coton *Bt*, biologique et conventionnel, il ne ressort aucune différence majeure pour les deux premiers au cours des deux ans de suivi, sauf pour le faciès *Bt* en 2009. En effet dans ce faciès on a quand même observé une baisse de la fréquence allélique du *kdr* L1014F d'au moins 25% dans la forme S entre le premier prélèvement de Juillet 2008 et celui de Septembre 2009. En jouant ainsi sur la réduction ou la suppression de la pression insecticide notamment la rotation d'autres insecticides avec les pyréthrinoides par les traitements en fenêtres ou la réduction pure et simple des pyréthrinoides par l'introduction du *Bt*, on pourrait baisser la pression de sélection du *kdr* L1014F, principal mécanisme de la résistance croisée PY/DDT (Chandre *et al.*, 1999b). Cette baisse pourrait améliorer la sensibilité des vecteurs à ces insecticides utilisés en LAV.

Mais le fait que pour l'instant la situation globale reste inchangée s'expliquerait par le temps d'adoption de ces pratiques agricoles qui serait encore assez trop court pour induire un impact dans le remodelage de la structure génétique de ces populations de vecteurs vis-à-vis des ces mutations. Cependant en prenant en compte l'histoire de la culture de coton dans ces zones où l'Ouest constitue l'ancien bassin cotonnier depuis les années 60 et celle du Centre-Est seulement dans les années 90, on peut noter que l'histoire de la résistance commence dans cette relative nouvelle zone cotonnière du Centre-Est. En effet quoique cette mutation soit présente, la relative faible fréquence observée chez les formes M d'*An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* témoigne de son introduction récente alors que cette mutation *kdr* L1014F atteint quasiment un niveau de fixation dans la forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* témoignant d'une assez longue histoire d'évolution de cette mutation dans l'Ouest du Burkina qui subit une plus forte pression de sélection sous l'influence de l'utilisation intense des pesticides dans la protection du cotonnier (Diabaté *et al.*, 2002 ; Diabaté *et al.*, 2004b ; Dabiré *et al.*, 2008 ;



Dabiré *et al.*, 2012a). Un résumé de l'histoire de la résistance différentielle dans ces deux zones cotonnières ferait l'objet d'une modélisation analytique qui pourrait contribuer à mieux cerner l'évolution de la résistance génétique des vecteurs sous l'influence de la durée et de l'intensité de la pression de sélection.

### **Conclusion partielle 1**

L'étude de la résistance des populations d'*An. gambiae s.l.* dans les faciès cotonniers du Burkina et de façon générale dans les différentes zones agro-climatiques du pays a montré une généralisation de la résistance de ces vecteurs surtout d'*An. gambiae s.s.* aux pyréthrinoides. La conséquence immédiate serait une limite d'utilisation des outils de lutte antivectorielle à base d'insecticides telles que les moustiquaires imprégnées d'insecticides et dans une moindre mesure les PID. Aucune augmentation de sensibilité qui pourrait restaurer la sensibilité des vecteurs n'est encore perceptible dans aucun des faciès cotonniers peu consommateurs d'insecticides. Cette situation est due au fait encore précoce de ces pratiques nouvelles peu consommatrices d'insecticides qui ont besoin davantage de temps pour se stabiliser en tant que faciès cultural en terme d'entité spatiale même si une légère augmentation de sensibilité a été observée dans le faciès *Bt* (mais encore insuffisant pour avoir une plus value en terme de stratégie de contrôle). Des tendances similaires sont notées avec la distribution de la principale mutation à la base de la résistance croisée DDT/PYs, la mutation *kdr* L1014F. Ces fréquences alléliques sont trouvées très élevées et ce quels que soient les faciès cotonniers (*Bt*, bio, conv) ou la zone climatique. Toutefois une baisse de fréquence a été observée dans les faciès *Bt* mais là-encore les niveaux d'évolution sont encore préliminaires et ne sauraient se traduire en projection à courts termes. Enfin par cette étude nous avons une fois de plus produit une preuve de relation entre agriculture et santé qui pourrait jeter les bases d'un rapprochement des deux systèmes pour une meilleure gestion de la santé humaine qui est largement dépendante de l'environnement.

## Chapitre 2: Mise en évidence de la mutation *kdr* L1014S au sein de populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* du Burkina Faso

### 2.1. Introduction

La résistance résulte en fait d'une sélection d'individus mutants qui sont capables de survivre et de se reproduire dans un environnement en présence d'insecticides. Elle peut émerger indépendamment dans des populations de moustiques de différentes localités ou se propager rapidement par migration d'une zone à une autre (Brogdon & McAllister, 1998; Weill *et al.*, 2003). Cette dernière hypothèse semble être le cas en Afrique de l'Ouest où depuis une décennie la résistance aux insecticides s'est propagée dans toute la sous région du Sénégal au Nigeria (Chandre *et al.*, 1999b ; Awolola *et al.*, 2005 ; Czeher *et al.*, 2008; Dabiré *et al.*, 2009a). En Afrique de l'Ouest le développement de la résistance dans les populations d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides a souvent été associé à l'utilisation des pesticides en protection des végétaux particulièrement dans les faciès cotonniers mais aussi à l'utilisation domestique des insecticides (Diabaté *et al.*, 2002 ; Dabiré *et al.*, 2009a&b ; Yadouleton *et al.*, 2011). Au Burkina Faso les mutations conférant la résistance aux insecticides ont été observées à des fréquences très différentes dans les populations des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* et chez *An. arabiensis* (Dabiré *et al.*, 2009a&b). Dans les populations d'*An. gambiae s.l.* en général en Afrique de l'Ouest une forme de résistance croisée au DDT et aux PYs appelée knock-down résistance (*kdr*) est due à la mutation L1014F (substitution de la leucine par la phénylalanine) sur le récepteur de ces insecticides qui est le sodium-voltage-dépendant (Chandre *et al.*, 1999b ; Diabaté *et al.*, 2002 ; Awolola *et al.*, 2005). Un autre point de mutation impliquant une substitution de la leucine par la serine à la même position que la première mutation et connue sous le nom de *kdr* L1014S a été observée et décrite pour la première fois en Afrique de l'Est (Ranson *et al.*, 2000). Elle est en pleine extension dans plusieurs populations d'*An. gambiae* de plusieurs pays d'Afrique Centrale tels le Cameroun (Etang *et al.*, 2006 ; Nwane *et al.*, 2009 ; Ndjemai *et al.*, 2009) le Gabon (Pinto *et al.*, 2006) la Guinée Equatoriale et l'Angola (Jameira *et al.*, 2008). Plus récemment cette mutation L1014S a été détectée dans les populations d'*An. arabiensis* au Bénin (Djègbè *et al.*, 2011) suggérant sa progression en Afrique de l'Ouest et probablement au Burkina Faso qui partage une longue frontière avec le Benin et donc avec un risque de passage de cette mutation. Dans le présent chapitre nous présentons quelques résultats nouveaux sur une étude portant sur la caractérisation de cette mutation L1014S dans 10 sites choisis dans les 26 sites retenus entre 2008-2009 pour notre thèse (voir Chapitre Matériels & Méthodes). Ces résultats sont issus

d'une enquête entomologique transversale réalisée en 2008 dans les 10 sites, tous provenant des faciès cotonniers (Ouest et Centre-Est) où la pression de sélection de la résistance semble la plus élevée au Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2002 ; Dabiré *et al.*, 2012a).

## **2.2. Matériels et Méthodes**

**2.2.1. Sites d'étude:** la collecte des larves a été réalisée dans 10 sites cotonniers repartis dans les différentes zones cotonnières allant du bassin cotonnier de l'Ouest à la relative nouvelle zone cotonnière du Centre et du Centre-Est. Ceci permet d'inclure de fait les zones écologiques où le coton est cultivé notamment les zones soudanienne et soudano-sahélienne. Ces sites ont été géoréférencés et présentés dans le tableau 6.

**2.2.2. La collecte des larves:** les larves d'anophèles ont été collectées de ces 10 sites durant la saison pluvieuse entre Septembre et Octobre 2008. Les larves ont été collectées dans chaque localité dans les gîtes typiques à anophèle que sont les collections d'eau stagnantes. Les larves ont été ensuite amenées au laboratoire pour y être élevées au stade adulte et séparées des autres culicidés par la clef de détermination morphologique (Gillies & Coetzee, 1987). Uniquement les femelles d'*An. gambiae s.l.* ont été utilisées pour les analyses de détection de gènes de résistance.

**2.2.3. Analyses moléculaires:** l'ADN a été extrait des spécimens d'*An. gambiae s.l.* suivant le protocole de Collins *et al.* (1988) légèrement modifié (voir Chapitre Matériels & Méthodes). Après identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* (Scott *et al.*, 1993 ; Favia *et al.*, 2001) les spécimens ont été analysés pour la recherche des mutations *kdr* L1014F et L1014S en utilisant le protocole de Lynd *et al.* (2005) basé sur la technique HOLA (Hot Oligonucleotide Ligation Assay). Les détails de tous ces protocoles peuvent être consultés dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

**2.2.4. Analyses statistiques :** les proportions respectives de chaque espèce et formes moléculaires ont été comparées par site. Les fréquences alléliques de chaque mutation *kdr* dans chaque population d'*An. gambiae s.l.* ont été comparées par Chi 2. Le test de Bonferroni a été utilisé pour les tests multiples de significativité (Hochberg, 1988). Les fréquences alléliques des mutations *kdr* L1014F et L1014S ont été analysées à l'équilibre d'Hardy-Weinberg à l'aide du logiciel GenePop (version 3.4) (Raymond & Rousset, 1995). Comme les mutations *kdr* ne sont pas portées sur la même base d'ADN au niveau du codon 1014, les mutations L1014F et L1014S ont été considérées comme des loci bi-alléliques au niveau des analyses.

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Composition spécifique d'*An. gambiae s.l.*

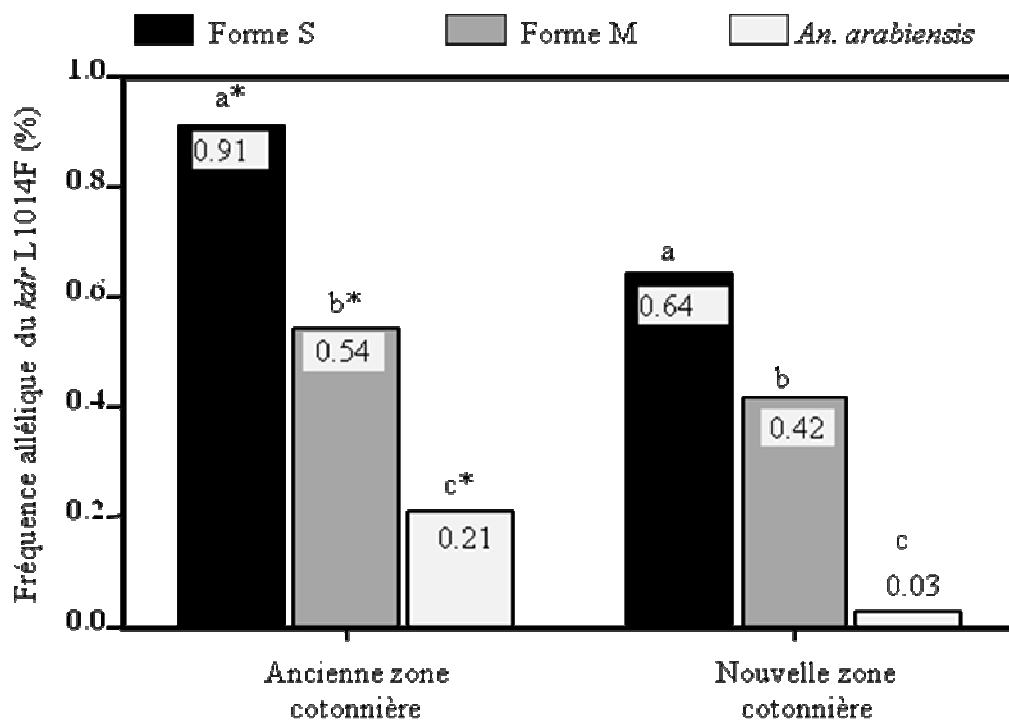
Au total 426 spécimens d'*An. gambiae s.l.* ont été analysés par PCR dont 93.4% d'*An. gambiae s.s.* et 6.6% *An. arabiensis* (Tableau VII). La forme S d'*An. gambiae s.s.* a été prédominante dans la zone soudanienne (74% vs 23.7% pour la forme M) avec seulement 2.3% d'*An. arabiensis*. Dans la zone soudano-sahélienne la forme M était prédominante (74.8% vs 25.2% pour la forme S) avec une distribution géographique qui affiche un gradient décroissant du Nord-Ouest au Sud-Ouest. Une plus forte prévalence d'*An. arabiensis* a été enregistrée dans la zone soudano-sahélienne (12.6%) comparativement à la zone soudanienne.

### 2.3.2. Fréquences et distribution de la mutation *kdr* L1014F chez *An. gambiae s.l.*

La mutation *kdr* L1014F a été détectée au sein des populations d'*An. gambiae s.l.* des 10 sites choisis dans l'ancien bassin (zone soudanienne) et le nouveau bassin (zone soudano-sahélienne) cotonnier du Burkina Faso (tableau VIII). La fréquence de cette mutation a été plus élevée chez la forme S d'*An. gambiae s.s.* indépendamment des zones climatiques ( $\chi^2 = 13.72$ , ddl = 1.157,  $P < 0.0002$ ) (figure 21). Chez la forme S, le *kdr* L1014F a été trouvé à des fréquences plus élevées en zone soudanienne qu'en zone soudano-sahélienne (respectivement, 91% et 64%,  $\chi^2 = 64.02$ , ddl = 1,  $P < 0.0001$ ) (figure 21). Une observation similaire a été faite chez la forme M, avec une fréquence du *kdr* L1014F qui a été plus élevée dans la zone soudanienne (54%) comparativement à la zone soudano-sahélienne (42%) ( $\chi^2 = 10.84$ , ddl = 1,  $P = 0.0009$ ). Les fréquences les élevées dans cette forme ont été observées à la Vallée du Kou (90%) en zone soudanienne et à Pô (80) en zone soudano-sahélienne. Chez *An. arabiensis*, cette mutation a été détectée dans un seul site situé en zone soudanienne (Diébougou) et deux sites en zone soudano-sahélienne (Pô et Koubri), bien que la faible taille de l'échantillon n'ait permis de mieux affiner l'analyse de cette fréquence dans ces populations naturelles. Les tailles d'échantillons analysées ont été cependant suffisantes pour valider une comparaison statistique des fréquences alléliques du *kdr* L1014F suivant les lois de génétique de populations d'Hardy-Weinberg dans 5 sites pour la forme S et de 7 sites pour la forme M. Les analyses statistiques ont montré que les populations de 3 sites sur 5 pour la forme S (Diébougou, Orodara et Koubri) et les populations de 5 sites sur 7 pour la forme M n'étaient pas en équilibre d'Hardy-Weinberg présentant une déviation significative à l'équilibre d'Hardy-Weinberg due à un déficit d'hétérozygotes (tableau VIII).

### 2.3.3. Détection et distribution de la mutation *kdr* L1014S chez *An. gambiae s.l.*

L'allèle L1014S a été détecté dans les populations des deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* dans la localité de Koupéla en zone soudano-sahélienne chez 2 individus de la forme S à l'état hétérozygote et chez 1 individu de la forme M à l'état homozygote. Il a été aussi trouvé dans 1 des 6 spécimens d'*An. arabiensis* analysés, dans le site de Dano à l'état homozygote (tableau VIII). La faible taille des échantillons analysés et la faible fréquence allélique du *kdr* L1014S n'ont pas permis d'analyser de façon significative les populations de ces sites à l'équilibre d'Hardy-Weinberg.



**Figure 21 :** Comparaison de fréquence allélique de la mutation *kdr* L1014F au sein des populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* des anciennes et nouvelles zones cotonnières du Burkina Faso (les données suivies d'une même lettre à l'intérieur d'un même groupe ne sont pas significativement différentes,  $P>0.05$ ; \* dénote une différence significative entre les groupes,  $P<0.05$ )

**Tableau VII:** Répartition géographique des formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae s.s.* et d'*An. arabiensis* des 10 sites d'étude au Burkina Faso.

Sites d'étude	Géo-référence	Pratiques agricoles	<i>An. gambiae s.l.</i>		forme S		forme M		<i>An. arabiensis</i>	
			N	%	N	%	N	%	N	%
Dano	11°08'26"N, 3°03'50"W	Coton, anc. zone	78	56.4	44	56.4	28	35.9	6	7.7
Diébougou	10°58'N, 3°15'W	Coton, anc. zone	34	88.2	30	88.2	2	5.9	2	5.9
Sidéradougou	10°41'15"N, 4°15'45"W	Coton, anc. zone	37	100	37	100	0	0	0	0
Soumousso	11°01'46"N, 4°02'45"W	Coton, anc. zone	40	100	40	100	0	0	0	0
Orodara	10°97'N, 4°91'W	Coton, anc. zone	39	94.9	37	94.9	2	5.1	0	0
VK7	4°24'42"N, 11°23'14"W	Riz- coton	39	5.1	2	5.1	37	94.9	0	0
Pô	44°58'12"N, 12°32'49"W	Coton depuis 1996	41	7.4	3	7.4	36	87.8	2	4.8
Koubri	12°16'36"N, 1°38'69"W	Céréales, maraîcher	36	8.33	3	8.33	15	41.66	18	50
Koupéla	7°2'27"N, 5°45'54"W	Coton depuis 1996	43	39.5	17	39.5	26	60.5	0	0
Fada	12°31'N; 0°21'W	Coton depuis 1996	39	30.77	12	30.77	27	69.23	0	0

**Tableau VIII : Distribution de la fréquence des mutations *kdr* L1014F et L1014S chez *An. gambiae s.l.***

Sites	N	Génotypes				f(L1014F)	[95%CI]	p(HW)	Génotypes				f(L1014S)	[95%CI]	p(HW)
		1014F	1014L	1014L					1014S	1014S					
		1014F	1014L	1014L					1014S	1014S					
Dano	44	38	3	3	0.898	[0.85-0.94]	0.0020	0	0	0	-	-			
Diébougou	30	27	2	1	0.933	[0.89-0.98]	0.1008	0	0	0	-	-			
Sidéradouougou	37	36	1	0	0.986	[0.97-1]	-	0	0	0	-	-			
Soumousso	40	33	1	6	0.837	[0.78-0.89]	0.0000	0	0	0	-	-			
Orodara	37	35	2	0	0.972	[0.94-0.99]	1	0	0	0	-	-			
VK7	2	1	1	0	0.750	[0.44-1]	-	0	0	0	-	-			
Pô	3	2	1	0	0.833	[0.61-1]	-	0	0	0	-	-			
Koubri	3	1	0	2	0.333	[0.06-0.61]	0.2000	0	0	0	-	-			
Koupéla	17	7	3	5	0.57	[0.45-0.69]	0.0372	0	2	0.058	[0-0.11]	1			
<i>An. gambiae</i> forme S	Fada	12	11	0	1	0.916	[0.84-0.99]	-	0	0	0	-	-		
Dano	28	11	4	13	0.464	[0.37-0.56]	0.0001	0	0	0	-	-			
Diébougou	2	0	1	1	0.250	[0-0.55]	1	0	0	0	-	-			
Sidéradouougou	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	-	-			
Soumousso	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-			
Orodara	2	0	0	2	0	-	-	0	0	0	-	-			
VK7	37	29	5	3	0.851	[0.79-0.91]	0.0172	0	0	0	-	-			
Pô	36	32	2	2	0.916	[0.87-0.96]	0.0091	0	0	0	-	-			
Koubri	15	7	1	7	0.500	[0.31-0.63]	0.0007	0	0	0	-	-			
Koupéla	26	4	3	18	0.220	[0.21-0.30]	0.0037	1	0	0.038	[0-0.07]	-			
<i>An. gambiae</i> forme M	Fada	27	0	5	22	0.092	[0.04-0.15]	1	0	0	-	-			
Dano	6	0	0	5	-	-	-	1	0	0.167	[0-0.32]	0.0909			
Diébougou	2	0	1	1	0.250	[0-0.55]	-	0	0	0	-	-			
Sidéradouougou	0	0	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-			
Soumousso	0	0	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-			
Orodara	0	0	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-			
VK7	0	0	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-			
Pô	2	0	1	1	0.250	[0-0.55]	-	0	0	0	-	-			
Koubri	18	1	0	17	0.027	[0-0.06]	-	0	0	0	-	-			
Koupéla	0	0	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-			
<i>An. arabiensis</i>	Fada	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	-			

## 2.4. Discussion

La distribution géographique d'*An. gambiae s.l.* n'a pas varié par rapport aux études antérieures menées au Burkina Faso (cf Chapitre 1). L'analyse des populations échantillonnées a montré une nette prédominance de la forme S d'*An. gambiae s.s.* dans la zone soudanienne alors que la forme M et *An. arabiensis* prédominaient en zone soudano-sahélienne (Diabaté *et al.*, 2004a ; Dabiré *et al.*, 2009a ; Costantini *et al.*, 2009). Les fréquences alléliques de la mutation *kdr* L1014F et leur distribution géographique ne sont pas différentes de celles décrites dans le chapitre précédent pour les mêmes sites entre 2008 et 2009. Une augmentation importante de la fréquence de cette mutation chez *An. gambiae s.l.* a été observée ces dernières années affichant ainsi un gradient décroissant depuis le vieux bassin cotonnier de l'Ouest en zone soudanienne (avec de grandes superficies de coton) vers le Centre et l'Est en zone soudano-sahélienne (Diabaté *et al.*, 2004b). La mutation *kdr* L1014F a été trouvée aussi dans le nouveau bassin cotonnier. En effet l'utilisation intensive des insecticides dans les champs de coton constituerait la principale pression de sélection de la résistance chez les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* (Diabaté *et al.*, 2002). Le présent travail montre une augmentation significative ( $\chi^2 = 0.31$ , ddl = 1,  $P = 0.58$ ) de la prévalence de la mutation *kdr* L1014F chez les deux formes M (35% à 47%) et S (70% à 80%) d'*An. gambiae s.s.* Même si la faible taille de l'échantillonnage dans cette étude ne pouvait permettre de conclure sur l'augmentation de cette fréquence au sein des populations d'*An. gambiae s.s.* au Burkina Faso, les résultats récents présentés au chapitre 1 et ceux publiés par Dabiré *et al.* (2012a) montrent clairement que la mutation *kdr* L1014F connaît une forte progression au sein des populations d'*An. gambiae s.l.* au Burkina Faso avec une expansion géographique dans des zones jadis exemptes de résistance.

Le résultat focal obtenu dans la présente étude est la mise en évidence pour la première fois de la mutation *kdr* L1014S chez les deux formes M (un homozygote) et S (deux hétérozygotes) en Afrique de l'Ouest et précisément dans la localité de Koupéla au Burkina Faso. Elle a également été aussi observée dans un spécimen d'*An. arabiensis* à l'état homozygote. Cela confirme la propagation de cette mutation au sein des populations sauvages d'*An. gambiae s.l.* en Afrique de l'Ouest et particulièrement au Burkina Faso car d'autres études récentes ont déjà montré que cette mutation circule déjà chez *An. arabiensis* au Burkina Faso (Badolo *et al.*, 2012) comme c'est aussi le cas au Bénin (Djègbè *et al.*, 2011). Toutefois pour le cas du Burkina, vu le faible nombre de spécimens des deux localités (Dano et Koupéla) un échantillonnage beaucoup plus important serait nécessaire afin d'évaluer la fréquence réelle



de cette mutation dans les populations d'*An. gambiae s.l.* à l'échelle du pays. La mutation *kdr* L1014S avait déjà été reportée chez la forme S d'*An. gambiae s.s.* en Afrique de l'Est comme au Kenya où elle a été mise en évidence pour la première fois (Ranson *et al.*, 2000). Cinq ans plus tard, cette mutation a été détectée en Afrique Centrale, au Cameroun (Etang *et al.*, 2006; Chouaïbou *et al.*, 2008) au Gabon (Pinto *et al.*, 2006) et en Guinée équatoriale (Ridl *et al.*, 2008). La présence de la mutation *kdr* L1014S chez *An. arabiensis* a été décrite pour la première fois chez des populations d'Afrique de l'Est, en Ouganda (Verhaeghen *et al.*, 2006), au Soudan (Himeidan *et al.*, 2007), en Ethiopie (Yewhalaw *et al.*, 2010) et plus récemment en Afrique de l'Ouest précisément au Bénin, (Djègbè *et al.*, 2011). La détection de cette mutation chez *An. arabiensis* au Burkina Faso n'est pas surprenante vu sa situation géographique avec le Bénin. Cependant sa mise en évidence chez les deux formes moléculaires M et S reste tout de même un fait nouveau en Afrique de l'Ouest.

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer l'émergence de cette mutation caractéristique de l'Afrique de l'Est : i) de par la proximité de la zone du Centre-Est du Burkina avec le Bénin où cette mutation a été déjà observée (Djègbè *et al.*, 2011), elle serait introduite au Burkina par une propagation de proche en proche à partir du Bénin ii) l'émergence de mutation indépendante au sein des populations autochtones burkinabè ou iii) elle existerait dans les populations d'*An. gambiae* au Burkina mais les investigations antérieures n'avaient pas été suffisamment approfondies pour révéler sa présence. Dans tous les cas sa présence dans les deux formes moléculaires ne permet pas de savoir si elle est passée dans l'une ou l'autre des formes par introgression génétique comme il a été prouvé pour la mutation *kdr* L1014F de l'Afrique de l'Ouest surtout que sa présence au Bénin n'a été révélée que chez *An. arabiensis*. En cas d'introgression il est quand même à déplorer la taille faible des échantillons qui ne nous permettrait pas de savoir le sens de cette introgression. Par ailleurs en se basant sur sa présence chez *An. arabiensis* au Bénin, sa détection dans les populations d'*An. arabiensis* au Burkina ne nous paraît pas surprenante et serait due à une expansion géographique au-delà des frontières béninoises quoique qu'un événement mutationnel indépendant à l'instar de la mutation *kdr* L1014F (Diabaté *et al.*, 2004a) ne serait pas à exclure vu que tous les spécimens d'*An. arabiensis* porteurs de cet allèle ont été collectés à Dano et à Dioulassoba dans l'Ouest du Burkina Faso, loin des frontières béninoises. Si pour les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* le niveau de résistance phénotypique que conférerait cette mutation L1014S coexistant avec la mutation L1014F n'est pas établi, elle serait associée à une résistance au DDT dans les populations urbaines

d'*An. arabiensis* de Dioulassoba exemptes de gène *kdr* L1014F (Dabiré *et al.*, 2012b; Jones *et al.*, 2012). Cette mutation décrite pour la première fois au sein des populations d'*An. gambiae s.s.* au Kenya en Afrique de l'Est a été associée en partie à la résistance aux pyréthrinoides et au DDT (Ranson *et al.*, 2000). Sa progression vers la partie occidentale du continent s'était limitée au Cameroun car de récentes études ne l'avaient trouvée au Nigeria voisin jusqu'à sa récente mise en évidence au Bénin (Djègbè *et al.*, 2011) puis au Burkina par nos travaux. Par ailleurs il a été aussi rapporté la présence d'une nouvelle mutation dénommée N1575Y au sein des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* à Soumousso (Ouest du Burkina) en coexistence avec la mutation *kdr* L1014F (Jones *et al.*, 2011). Cette mutation renforcerait la résistance phénotypique de ces populations vis-à-vis des pyréthrinoides. Mais le lien fonctionnel entre ces trois types de mutations reste à déterminer.

### **Conclusion partielle 2**

Les données générées dans le présent travail donnent une preuve supplémentaire qui confirme la circulation de la mutation L1014S au sein des populations d'*An. gambiae s.l.* d'Afrique de l'Ouest. Cependant d'autres investigations sont nécessaires afin d'évaluer la distribution géographique de cette mutation et voir si son association avec la mutation *kdr* L1014F aurait un impact sur la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoides. Récemment il a été montré que l'association de la mutation *kdr* L1014F avec une nouvelle mutation dénommée mutation N1575Y augmenterait le niveau de résistance chez des populations d'*An. gambiae s.s.* (Jones *et al.*, 2011). Cette mutation N1575Y a été reportée chez les deux formes M et S d'*An. gambiae s.s.* dans le Sud-Ouest du Burkina Faso où les deux mutations *kdr* L1014F&L1014S sont déjà observées (Dabiré *et al.*, 2012a ; Badolo *et al.*, 2012 ; Jones *et al.*, 2012). Il est également important de quantifier le rôle que pourrait avoir la mutation *kdr* L1014S sur la sensibilité d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides et son impact opérationnel sur les outils de lutte à base de pyréthrinoides dans un contexte de multirésistance généralisée (Dabiré *et al.*, 2008 ; Ranson *et al.*, 2011 ; Djègbè *et al.*, 2011).

## Chapitre 3 : Etude de la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides en milieu urbain: cas de Bobo-Dioulasso

### 3.1. Introduction

*An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* membres du complexe *An. gambiae s.l.* sont deux vecteurs majeurs du paludisme en Afrique. Les deux espèces sont sympatriques dans plusieurs régions des grandes savanes tropicales subsahariennes (Hunt *et al.*, 1998). Leur répartition géographique globale indique qu'*An. arabiensis* est très répandu en Afrique d'Est en Ouest (della Torre *et al.*, 2005) vivant en sympatrie avec la forme moléculaire S en Afrique de l'Est où la forme M est quasi absente. Par contre en Afrique de l'Ouest les deux formes moléculaires même si elles exploitent différentes niches écologiques vivent globalement en sympatrie avec *An. arabiensis* (Touré *et al.*, 1998 ; Costantini *et al.*, 2009). La forme M occupant les zones inondables telles les zones rizicoles ou les petites retenues d'eau permanentes liées aux activités anthropiques tandis que la forme S est plus dépendante des gîtes de pluies et donc pullulent plus en saison des pluies, la période la plus humide de l'année (Costantini *et al.*, 2009). Quoique la distribution d'*An. arabiensis* soit essentiellement influencée par les variations et les conditions éco-climatiques, cette espèce est en ce moment entrain d'envahir certaines zones urbaines probablement suite à une adaptation à l'environnement anthropique. L'adaptation d'*An. arabiensis* aux gîtes artificiels créés par l'activité anthropique a été rapportée en Afrique de l'Est mais aussi en Afrique de l'Ouest depuis la fin des années 80 (Trape *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 1998; Dongus *et al.*, 2007; Fournet *et al.*, 2010). Au Burkina Faso, les études passées ont toujours indiqué *An. arabiensis* comme le troisième vecteur majeur du paludisme derrière *An. gambiae s.s.* et *An. funestus* dans la partie Ouest du pays en zone soudanienne (Robert *et al.*, 1985; Dabiré *et al.*, 2007, Djogbenou *et al.*, 2008b ; Diabaté, unpublished). Par contre cette espèce a été observée à des proportions relativement similaires à très peu inférieures à celles de la forme M d'*An. gambiae s.s.* dans les régions centrales et de l'Est du pays en zone soudano-sahélienne où la pluviométrie est très modérée fluctuant entre 600 et 1000mm par an (Fournet *et al.*, 2010). Dans la partie Ouest du pays où le climat est plus humide et boisé (900-1000mm) c'est la forme moléculaire S qui prédomine atteignant de fortes proportions de 70-90% du total des populations du complexe *An. gambiae s.l.* (Costantini *et al.*, 2009; Dabiré *et al.*, 2009a). Cependant assez récemment dans la ville de Bobo-Dioulasso, *An. arabiensis* a été observé à une fréquence très élevée de plus 50% ce qui était supérieure à celle des formes moléculaires M et surtout S d'*An. gambiae s.s.* (Djogbenou *et al.*, 2008b). Ces résultats paraissent non

conformes à ceux jusque-là obtenus dans cette zone depuis les travaux de Robert dans les années 80 (Robert *et al.*, 1986) et de Diabaté plus récemment (Diabaté *et al.*, 2002; 2003) reportant la forme S d'*An. gambiae s.s.* à plus de 80% et donc comme vecteur majeur dominant de la ville et plus globalement de la région. Conséquence du changement climatique ou d'une simple adaptation au milieu urbain, ces résultats suggèrent que les populations d'*An. arabiensis* sont entrain de s'implanter progressivement chaque année dans ce faciès jadis favorable à *An. gambiae s.s.* à moins de 10 ans. Afin de mieux appréhender la question le présent travail s'est donc fixé pour objectif i) de décrire la dynamique des espèces d'*An. gambiae s.l.* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* dans la ville de Bobo-Dioulasso, ii) de réactualiser le niveau de résistance de ces vecteurs aux insecticides avec un iv) accent particulier sur la distribution des fréquences alléliques des gènes de résistance (*kdr* L1014F et L1014S, *ace-1<sup>R</sup>*) dans ces populations urbaines d'*An. gambiae s.l.*

## 3.2. Matériels et Méthodes

### 3.2.1. Sites d'étude

L'étude s'est déroulée de Mai à Décembre 2008 à Bobo-Dioulasso plus précisément à Dioulassoba (11°10'42"N; 4°17'35"W), un vieux quartier traditionnel au Centre de la cité et à Kodéni, un quartier périphérique à la sortie Ouest de la ville (11°10'N; 4°15'W).

Ces deux quartiers représentent deux principaux faciès environnementaux de la ville qui est traversée par le marigot Houet tout le long du quartier Dioulassoba et la présence de maraîchage péri-urbain plus développé en périphérie à Kodéni, même si quelques cultures légumières sont entretenues à Dioulassoba. Le marigot Houet coule toute l'année et constitue une source permanente d'eau à Dioulassoba tandis que Kodéni est caractérisé majoritairement par les gîtes permanents à subpermanents entretenus par les petits producteurs maraîchers. La pluviométrie annuelle est de 1000 à 1200mm.

**Figure 22:** Situation géographique des deux sites d'étude à Bobo-Dioulasso

### 3.2.2. Collecte de moustiques

Pour suivre la dynamique des espèces dans les 2 sites, les adultes d'*An. gambiae s.l.* ont été collectés avec les autres culicidés en pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides aérosol le matin entre 6h00 et 8h00 dans quatre maisons durant quatre jours consécutifs de Mai à Décembre 2008. Ils ont été ensuite triés des autres culicidés et anophèles par la clé d'identification de Gillies & de Meillon (1968) et conservés à -20°C pour les analyses

moléculaires en vue de leur identification par le protocole de Scott *et al.* (1993) et de Favia *et al.* (2001).

Les larves ont été collectées dans les deux sites et élevées jusqu'à émergence des adultes. Les adultes ont été identifiés grâce aux clés morphologiques de Gillies & de Meillon (1968). Seules les femelles d'*An. gambiae s.l.* ont été utilisées pour les études de laboratoire. Après les analyses bio-essais en tube OMS réalisés avec la perméthrine 0.75%, la deltaméthrine 0.05%, le bendiocarb 0.1% et le DDT 4% les spécimens testés (vivants et morts) ont été identifiés par PCR pour la détermination des espèces d'*An. gambiae s.l.* (Scott *et al.*, 1993) et des formes moléculaires au sein du complexe *An. gambiae s.s.* (Favia *et al.*, 2001). D'autres analyses moléculaires ont été réalisées pour le diagnostic des mutations *kdr* L1014F (Martinez-Torres *et al.*, 1998) et *ace-1<sup>R</sup>* (Weill *et al.*, 2004). Les détails de tous ces protocoles peuvent être consultés dans le chapitre « Matériels & Méthodes ».

### 3.2.3. Analyses statistiques

Les fréquences de chaque espèce et forme moléculaire ont été comparées entre les deux sites par des tests de Chi 2. Les fréquences du *kdr* L1014F et de l'*ace-1<sup>R</sup>* ont été calculées par la formule  $p = \frac{2AA + Aa}{2n}$  où AA est le nombre d'homozygotes, Aa le nombre d'hétérozygotes et n la taille de l'échantillon analysé. Comme la taille des échantillons a été par moment très faible nous avons poolé pour chaque forme moléculaire et pour *An. arabiensis* tous les individus testés (vivants et morts) afin d'obtenir des effectifs adéquats pour l'analyse statistique des fréquences alléliques.

## 3.3. Résultats

### 3.3.1. Distribution des espèces et formes moléculaires du complexe *An. gambiae s.l.* à Kodéni et Dioulassoba

Nous avons collecté au total 1166 et 1119 moustiques respectivement à Kodéni et Dioulassoba (tableau IX). Les anophèles ont été trouvés à une proportion relativement faible de 35.6% à Kodéni et 27% à Dioulassoba. Cette population d'anophèles était essentiellement composée d'*An. gambiae s.l.*, *An. funestus* et *An. rufipes* étant trouvés à une très faible fréquence (<1%). Les autres culicidés, composés essentiellement de *Culex quinquefasciatus* représentaient 64.3% et 73% de l'effectif total respectivement à Kodéni et Dioulassoba. Cette espèce, non vectrice de paludisme a été rencontrée dans la majorité des gîtes pollués.

---

Kodéni	Dioulassoba
--------	-------------

---

Résultats

Période	<i>An. gambiae s.l.</i>	Autres culicidés	<i>An. gambiae s.l.</i>	Autres culicidés
Mai	5	77	87	57
Juin	7	240	26	224
Juillet	11	237	6	96
Août	35	87	4	29
Sept.	159	28	118	64
Oct.	180	67	17	117
Déc.	19	12	44	233
<b>Total</b>	<b>416</b>	<b>750</b>	<b>302</b>	<b>817</b>

**Tableau IX:** Composition de la faune anophélienne à Kodéni et Dioulassoba

### 3.3.2. Dynamique d'évolution des espèces et formes moléculaires du complexe *An. gambiae s.l.* à Kodéni et Dioulassoba

A Kodéni, *An. arabiensis* et la forme S d'*An. gambiae s.s.* ont été les espèces prédominantes au cours de cette investigation (figure 23A). A l'exception des quatre premiers mois, ces deux espèces ont été trouvées à des proportions quasi-identiques. La forme S a été détectée à des fréquences élevées (>50%) en Mai, Août Décembre au moment où *An. arabiensis* a été trouvé à une fréquence de 30-40%. Pour le reste des mois, *An. arabiensis* a toujours été prédominant avec un pic en Juin et Juillet (>50%) (figure 23A). La forme M d'*An. gambiae s.s.* a été observée tous les mois avec une faible fréquence atteignant difficilement les 20% (figure 23A).

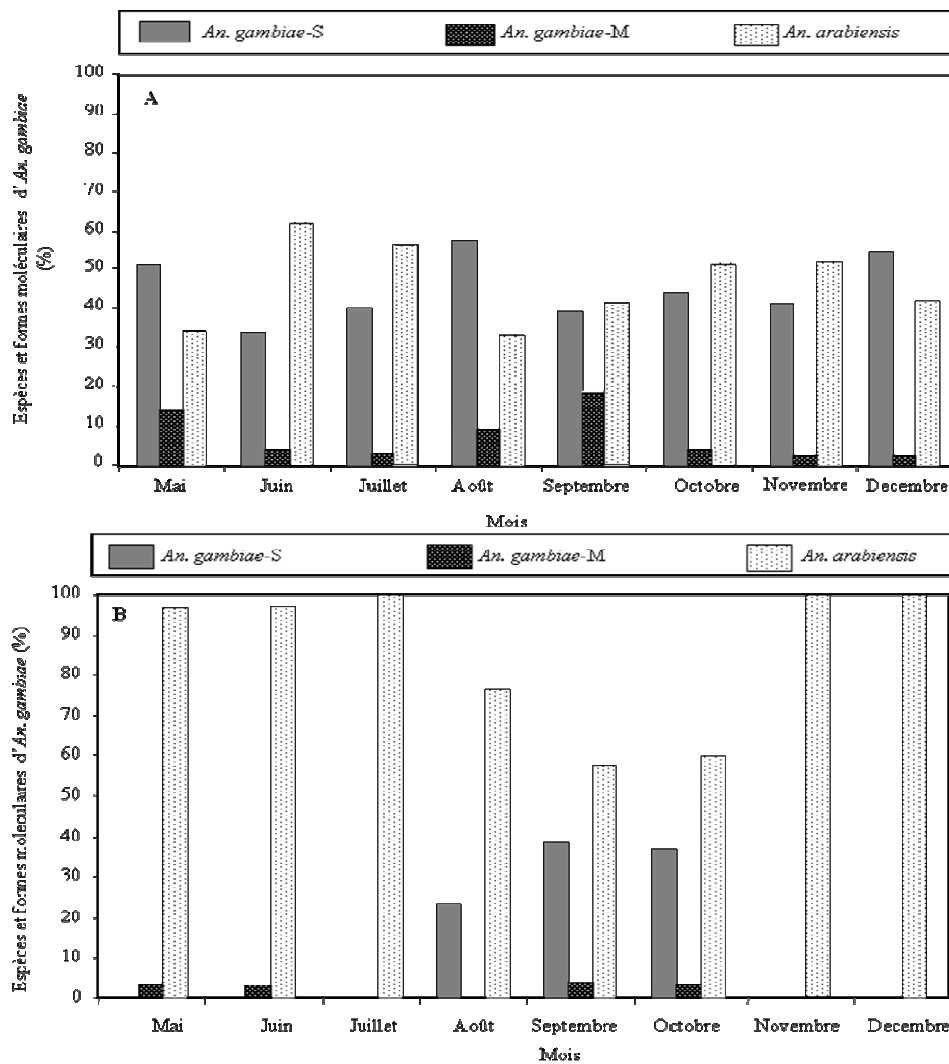


Figure 23 : Variation mensuelle des espèces et formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* à Kodéni (A) et Dioulassoba (B)

A Dioulassoba la composition des espèces a été différente de celle observée à Kodéni. Ici *An. arabiensis* a été prédominante et a même été l'espèce exclusive (100%) pendant certains mois de l'année. La forme M a seulement été détectée à de très faibles fréquences (<5%) pendant les mois de Mai, Juin, Septembre et Octobre (figure 23B). La forme S a été trouvée à des proportions comprises entre 20% et 40% seulement entre Août et Octobre (figure 23B).

### **3.3.3. Sensibilité des populations d'*An. gambiae s.l.* de Kodéni et Dioulassoba aux insecticides**

Les taux de mortalité observés après une heure d'exposition des moustiques aux quatre insecticides DDT 4%, perméthrine 0.75%, deltaméthrine 0.05% et bendiocarb 0.1% sont présentés à la figure 24A. Le taux de mortalité observé dans le lot de témoins était inférieur à 5% donc aucune correction de la mortalité n'a été nécessaire. Les populations d'*An. gambiae s.l.* des deux sites ont été trouvées totalement résistantes au DDT 4% avec des taux de mortalité compris entre 18 et 58%.

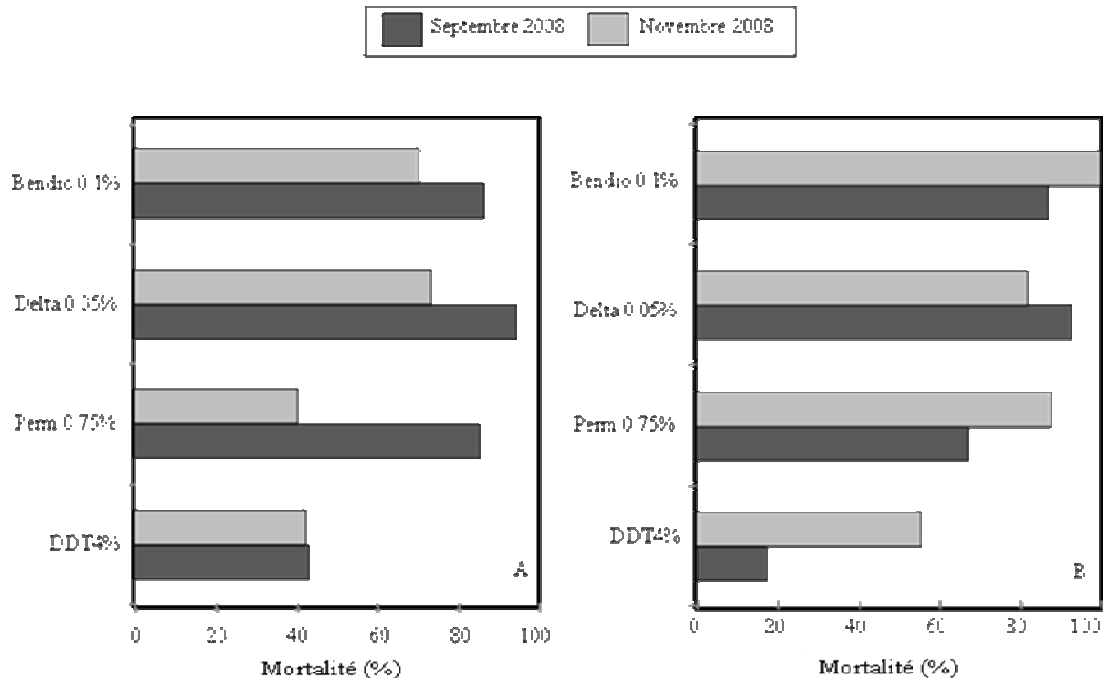
A Kodéni, les taux de mortalité observés ont été de 85%, 94% et 86% respectivement pour la perméthrine 0.75%, la deltaméthrine 0.05% et le bendiocarb 0.1% correspondant à une résistance intermédiaire en septembre 2008. Cette résistance a été confirmée en novembre 2008 avec des taux de mortalité < 80% et compris entre 40 et 70% respectivement à la perméthrine 0.75%, à la deltaméthrine 0.05% et au bendiocarb 0.1%. La quasi-totalité des individus qui ont survécu aux insecticides ont été de la forme moléculaire S tel que révélé par les résultats de l'analyse PCR (tableau X).

A Dioulassoba, les populations d'*An. gambiae s.l.* ont montré un niveau de résistance intermédiaire à la perméthrine 0.75%, à la deltaméthrine 0.05% et au bendiocarb 0.1% en Septembre 2008 (figure 24B). Les tests de Novembre 2008 ont plutôt montré une sensibilité totale des populations d'*An. gambiae s.l.* avec un taux de mortalité de 100% au bendiocarb 0.1%. L'identification des espèces et formes moléculaires par la PCR a révélé que les populations d'*An. arabiensis* des deux sites étaient résistantes au DDT 4% (mortalité comprise entre 50% à 61%) et dans une moindre mesure à la perméthrine 0.75% et à la deltaméthrine 0.05% avec des taux de mortalité de 73% et 96% respectivement. *An. arabiensis* a été trouvé sensible au bendiocarb 0.1% (figure 24B).

La forme S d'*An. gambiae s.s.* des deux sites a été très résistante à tous les quatre insecticides testés avec des taux de mortalité compris de 0 à 46% pour le DDT, 51 à 73% pour les deux pyréthrinoides et 38 à 69% pour le bendiocarb. La forme M collectée à Kodéni a été trouvée



résistante au DDT mais était sensible au bendiocarb. Cependant le très faible effectif des individus de cette forme n'a permis de conclure clairement de son statut de sensibilité aux deux pyréthrinoides et au bendiocarb dans les deux sites.



**Figure 24 :** Mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* testées à la perméthrine 0.75%, à la deltaméthrine 0.05%, au DDT 4% et au bendiocarb 0.1% à A) Kodéni, et B) Dioulassoba

### 3.3.4. Fréquence de mutation *kdr* L1014F chez les populations d'*An. gambiae s.l.*

Au total 586 spécimens testés en bioessai (vivants et morts) ont été analysés par PCR pour la recherche de la mutation *kdr* L1014F. Cette mutation a été détectée avec une fréquence très élevée de 92% chez les populations de la forme S d'*An. gambiae s.s.* des deux sites (tableau XI). Cependant la mutation a été détectée à des fréquences relativement faibles (50%) chez la forme M des deux sites malgré la faible taille de la population de cette forme. La mutation *kdr* L1014F n'a pas été trouvée chez *An. arabiensis* des deux sites. Toutefois nous notons une forte proportion d'homozygotes au L1014F observés dans ces deux sites.

### 3.3.5. Fréquence de la mutation L1014S dans les populations d'*An. arabiensis* résistantes au DDT 4% à Dioulassoba

Faute d'outils PCR approprié, nous n'avons pu réaliser la détection de la mutation L1014S à l'époque. Nous avons donc pu le faire en collaboration avec le Vector Group de la Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM) au Royaume-Uni qui a assuré l'analyse moléculaire des mutations *kdr* 1014F et 1014S spécifiquement dans des populations d'*An. arabiensis* de

Dioulassoba dont nous venons de montrer qu'elles sont résistantes au DDT. Les résultats présentés ici sont alors ceux analysés à la LSTM par la TaqMan® PCR qui est un système de qPCR décrit par Bass *et al.* (2007) et qui permet de détecter concomitamment les deux allèles 1014F et 1014S de la mutation *kdr*. Les analyses ont porté sur 76 spécimens d'*An. arabiensis* ayant survécu après exposition au DDT 4% et 63 spécimens non exposés (tableau XII). Les résultats indiquent qu'aucun *An. arabiensis* n'a été trouvé porteur de la mutation L1014F tandis que la L1014S a été trouvée à une fréquence assez élevée de 40% chez les survivants ce qui ne différait pas chez les non exposés avec 43% ( $P = 0.610$ ). Elle n'a été trouvée chez *An. gambiae s.s.* (formes S) qui ne portait que la L1014F à 80%.

**Tableau X:** Identification PCR des espèces d'*An. gambiae s.l.* et formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* testés en bioessai (survivants et morts) pour chaque espèce et mois. (N=nombre testé en PCR, nombre en gras représente le nombre de survivants, en *italique* entre parenthèse le nombre de morts. % représente le pourcentage de chaque espèce et forme moléculaire du total testé en PCR)

Sites	<i>An. gambiae s.l.</i> N testés en PCR	<i>An. gambiae S</i>	<i>An. gambiae M</i>	<i>An. arabiensis</i>
<b>Kodéni</b>				
<b>DDT4%</b>				
Septembre 08	52	<b>8(7)</b> [28.85%]	<b>15(9)</b> [46.15%]	<b>5(8)</b> [25%]
Novembre 08	30	<b>20(0)</b> [66.7%]	<b>1(0)</b> [3.3%]	<b>1(8)</b> [30%]
<b>Perméthrine 0.75%</b>				
Septembre 08	106	<b>30(32)</b> [58.5%]	<b>6(1)</b> [6.6%]	<b>6(31)</b> [34.9%]
Novembre 08	42	<b>11(10)</b> [50%]	<b>0(0)</b>	<b>2(19)</b> [50%]
<b>Deltaméthrine 0.05%</b>				
Septembre 08	101	<b>15(30)</b> [44.5%]	<b>0(1)</b> [1%]	<b>2(53)</b> [54.5%]
Novembre 08	41	<b>4(11)</b> [36.6%]	<b>3(0)</b> [7.3%]	<b>4(19)</b> [56.1%]
<b>Bendiocarb 0.1%</b>				
Septembre 08	75	<b>16(10)</b> [34.7%]	<b>0(14)</b> [18.7%]	<b>0(35)</b> [46.6%]
Novembre 08	32	<b>4(6)</b> [31.25%]	<b>0(0)</b>	<b>0(22)</b> [68.75%]
<b>Dioulassoba</b>				
<b>DDT4%</b>				
Septembre 08	61	<b>13(0)</b> [21.3%]	<b>0(1)</b> [1.6%]	<b>19(28)</b> [77.1%]
Novembre 08	40	<b>0(0)</b>	<b>0(0)</b>	<b>20(20)</b> [100%]
<b>Perméthrine 0.75%</b>				
Septembre 08	77	<b>16(22)</b> [49.4%]	<b>0(2)</b> [2.6%]	<b>5(32)</b> [48%]
Novembre 08	30	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8(22)</b> [100%]
<b>Deltaméthrine 0.05%</b>				
Septembre 08	63	<b>13(18)</b> [49.2%]	<b>2(4)</b> [9.5%]	<b>1(25)</b> [41.3%]
Novembre 08	36	<b>0(0)</b>	<b>0(0)</b>	<b>6(30)</b> [100%]
<b>Bendiocarb 0.1%</b>				
Septembre 08	67	<b>5(11)</b> [23.9%]	<b>0(0)</b>	<b>1(50)</b> [76.1%]
Novembre 08	34	<b>0(0)</b>	<b>0(0)</b>	<b>0(34)</b> [100%]

**Tableau XI:** Fréquences alléliques et génotypes du *kdr* L1014F au sein d'*An. gambiae s.l.* à Kodéni et Dioulassoba testés au DDT 4% et aux pyréthrinoides (perméthrine 0.75% et deltaméthrine 0.05%)

Localités	Espèces	N	SS	RS	RR	F( <i>kdr</i> )	HW (P-value)*
Kodéni	<i>An. arabiensis</i>	127	127	0	0	0	-
	<i>An. gambiae</i> -M	22	8	8	6	0.45	-
	<i>An. gambiae</i> -S	145	3	16	126	0.92	0.013
Dioulassoba	<i>An. arabiensis</i>	208	208	0	0	0	-
	<i>An. gambiae</i> -M	8	4	0	4	0.5	0.03
	<i>An. gambiae</i> -S	76	5	1	70	0.92	0.001

F(*kdr*) = fréquences de la mutation *kdr*. HW = test d'Hardy-Weinberg.

\*P-value pour le rejet ou l'acceptation de l'hypothèse d'équilibre d'Hardy-Weinberg.

### 3.3.6. Fréquence de la mutation *ace-I<sup>R</sup>* chez les populations d'*An. gambiae s.l.*

Au total 197 spécimens (32 individus résistants et 165 sensibles au bendiocarb) ont été analysés par PCR pour la détection de la mutation *ace-I<sup>R</sup>* (tableau XIII).

A Kodéni la mutation *ace-I<sup>R</sup>* a été observée chez 23 des 110 individus analysés. Ainsi le génotypage a révélé que cette population était composée de 22 hétérozygotes et 1 homozygote résistant, tous issus de la forme moléculaire S.

A Dioulassoba, 87 spécimens d'*An. gambiae s.l.* ont été analysés et la mutation a été seulement observée chez la forme S avec une fréquence de 29% (8 hétérozygotes et 1 homozygote résistant). Les survivants à l'exposition au bendiocarb 0.1% étaient tous porteurs des deux mutations *kdr* L1014F et *ace-I<sup>R</sup>*. La mutation *ace-I<sup>R</sup>* n'a pas été détectée chez les populations d'*An. arabiensis* des deux sites.

**Tableau XII :** Fréquences et génotype de la mutation *kdr* 1014S dans les populations d'*An. arabiensis* de Dioulassoba testés et non exposés au DDT 4% par les tests de sensibilité OMS [voir article Jones *et al.*, 2012 sur la résistance d'*An. arabiensis* au DDT à Dioulassoba]

Traitement	N	LL	LS	SS	L	S
Non-exposé	63	24	28	11	0.60	0.40
DDT 4% (survivants)	76	22	42	12	0.57	0.43

**Tableau XIII:** Fréquences alléliques et génotype de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* au sein des populations d'*An. gambiae* testées au bendiocarb 0.1% à Kodéni et à Dioulassoba

Localité	Espèces	N	SS	RS	RR	$F(ace-1^R)$	HW (P-value)*
Kodéni	<i>An. arabiensis</i>	57	57	0	0	0	-
	<i>An. gambiae</i> -M	14	14	0	0	0	-
	<i>An. gambiae</i> -S	39	16	22	1	0.3	0.999
Dioulassoba	<i>An. arabiensis</i>	70	70	0	0	0	-
	<i>An. gambiae</i> -M	0	0	0	0	0	-
	<i>An. gambiae</i> -S	17	8	8	1	0.29	0.843

$F(ace-1^R)$  = fréquences de la mutation *ace-1<sup>R</sup>*. HW = test d'Hardy-Weinberg.

\*P-value pour le rejet ou l'acceptation de l'hypothèse d'équilibre d'Hardy-Weinberg.

### 3.4. Discussion

*An. gambiae s.l.* est un complexe d'au moins sept espèces morphologiquement identiques réparties (Coluzzi *et al.*, 1979 ; Hunt *et al.*, 1998) à travers toute l'Afrique Sub-saharienne incluant les îles voisines. Parmi ces espèces seules *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* sont présentes au Burkina Faso. Ces espèces sont le plus souvent sympatriques dans la majeure partie du pays mais à des fréquences relatives variables suivant l'environnement rural et urbain. Des études précédentes de Coluzzi *et al.* (1979) avaient montré la colonisation de certaines villes du Nigéria par *An. arabiensis*. Par la suite Kristan *et al.* (2003), sur un large échantillonnage de populations d'*An. gambiae s.l.* dans les villes de Aiyetoro et Lantoko au Nigéria ont montré que la majorité de ces populations étaient constituées d'*An. arabiensis*. Bien que Lemasson *et al.* (1997) ont montré qu'*An. arabiensis* avait une capacité vectorielle plus réduite qu'*An. gambiae s.s.* au Sénégal, ces résultats révèlent plutôt une adaptation de cette espèce à l'environnement urbain. Mais d'autres études dans plusieurs localités sont nécessaires pour comprendre la cause de l'expansion d'*An. arabiensis* dans les grandes villes d'Afrique de l'Ouest. Parmi les membres du complexe *An. gambiae* l'espèce *An. arabiensis* est la plus répandue avec une grande capacité d'adaptation quant aux choix de l'hôte et du site de repos (Chauvet *et al.*, 1973 ; Awolola *et al.* 2007). En 1986, dans une étude sur la transmission du paludisme dans la ville de Bobo-Dioulasso incluant Dioulassoba (un des sites d'étude du présent travail) Robert *et al.* (1986) avaient seulement identifié 3% d'*An. arabiensis* dans l'ensemble des vecteurs du paludisme. En 1999, au cours d'une autre investigation dans la même ville, Chandre *et al.* (1999b) n'avaient identifié aucun spécimen d'*An. arabiensis*. En 2002, Diabaté *et al.* (2002) dans leur étude sur la composition des vecteurs du paludisme à Dioulassoba, avaient montré la présence d'*An. arabiensis* à une proportion de 8,3%. Les résultats du présent travail montrent une augmentation importante de

la proportion d'*An. arabiensis* dans le site de Dioulassoba avec une fréquence moyenne de 90% quelque soit la période d'échantillonnage. La même situation a été observée à Kodéni qui est un quartier périphérique de la ville de Bobo-Dioulasso (>50% *An. arabiensis* vs 40% *An. gambiae s.s.*). D'autres études récentes menées dans les savanes autour de Bobo-Dioulasso ont aussi montré qu'*An. arabiensis* était observé à des proportions élevées (Gimonneau *et al.*, 2010) suggérant une infiltration de cette espèce au-delà de la ville de Bobo-Dioulasso. Cette nouvelle adaptation d'*An. arabiensis* pourrait s'expliquer par les changements climatiques ou les actions anthropiques locales qui favoriseraient son installation, toutefois de nouvelles investigations seraient nécessaires pour mieux élucider ces hypothèses. Les tendances rapportées par notre étude auraient pu être contradictoires aux résultats d'études menées au milieu des années 80 à Ouagadougou et qui trouvaient *An. gambiae s.s.* comme vecteur majeur du paludisme (Sabatinelli *et al.*, 1986; Rossi *et al.*, 1986); mais les conclusions d'études récentes menées en 2006 à Ouagadougou ont trouvé *An. arabiensis* à plus de 55% comme espèce prédominante (vs 45% pour la forme M d'*An. gambiae s.s.*) (Fournet *et al.*, 2010). Chez les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* l'adaptation aux différentes niches écologiques a été souvent associée à certaines inversions chromosomiques spécifiques conférant à la forme M la capacité d'exploiter les zones inondées et arides tandis que la forme S serait plus significativement dépendante des gîtes liés à la saison des pluies (Touré *et al.*, 1994, 1998). Des investigations approfondies sont donc nécessaires pour mieux comprendre les bases génétiques qui sous-tendent l'adaptation écologique d'*An. arabiensis* depuis les savanes méridionales aux eaux polluées du milieu urbain comme nous venons de le montrer par notre étude.

Pour évaluer la sensibilité de ces vecteurs urbains aux insecticides, nous les avons testés contre 3 insecticides utilisés en santé publique mais aussi au DDT. En considérant les populations d'*An. gambiae s.l.* dans l'ensemble, nous avons observé une résistance aux PYs, au bendiocarb et surtout de façon plus significative au DDT sur les deux sites. La forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* a montré le niveau de résistance le plus élevé à tous les insecticides ce qui était d'ailleurs justifié par la fréquence élevée des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* observées dans cette forme avec le *kdr* qui est pratiquement au point de fixation. A cause de l'effectif réduit des spécimens de la forme M, il ne nous a pas été possible d'assigner clairement un statut de résistance à tous les quatre insecticides mais il est apparu une résistance nette de cette forme au DDT. Elle a été plutôt sensible au bendiocarb ce qui était aussi justifié par la présence du *kdr* à une fréquence de 50% (conférant la résistance croisée DDT/PYs) et l'absence de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* impliquant la sensibilité au bendiocarb. Les

populations d'*An. arabiensis* ont montré une résistance nette au DDT, intermédiaire aux PYs et une sensibilité au bendiocarb. Contrairement à la forme S d'*An. gambiae s.s.* la mutation *kdr* L1014F a été absente dans ces populations mais elles présentaient plutôt la seconde mutation *kdr* L1014S à des fréquences relativement élevées de 40% qui expliquerait la résistance au DDT. Mais il est clair que l'implication d'autres mécanismes d'ordre métabolique n'est pas à exclure dans cette résistance au DDT voir aux PYs dans cette population d'*An. arabiensis* à Dioulassoba. Cependant c'est sans surprise qu'aucun *An. arabiensis* n'a été trouvé porteur de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* conformément à leur statut phénotypique de sensibilité au bendiocarb.

Le niveau de résistance observé dans les populations d'*An. gambiae s.s.* dans les deux sites pourrait s'expliquer par l'utilisation d'insecticides par les petits maraîchers à Kodéni pour traiter les cultures légumières. Mais à Dioulassoba ce serait plutôt l'usage domestique des insecticides tels les aérosols et les tortillons contre la nuisance culicidienne créée par l'abondance des gîtes permanents et dans une moindre mesure par l'usage d'insecticides pour protéger les cultures maraîchères quoique le nombre d'exploitations semble dérisoire comparé à Kodéni. En 1993 à Bouaké, l'émergence de la résistance à la perméthrine avait été attribuée à l'utilisation répandue des PYs contenus dans les tortillons et les bombes aérosols par les ménages (Elissa *et al.*, 1993).

Dans notre étude, les individus d'*An. gambiae s.s.* portant les mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* de façon concomitante ont été trouvés dans le milieu naturel. Ce phénomène de résistance multiple avait déjà été rapporté dans les populations d'*An. gambiae s.s.* dans l'Ouest du Burkina et suspecté de renforcer le niveau de résistance aux PYs, CXs et OPs (Dabiré *et al.*, 2009b). Ceci constitue un souci majeur pour les programmes de lutte contre les vecteurs du paludisme basée sur l'utilisation des MILDA seules ou en combinaison avec les PID. Un suivi de la résistance des vecteurs à ces insecticides serait donc une composante importante et basique de la stratégie de lutte contre les vecteurs. Les résultats de notre étude, nous espérons, seront d'une contribution utile pour le Programme National de Lutte contre le Paludisme ne serait-ce que pour le district sanitaire de Bobo-Dioulasso.

### **Conclusion partielle 3**

Cette étude a montré très clairement que la composition vectorielle et la dynamique des vecteurs peuvent changer dans une localité avec le temps peut-être pour des raisons de changements climatiques ou d'activités anthropiques locales. Ces changements au niveau de la composition peuvent ne pas avoir nécessairement un impact sur la transmission du paludisme. Notre étude confirme qu'*An. arabiensis* jadis trouvé en faible pourcentage dans la population vectorielle dans l'Ouest et le Sud-Ouest du Burkina est entrain de remplacer *An. gambiae s.s.* comme vecteur majeur de paludisme dans la ville de Bobo-Dioulasso et les savanes environnantes. Ce changement de la composition vectorielle dans beaucoup de régions en Afrique n'est pas un phénomène nouveau mais suffisamment important car il peut avoir un impact considérable dans l'épidémiologie du paludisme et dans la lutte antivectorielle (Robert *et al.*, 2003).

#### 4.1. Introduction

Les premiers cas de résistance des vecteurs aux insecticides ont été enregistrés très tôt au Burkina Faso au début des années 60 où des populations d'*An. funestus* et quelques années plus tard celles d'*An. gambiae s.l.* ont montré une mortalité réduite vis-à-vis de la dieldrine et du DDT (Hamon *et al.*, 1968 a&b). A la fin des années 90, des études plus récentes ont confirmé que la résistance des populations d'*An. gambiae s.l.* au DDT s'accroît davantage avec des niveaux très élevés; elles ont aussi révélé une résistance croissante de cette espèce aux PYs (Diabaté *et al.*, 2002, 2004b ; Dabiré *et al.*, 2009a). De nos jours au Burkina Faso, la résistance d'*An. gambiae s.s.* au DDT et aux PYs est très répandue et gagne par extension des faciès écologiques jadis exempts de résistance (Dabiré *et al.*, 2012a). La mutation *kdr* L1014F a été fortement associée à l'émergence et au développement rapide de cette résistance croisée au DDT/PYs dans cette partie Ouest du continent notamment au Burkina Faso (Chandre *et al.*, 1999b; Diabaté *et al.*, 2004b ; Dabiré *et al.*, 2009a) et en Afrique centrale (Kerah-Hinzoumbe *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2009). La mutation L1014S a été largement décrite comme le mécanisme mutationnel impliqué dans cette résistance aux PYs et au DDT en Afrique de l'Est où elle a été décrite pour la première fois au Kenya (Ranson *et al.*, 2009) mais a été retrouvée plus tard en Afrique Centrale (Pinto *et al.*, 2006 ; Janeira *et al.*, 2008 ; Ndjemai *et al.*, 2009 ; Nwane *et al.*, 2009). Plus récemment cette mutation L1014S a été décrite au Bénin (Djègbè *et al.*, 2011) et aussi au Burkina Faso comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents de notre étude traduisant ainsi un faciès de *kdr* multiples au Burkina Faso pouvant affecter considérablement l'efficacité des outils de lutte antivectorielle à base de PYs.

De ce fait il y a un besoin urgent d'investiguer des méthodes alternatives ou complémentaires à l'utilisation des PYs en lutte antivectorielle. A court terme, les autres classes d'insecticides avec des modes d'action différents tels les OPs et les CXs pourraient être utilisés seuls ou en combinaison avec les PYs en PID ou pour l'imprégnation des moustiquaires (Guillet *et al.*, 2001). Cependant la résistance des populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* a déjà été aussi rapportée pour ces classes d'insecticides. La résistance aux OPs et aux CXs chez *An. gambiae* est due à une mutation *ace-1* gène codant pour l'acétylcholinestérase, le récepteur des OPs et CXs. Cette mutation résulte d'une substitution de la Glycine (GGC) par la Serine (AGC) à la position 119 de la protéine codante (Weill *et al.*, 2003 ; Weill *et al.*, 2004). Les premiers cas de baisse de sensibilité aux OPs et aux CXs ont été observés dans les populations de *Culex* en



Côte-d'Ivoire au milieu des années 90 (Chandre *et al.*, 1997). Plus récemment, elle a été décrite dans les populations d'*An. gambiae* du Centre et du Nord de la Côte d'Ivoire (N'Guessan *et al.*, 2003), du Bénin (Corbel *et al.*, 2007) et du Burkina Faso (Djogbenou *et al.*, 2008b ; Dabiré *et al.*, 2009b).

La situation de la résistance multiple chez *An. gambiae* a été observée dans les savanes humides à l'Ouest du Burkina Faso avec la présence concomitante des mutations *kdr* L1014F et *ace-1* G119S (Dabiré *et al.*, 2008). Elle est particulièrement alarmante et constitue un des risques majeurs pour le succès des programmes de lutte contre le paludisme.

Mais ces mécanismes mutationnels ne sont pas les seuls mécanismes de résistance et l'implication des mécanismes biochimiques conférant la résistance métabolique viendrait aggraver la complexité de cette résistance multiple au Burkina Faso. En dehors des données très préliminaires sur la Vallée du Kou (Dabiré *et al.*, 2012a) aucun résultat majeur n'existe au Burkina Faso sur le rôle de la résistance métabolique des populations d'*An. gambiae* aux insecticides au Burkina Faso. Ce présent travail vient combler ce gap et investiguer pour la première fois à une échelle plus grande le niveau d'expression des enzymes de détoxification, leur distribution et leur rôle sur la résistance des populations d'*An. gambiae* à partir de 10 sites représentatifs. Ce travail va aussi permettre de réactualiser le phénotype de résistance aux quatre classes d'insecticides dans ces 10 sites d'étude, ce qui va faciliter l'interprétation et l'extrapolation des résultats obtenus en résistance métabolique. L'analyse et la distribution des fréquences alléliques des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* et la connaissance de la composition spécifique d'*An. gambiae s.l.* pourront fournir une bonne description de la diversité et de l'extension des phénotypes de résistance multiple chez *An. gambiae s.l.* au Burkina Faso.

## **4.2. Matériels et Méthodes**

Cette étude a été menée dans 10 sites dont 9 sont situés dans le bassin cotonnier de l'Ouest et de la boucle du Mouhoun dans l'Ouest de la zone soudanienne (Banfora, Orodara, Tiéfoua Samblatoukoro, Soumousso, Vallée du Kou 7, Houndé, Dédougou et Nouna) et un (01) site au Centre-Est du pays en zone soudano-sahélienne (Koupéla) de telle sorte à couvrir les deux zones écologiques où le coton est cultivé au Burkina Faso. Aucun échantillonnage n'a été réalisé au Nord du pays où le coton n'est pas cultivé. Tous ces sites ont été géo-référencés et font partie du panel de sites d'étude choisis pour les travaux de notre thèse (voir Chapitre Matériels & Méthodes).

### **4.2.1. Collecte des larves**

Les larves d'*An. gambiae s.l.* ont été collectées entre Août et Septembre 2010 couvrant la saison des pluies et la campagne cotonnière à partir des gîtes naturels typiques aux anophèles. Dans chaque localité, les larves ont été collectées dans au moins 10 gîtes larvaires indépendants et regroupées par site d'étude. Les larves ont été ensuite ramenées à l'IRSS/Centre Muraz à Bobo-Dioulasso pour y être élevées au stade adulte. Après émergence, les moustiques adultes ont été ensuite morphologiquement identifiés et séparés suivant la clé d'identification de Gillies & de Meillon (1968). Quarante-femelles d'*An. gambiae s.l.* ont été sub-échantillonnées par localité de façon aléatoire du lot d'adultes émergés et immédiatement conservées à -80°C pour les analyses biochimiques et moléculaires. Le reste des femelles adultes d'*An. gambiae* était destiné aux tests de sensibilité aux insecticides.

#### **4.2.2. Tests de sensibilité aux insecticides**

Les adultes issus de l'émergence des larves collectées dans les différentes localités (dont une partie est conservée à -80°C pour les analyses biochimiques) ont été exposés par le protocole de tube OMS aux insecticides comprenant 2 PYs (perméthrine 0.75% et deltaméthrine 0.05%), un CX (bendiocarb 0.1%), un OP (fénitrothion 1%) et un OC (DDT 4%) aux doses recommandées par l'OMS.

#### **4.2.3. Analyses biochimiques**

La détection des enzymes impliquées dans la résistance métabolique a été effectuée pour chaque spécimen d'*An. gambiae s.l.* dans les 10 sites. Pour ce faire 80 spécimens (femelles) de chaque localité ont été conservés à -80°C. Nous avons trié de façon aléatoire 50 spécimens de chaque localité pour rechercher trois systèmes enzymatiques: les estérases, les GSTs et les monooxygénases. L'activité des enzymes pour chaque individu testé est rapportée à la concentration en protéines totales pour cet individu. Les résultats de tous ces tests ont été comparés (tests statistiques) à ceux obtenus en parallèle avec la souche d'*An. gambiae* Kisumu (N=50 pour chaque système enzymatique). La surexpression de l'activité enzymatique (Estérases, GST, Cytochrome P450) a été comparée entre les populations naturelles de chaque localité et la souche de laboratoire *An. gambiae s.s.* Kisumu, souche sensible de référence en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

#### **4.2.4. Identification PCR des espèces d'*An. gambiae* et caractérisation des mutations *kdr* L1014F, L1014S et *ace-1<sup>R</sup>***

Trente spécimens d'*An. gambiae s.l.* issus des lots des 80 spécimens de chaque localité conservés à -80°C ont été utilisés pour les analyses moléculaires. L'ADN a été extrait des

spécimens d'*An. gambiae s.l.* suivant le protocole de Collins *et al.* (1988). Après identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* (Fanello *et al.*, 2002) les spécimens ont été analysés pour la recherche des mutations *kdr* L1014F, L1014S et *ace-1<sup>R</sup>* en utilisant respectivement les protocoles de Martinez-Torres *et al.* (1998), Ranson *et al.* (2005) et de Weill *et al.* (2004). Les détails de ces protocoles peuvent être consultés dans le chapitre “Matériels et Méthodes”

Les fréquences alléliques des mutations *kdr* L1014F et *ace-1<sup>R</sup>* ont été analysées pour les tests d'équilibre d'Hardy-Weinberg des populations d'*An. gambiae s.l.* de chaque localité en utilisant les tests exacts de Fischer à l'aide du logiciel GenePop (ver.3.4).

### **4.3. Résultats**

#### **4.3.1. Diagnostic des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae s.l.***

Nous avons analysé au total 300 spécimens pour l'identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* par PCR. Les analyses ont confirmé la présence des deux espèces *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* en sympatrie dans la plupart de nos sites d'étude (figure 25). *An. arabiensis* a été observé à de faible fréquence (<10%) dans les localités de Dédougou, Houndé et Koupéla. La forme M a été principalement observée dans la zone soudano-sahélienne (Dédougou, Houndé, Koupéla et Nouna) et a été trouvée quasi dominante dans la zone irriguée de la Vallée du Kou (93%). La forme S d'*An. gambiae s.s.* a été observée dans tous les sites et prédominait dans 7 des 10 localités de l'étude. Elle a été exclusivement trouvée dans quatre localités de la zone soudanienne (Banfora, Orodara, Samblatoukoro et Soumousso). Cette distribution confirme les résultats des travaux présentés dans les autres chapitres et ceux des études déjà publiées par l'équipe de l'IRSS/Centre Muraz (Diabaté *et al.*, 2004b ; Dabiré *et al.*, 2012a).

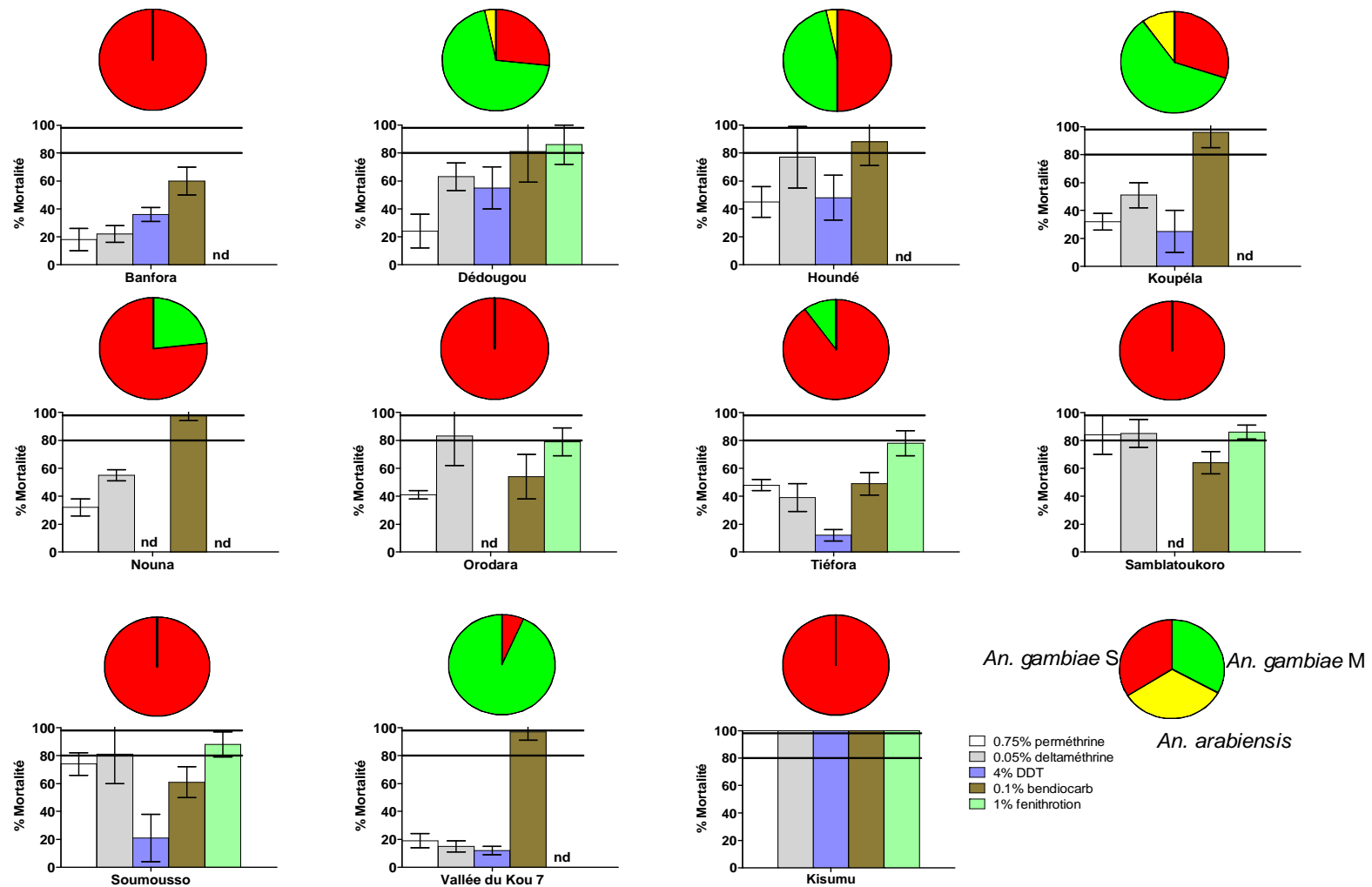


Figure 25 : Sensibilité aux insecticides et distribution des espèces d'*An. gambiae s.l.* et formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.* collectés dans 10 sites du Burkina Faso

#### 4.3.2. Sensibilité aux insecticides - Les taux de mortalité au test OMS

Aux doses diagnostiques recommandées par l’OMS, les cinq insecticides, à savoir la perméthrine 0.75%, la deltaméthrine 0.05%, le DDT 4%, le bendiocarb 0.1% et le fénitrothion 1% ont provoqué 100% de mortalité sur la souche de référence Kisumu (sensible). Les mortalités observées chez les témoins (non exposés aux insecticides) des deux souches, *An. gambiae s.l.* et Kisumu étaient inférieures à 5%. Pour cela aucune correction n’a été apportée pour les tests statistiques. Dans certains sites moins de cinq insecticides ont été testés à cause du faible nombre de spécimens. Une baisse de mortalité à plusieurs classes d’insecticides a été observée chez le vecteur majeur du paludisme (figure 25). Une résistance généralisée a été détectée avec trois insecticides : DDT 4%, perméthrine 0.75% et deltaméthrine 0.05% et très souvent dans la même population de vecteurs. Les mortalités observées après exposition à ces trois molécules restaient inférieures à 50% dans 4 des 10 sites (Banfora, Koupéla, Tiéfora et VK7) de cette étude. L’exposition au DDT 4% et à la perméthrine 0.75% a montré une résistance drastique dans tous les sites avec des taux de mortalité compris entre 10% et 70% à l’exception de la localité de Samblatoukoro où une résistance intermédiaire a été détectée (85%). Les taux de mortalité à la deltaméthrine 0.05% ont varié entre 80% et 90% dans les localités de Houndé, Orodara, Samblatoukoro et Soumousso. Dans cette étude la résistance aux CXs (bendiocarb 0.1%) et OPs (fénitrothion 1%) a été beaucoup moins marquée par rapport aux autres classes d’insecticides. Cependant les résultats des tests de sensibilité ont montré une résistance d’*An. gambiae s.l.* au bendiocarb 0.1% avec des taux de mortalité largement au dessous du seuil de 80% dans la zone d’intense pression de sélection insecticides (Banfora, Orodara, Tiefora, Samblatoukoro et Soumousso). A l’exception, dans la zone rizicole de la Vallée du Kou une sensibilité d’*An. gambiae s.l.* au bendiocarb a été enregistrée (100%). Les taux de mortalité observés après exposition au fénitrothion 1% étaient compris entre 80% et 90% indiquant une résistance intermédiaire.

#### 4.3.3. Fréquences alléliques des mutations *kdr* L1014F et *ace-1* G119S

Les tableaux XIV et XV montrent respectivement la distribution des fréquences alléliques des gènes de résistance *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>*. La mutation *kdr* L1014S n’a pas été détectée lors des analyses PCR de nos spécimens. Cependant la mutation *kdr* L1014F a été trouvée chez les deux espèces *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* à des fréquences très variables. Les fréquences les plus élevées de la mutation *kdr* L1014F ont été observées chez la forme S d’*An. gambiae s.s.* Ces fréquences sont largement au-dessus de 50% et atteignant parfois un niveau très élevé (>95%) proche de la fixation dans certains sites de l’Ouest du pays où la

pression insecticides est généralement forte (Orodara et Tiéfora). Les tests statistiques réalisés sur les populations de forme S ont montré une déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Une expansion de cette mutation a été observée chez la forme M. Elle a été observée chez toutes les populations de la forme M avec des fréquences largement au-dessus de 50% dans certaines localités de l'Ouest du Burkina notamment à la Vallée du Kou (63%) et Samblatoukoro (83%). La mutation *kdr* L1014F a été trouvée chez 2 des 5 spécimens d'*An. arabiensis* observés au cours de cette étude suggérant que cette mutation est aussi largement distribuée chez *An. arabiensis*.

La mutation *ace-1<sup>R</sup>* a été trouvée chez les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* Toutefois cette mutation n'a pas été détectée chez les 5 spécimens d'*An. arabiensis*. A l'instar de la mutation *kdr* L1014F, la mutation *ace-1<sup>R</sup>* a été détectée à des fréquences plus élevée chez la forme S comparativement à la forme M. Ces fréquences ont varié entre 14% et 27% à l'exception de la localité de Koupéla où cette mutation n'a pas été trouvée chez la population de forme S. Les analyses statistiques montrent que ces populations sont en équilibre d'Hardy-Weinberg malgré que nous n'ayons pas observé d'individus homozygotes dans nos spécimens. Les résultats montrent une présence concomitante des deux mutations *kdr* L1014F et *ace-1<sup>R</sup>* chez 47 spécimens de la forme S.

#### 4.3.4. Estérases

Les figures 26A et 26B montrent l'activité estérasique des spécimens de la souche d'*An. gambiae* « Kisumu » et des populations d'*An. gambiae s.l.* des différents sites d'étude. Les substrats utilisés au cours de cette réaction sont  $\alpha$  et  $\beta$ -naphtyl acétate.

##### **-La souche de résistance *An. gambiae* «Kisumu»**

L'activité enzymatique de la souche de laboratoire a varié de 0.02 à 0.11  $\mu\text{mol}/\alpha\text{-naphtol}/\text{mg}$  de protéine; l'activité médiane a été de  $0.048\pm 0.018 \mu\text{mol}/\alpha\text{-naphtol}/\text{mg}$ . Idem pour le  $\beta$ -naphtyl dont l'activité médiane a été de  $0.050\pm 0.019 \mu\text{mol}/\beta\text{-naphtol}/\text{mg}$ .

##### **-Les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.***

Nous avons observé une élévation de l'activité des estérases à  $\alpha$  et  $\beta$ -naphtyl dans les populations d'*An. gambiae* des localités situées dans la zone de l'Ouest, Banfora, Orodara, Samblatoukoro et Tiéfora. La comparaison de l'activité estérasique entre ces populations de moustiques sauvages et la souche Kisumu a permis d'observer une activité estérasique significativement plus élevée dans les souches d'*An. gambiae* (Mann-Whitney,  $P < 0.0001$ ). Malgré les contraintes logistiques pour évaluer cette résistance métabolique au niveau

individuel nous notons que l'activité élevée des estérases a été observée dans les localités où la forme moléculaire S était prédominante. L'activité des  $\alpha$  et  $\beta$ -estérases la plus élevée a été enregistrée à Banfora.

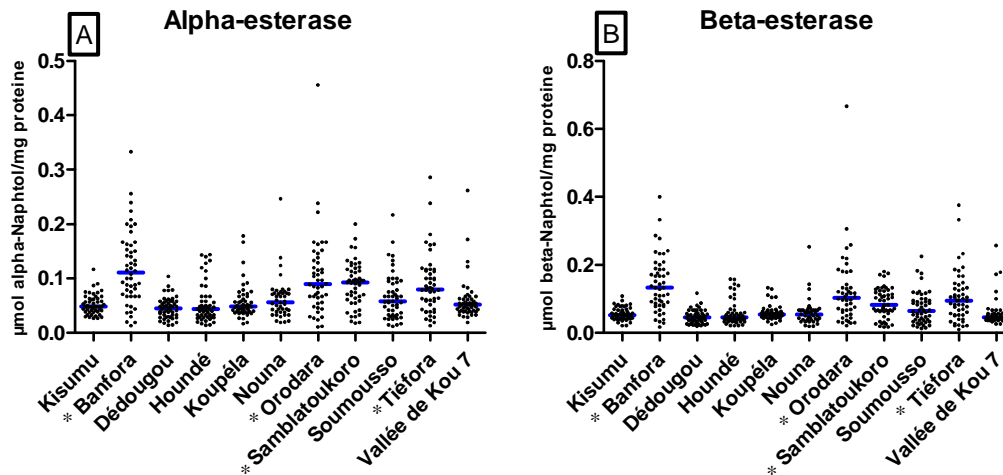


Figure 26 : Détection des estérases chez *An. gambiae s.l.* collectés dans 10 sites du Burkina Faso

#### 4.3.5. Glutathion-S-Transferase (GST)

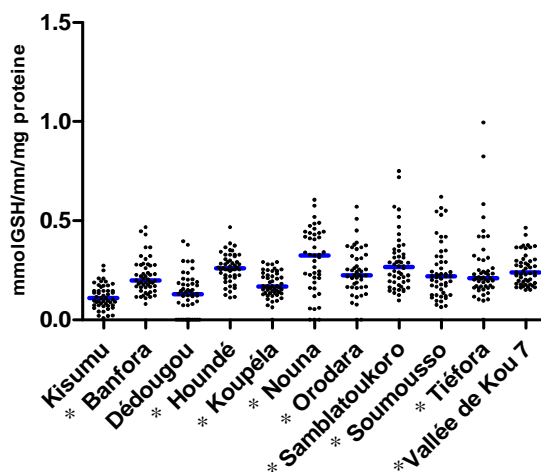
L'activité enzymatique GST a été évaluée dans les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* et chez la souche sensible de référence *An. gambiae* «Kisumu». Les résultats sont présentés dans la figure 27.

##### -La souche sensible de référence *An. gambiae* «Kisumu»

L'activité enzymatique de la souche Kisumu a varié de 0.022 à 0.273 mmol GSH/min/mg de protéine; la médiane enregistrée a été de  $0.112 \pm 0.057$  mmol GSH/min/mg.

##### -Les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.*

Une élévation de l'activité GST a été observée pour toutes les populations d'*An. gambiae s.l.*. Comparativement à l'expression enzymatique enregistrée chez la souche de référence Kisumu une différence significative est observée (Mann-Whitney,  $P < 0.001$ ), excepté la population d'*An. gambiae s.l.* de Dédougou (médiane =  $0.146 \pm 0.092$  mmol GSH/min/mg) pour laquelle aucune différence significative n'a été enregistrée comparativement à la souche de référence. L'activité enzymatique la plus élevée a été enregistrée dans la localité de Nouna.



**Figure 27 :** Détection des monooxygénases chez *An. gambiae s.l.* collectés dans 10 sites du Burkina Faso

#### 4.3.6. Monooxygénases à cytochrome P450

La figure 28 montre la distribution de l'activité des oxydases enregistrée dans les populations d'*An. gambiae s.l.* et chez la souche d'*An. gambiae* «Kisumu».

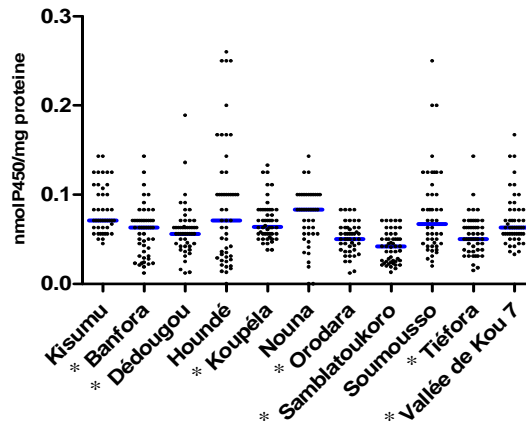
##### -La souche sensible de référence *An. gambiae* «Kisumu»

L'activité des oxydases chez la souche de référence Kisumu a varié de 0.045 à 0.143 nmol/mg d'unité-équivalent de cytochrome P450 ; l'activité médiane a été de  $0.071 \pm 0.027$  nmol/mg d'unité-équivalent de cytochrome P450.

##### -Les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.*

Une activité élevée des oxydases observée chez les populations d'*An. gambiae s.l.* de 2 sites de coton (Houndé et Nouna) n'était pas significativement différente de celle de la souche de référence. Cependant, une faible activité de ces oxydases a été enregistrée chez les populations d'*An. gambiae s.l.* des localités de Banfora, Dédougou, Koupéla, Orodara, Tiéfora, Samblatoukoro et VK7. L'activité médiane de chacune de ces populations de moustiques a montré une différence significative comparativement à la souche Kisumu (Mann-Whitney,  $P < 0.03$ ). Par contre, l'activité médiane enregistrée pour chaque population d'*An. gambiae s.s.* de Banfora, Dédougou, Koupéla, Orodara, Tiéfora et VK7 a été plus élevée que celle de Samblatoukoro avec une différence significative ( $P < 0.0001$ ).





**Figure 28 :** Détection des cytochromes P450 chez *An. gambiae s.l.* collectés dans 10 sites du Burkina Faso

**Tableau XIV :** Distribution de la fréquence de la mutation *kdr* L1014F dans les populations d'*An. gambiae s.l.* de dix sites du bassin cotonnier du Burkina Faso

	Sites	N	1014L		1014F		f(1014F)	[95%CI]	p(HW)
			1014L	1014F	1014L	1014F			
<i>An. gambiae</i> forme S	Banfora	30	4	1	25	0.85	[0.79-0.91]	<0.0001	
	Dédougou	8	4	0	4	0.50	[0.33-0.67]	0.0054	
	Houndé	15	2	1	12	0.83	[0.74-0.92]	0.0192	
	Koupéla	9	5	0	4	0.44	[0.28-0.60]	0.0029	
	Nouna	7	2	1	4	0.64	[0.46-0.82]	0.4406	
	Orodara	30	0	2	28	0.97	[0.94-1]	1	
	Samblatoukoro	27	3	0	24	0.89	[0.84-0.94]	<0.0001	
	Soumouso	30	7	0	23	0.77	[0.7-0.84]	<0.0001	
	Tiéfora	30	1	1	28	0.95	[0.92-0.98]	0.0508	
	VK7	2	0	2	0	0.50	[0.15-0.85]	1	
<i>An. gambiae</i> forme M	Banfora	0	-	-	-	-	-	-	
	Dédougou	21	8	2	11	0.57	[0.47-0.67]	0.0002	
	Houndé	14	11	2	1	0.14	[0.05-0.23]	0.2178	
	Koupéla	18	13	0	5	0.28	[0.18-0.38]	<0.0001	
	Nouna	23	10	3	10	0.50	[0.40-0.60]	0.0003	
	Orodara	0	-	-	-	-	-	-	
	Samblatoukoro	3	0	1	2	0.83	[0.62-1]	-	
	Soumouso	0	-	-	-	-	-	-	
	Tiéfora	0	-	-	-	-	-	-	
	VK7	28	3	15	10	0.63	[0.54-0.72]	0.8590	
<i>An. arabiensis</i>	Banfora	0	-	-	-	-	-	-	
	Dédougou	1	1	0	0	-	-	-	
	Houndé	1	0	1	0	0.50	[0-1]	-	
	Koupéla	3	2	0	1	0.33	[0.06-0.60]	0.2000	
	Nouna	0	-	-	-	-	-	-	
	Orodara	0	-	-	-	-	-	-	
	Samblatoukoro	0	-	-	-	-	-	-	
	Soumouso	0	-	-	-	-	-	-	
	Tiéfora	0	-	-	-	-	-	-	
	VK7	0	-	-	-	-	-	-	

N: nombre de moustiques

f(1014F): fréquence allélique de la mutation *kdr* 1014F

p(HW): probabilité de test exact de l'équilibre d'Hardy-Weinberg

[95%CI]: intervalle de confiance à 95% '-' : non déterminé

**Tableau XV :** Distribution de la fréquence de la mutation *ace-1* G119S dans les populations d'*An. gambiae s.l.* de dix sites du bassin cotonnier du Burkina Faso

	Sites	N	119G	119G	119S	f(119S)	[95%CI]	p(HW)
			119G	119S	119S			
<i>An. gambiae</i> forme S	Banfora	30	18	12	0	0.20	[0.13-0.27]	1
	Dédougou	8	5	3	0	0.21	[0.07-0.35]	1
	Houndé	15	10	5	0	0.17	[0.08-0.26]	1
	Koupéla	9	9	0	0	0	-	-
	Nouna	7	5	2	0	0.14	[0.01-0.27]	1
	Orodara	30	14	16	0	0.27	[0.19-0.35]	1
	Samblatoukoro	27	14	13	0	0.24	[0.16-0.32]	1
	Soumousso	30	21	9	0	0.15	[0.09-0.21]	1
	Tiéfora	30	19	11	0	0.18	[0.11-0.25]	1
	VK7	2	1	1	0	0.25	[0-0.55]	-
<i>An. gambiae</i> forme M	Banfora	0	-	-	-	-	-	-
	Dédougou	21	20	1	0	0.02	[0-0.05]	-
	Houndé	14	14	0	0	0	-	-
	Koupéla	18	18	0	0	0	-	-
	Nouna	23	23	0	0	0	-	-
	Orodara	0	-	-	-	-	-	-
	Samblatoukoro	3	3	0	0	0	-	-
	Soumousso	0	-	-	-	-	-	-
	Tiéfora	0	-	-	-	-	-	-
	VK7	28	28	0	0	0	-	-
<i>An. arabiensis</i>	Banfora	0	-	-	-	-	-	-
	Dédougou	1	1	0	0	0	-	-
	Houndé	1	1	0	0	0	-	-
	Koupéla	3	3	0	0	0	-	-
	Nouna	0	-	-	-	-	-	-
	Orodara	0	-	-	-	-	-	-
	Samblatoukoro	0	-	-	-	-	-	-
	Soumousso	0	-	-	-	-	-	-
	Tiéfora	0	-	-	-	-	-	-
	VK7	0	-	-	-	-	-	-

N: nombre de moustiques

f(119S): fréquence allélique de la mutation *ace-1* 119S

p(HW): probabilité de test exact de l'équilibre d'Hardy-Weinberg

[95%CI]: intervalle de confiance à 95%; '-': non déterminé

#### 4.4. Discussion

Au Burkina Faso, plusieurs études associant des tests de sensibilité aux insecticides et des analyses moléculaires pour la détection des mutations impliquées dans la résistance d'*An. gambiae s.l.* ont toujours été entreprises à l'échelle du pays depuis les années 1999 (Chandre *et al.*, 1999b; Diabaté *et al.*, 2002; Dabiré *et al.*, 2008 ; Djogbenou *et al.*, 2008b). Une augmentation du niveau de résistance aux insecticides chez les populations sauvages d'*An. arabiensis* et les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* a été reportée dans ces études. De plus, elles ont montré une augmentation importante de la fréquence allélique de la mutation *kdr* L1014F au cours de cette dernière décennie et aussi la présence de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* au sein de ces populations naturelles de vecteur notamment chez les deux formes moléculaires (Dabiré *et al.*, 2012a). Notre étude a confirmé au Burkina Faso la situation de multirésistance au sein des populations d'*An. gambiae s.l.* et l'expansion des mutations impliquées dans la résistance. Chez la forme S d'*An. gambiae s.s.* ces deux mutations *kdr* L1014F et *ace-1<sup>R</sup>* ont été trouvées chez les mêmes individus montrant ainsi la combinaison de plusieurs mécanismes de résistance au niveau individuel. Une expansion de la résistance au DDT et à la perméthrine a été observée avec une baisse notable de la sensibilité à la deltaméthrine reportée dans ces sites. Aucun cas de résistance à la deltaméthrine n'avait été détectée jusqu'en 2006. Ces résultats soulignent l'évolution rapide de la résistance aux insecticides qui constitue un phénomène dynamique dans les zones d'Afrique de l'Ouest où la culture du coton est en pleine expansion (Diabaté *et al.*, 2002 ; Ouédraogo *et al.*, 2011). Le rôle indirect de l'usage des insecticides en agriculture dans la sélection de la résistance chez le vecteur majeur du paludisme a été reporté dans plusieurs pays en Afrique et incluant le Burkina Faso (Chandre *et al.*, 1999b ; Diabaté *et al.*, 2002 ; Akogbeto *et al.*, 2006 ; Djouaka *et al.*, 2008). Le bendiocarb est préconisé en pulvérisation intradomiciliaire mais constitue aussi une alternative pour l'imprégnation des MII dans les régions où la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoides est déjà observée (Akogbeto *et al.*, 2006). Malheureusement la résistance au bendiocarb (utilisé à la dose diagnostique de 0.1%) est déjà une réalité au Burkina Faso. Notre étude a détecté la résistance d'*An. gambiae s.l.* à cet insecticide dans 5 des 10 localités étudiées. *An. gambiae s.l.* n'a été trouvé sensible au bendiocarb que dans trois localités. Cependant au Burkina Faso, le bendiocarb est utilisé en phase pilote comme une alternative dans la LAV en remplacement des pyréthrinoides dont l'efficacité est déjà compromise par l'expansion de la résistance. Malheureusement les plus hauts niveaux de résistance au bendiocarb ont été reportés dans les localités où la forme S est prédominante. Cela suggère que pour des raisons d'ordre génétique et ou écologique la

résistance aux CXs pourrait être inféodée à la forme S d'*An. gambiae s.s.* La détection de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* au sein des formes M et S pourrait justifier cette hypothèse, car cette mutation est plus fréquente chez la forme moléculaire S. Cependant les homozygotes ont été rarement détectés. Cela pourrait s'expliquer par la présence de l'allèle dupliqué appelé *ace-1<sup>D</sup>* au sein des populations sauvages d'*An. gambiae s.s.* (Labbe *et al.*, 2007 ; Djogbenou *et al.*, 2008a). Il a été montré chez *Culex pipiens* que la présence de l'allèle dupliqué *ace-1<sup>D</sup>* diminuait de façon considérable le coût génétique lié à la mutation *ace-1<sup>R</sup>* (Labbe *et al.*, 2007; Djogbenou *et al.*, 2010). Cela pourrait alors entraîner une expansion drastique de l'allèle résistant au sein des populations naturelles (Djogbenou *et al.*, 2009 ; Dabiré *et al.*, 2012a).

Cette étude pionnière sur la présence d'autres mécanismes de résistance au sein de populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* a détecté la surexpression d'enzymes de détoxification qui pourrait également être impliquées dans la résistance aux insecticides. Un niveau élevé de GST a été largement détecté. Les GSTs ont un rôle important dans la détoxification de substances xénobiotiques et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances au glutathion endogène. Les GSTs interviennent dans la dégradation des OPs et DDT et dans une moindre mesure, aux pyréthrinoides (Vontas *et al.*, 2001 ; Hémingway *et al.*, 2004). Dans cette situation de multirésistance les GSTs pourraient par combinaison avec la mutation *kdr* entraîner une augmentation du niveau de résistance au DDT et aux pyréthrinoides chez les populations sauvages d'*An. gambiae s.l.* (Vontas *et al.*, 2001). Une élévation du niveau des estérases a été reportée dans certains sites: Banfora, Orodara, Samblatoukoro et Tiéfora. L'identification moléculaire des spécimens de ces localités a révélé que les populations étaient principalement composées de la forme S d'*An. gambiae s.s.* Aucune surexpression des estérases n'a été rapportée dans les localités où la forme M était prédominante. L'augmentation de l'activité des estérases est due à une duplication de gènes qui pourraient être impliqués dans la résistance aux OPs et CXs chez un certain nombre d'arthropodes incluant les moustiques, les tiques, les pucerons et les blattes (Hémingway *et al.*, 2004). Les estérases pourraient contribuer à l'augmentation du niveau de résistance aux OPs et CXs chez la forme S dans les localités où la mutation *ace-1<sup>R</sup>* a été concomitamment observée. Récemment des études ont montré en utilisant les microarrays que les estérases ne sont pas impliquées ou le sont à un degré moindre dans la dégradation du DDT et des pyréthrinoides (Djouaka *et al.*, 2008 ; Muller *et al.*, 2008a ; Mitchell *et al.*, 2012). L'élévation du niveau des estérases pourrait également avoir une origine génétique ou écologique qui les différencie de la souche de référence Kisumu. Comparativement à la souche de laboratoire

Kisumu, aucune élévation du niveau des monooxygénases (cytochrome P450) n'a été observée dans nos sites d'étude. Les analyses biochimiques permettent de faire une estimation globale de la surexpression d'enzyme. Cependant plusieurs gènes dont l'expression enzymatique diffère suivant les populations de moustiques pourraient être impliqués dans la résistance. Cela a été montré par plusieurs études qui ont utilisé les microarrays (Djouaka *et al.*, 2008 ; Muller *et al.*, 2008b).

La situation de multirésistance chez *An. gambiae s.l.* au Burkina Faso pourrait constituer un obstacle pour la mise en place de nouvelles stratégies de lutte contre le paludisme basée sur l'utilisation des MILDA et les PID.

#### **Conclusion partielle 4**

La détection des enzymes de détoxification chez les populations d'*An. gambiae s.l.* résistantes à plusieurs classes d'insecticides avec la présence concomitante des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* montre l'extrême urgence de rechercher de nouvelles stratégies de gestion de la résistance au Burkina Faso. Cette multirésistance pourrait à court terme entraîner sur le plan opérationnel des baisses d'efficacité des outils actuels de lutte contre les vecteurs du paludisme. Le présent travail montre que plusieurs types de mécanismes de résistance aux insecticides sont en pleine évolution dans les populations d'*An. gambiae s.l.* du Burkina Faso. Un gros travail reste à faire afin de déterminer l'impact opérationnel de cette multirésistance sur l'efficacité des MILDA et les PID qui constituent jusqu'à nos jours les moyens les plus utilisés sur le plan opérationnel dans la lutte antivectorielle. Dans ce contexte de généralisation de la résistance chez les populations de vecteurs l'accent devrait être mis sur le renforcement des stratégies alternatives basées sur la combinaison des PYs avec des non PYs ou la mise au point de nouvelles molécules.

# **CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES**

## CONCLUSION

Bien que l'étude de la résistance des vecteurs aux insecticides au Burkina Faso date de la fin des années 60 suite à l'émergence de la résistance des vecteurs aux organochlorés, elle demeure toujours plus d'un demi-siècle après une question d'actualité. La connaissance sur la bio-écologie des vecteurs ayant été substantiellement améliorée, la lutte antivectorielle étant essentiellement basée sur l'utilisation de matériaux imprégnés d'insecticides en l'occurrence les MILDA, le suivi de la résistance des vecteurs aux insecticides présente alors un intérêt capital pour les programmes de lutte contre le paludisme.

Notre étude a montré qu'au Burkina Faso, la répartition géographique des vecteurs dans leur ensemble varie en premier lieu en fonction des faciès éco-climatiques. Mais d'autres facteurs de second niveau notamment anthropiques en l'occurrence les aménagements hydro-agricoles et l'urbanisation modulent la répartition de ces espèces au sein de ces grands ensembles. C'est le cas bien documenté d'*An. arabiensis* qui s'installe désormais dans les deux plus grandes villes du pays.

Par ailleurs, le niveau de résistance actuel des vecteurs aux insecticides a significativement augmenté comparé à celui des années 2000 avec des foyers de multirésistance impliquant la résistance métabolique et génétique aux pyréthrinoides et aux OPs/CXs et une extension géographique dans des zones jadis exemptes de résistance. Cette généralisation de la résistance pourrait affecter l'efficacité des outils de lutte comme les MILDA et les PID.

Les facteurs qui favorisent la propagation de la résistance sont liés à la fois à la bio-écologie du vecteur, du mécanisme de résistance impliqué et surtout de la pression de sélection exercée sur les vecteurs. Ainsi le rôle de l'utilisation agricole des insecticides dans la sélection de cette résistance avait déjà été mis en évidence par les travaux de notre équipe pendant toute cette dernière décennie.

Notre hypothèse était de voir si l'introduction en 2008 de pratiques agricoles innovantes utilisant peu ou pas d'insecticides tels que le coton biologique et le coton *Bt* pourrait diminuer la pression de sélection et par conséquent réduire le niveau de résistance des vecteurs à ces insecticides. En fonction des aires de couverture de ces nouvelles pratiques cotonnières au Faso, la cartographie de la résistance des populations d'*An. gambiae s.l.* a été réactualisée depuis la dernière étude publiée en 2012 (Dabiré *et al.*, 2012a). En relevant l'évolution de la résistance aux pyréthrinoides et aux OPs/CXs dans ces nouvelles zones cotonnières, il n'a été

observé aucune modification allant dans le sens d'une augmentation de la sensibilité des vecteurs aux insecticides au cours des 3 dernières années après introduction de ces pratiques. La principale raison serait que le temps mis pour recouvrer un environnement sain débarrassé des résidus d'insecticides sources de sélection de la résistance au niveau des gîtes larvaires soit trop court pour amorcer cette reconversion. La deuxième raison est que globalement quoique certaines superficies aient été converties en aires de coton *Bt* ou biologique, il existerait toujours une interférence entre celles-ci et les surfaces des zones conventionnelles qui ne sont pas géographiquement isolées des autres champs bio ou *Bt*. La conséquence qui en résulterait est que les gîtes larvaires continuent de recevoir les résidus d'insecticides des pratiques conventionnelles qui parsèment la localité. La troisième raison est que les producteurs ne respecteraient pas pour l'instant l'itinéraire technique adapté aux cotons *Bt* et biologique et continueraient d'utiliser de l'insecticide même à faible fréquence d'utilisation ce qui n'aurait pas changé des pratiques fortement tributaires d'insecticides.

Cependant des échantillons représentatifs des collections d'eau prélevées depuis 2008 sur le terrain lors des différentes enquêtes sont conservés à -20°C pour des analyses par HPLC. Ces analyses sont nécessaires afin de suivre l'évolution des principaux composés insecticides ainsi que leurs métabolites depuis l'introduction de ces pratiques innovantes jusqu'à nos jours. De nombreux travaux restent à faire car la mutation *kdr* L1014F est encore observée à des fréquences alléliques très élevées et ce quelque soit le faciès cotonnier (*Bt*, bio, conv) ou la zone climatique. Un suivi régulier de la résistance de ces vecteurs est plus que nécessaire afin de disposer de données depuis l'introduction jusqu'à la stabilisation de ces pratiques nouvelles peu consommatrices d'insecticides. La recherche devrait également s'orienter vers l'investigation d'autres gènes de résistance tel le N1575Y qui pourraient favoriser la complexité du faciès multirésistant au Burkina Faso.

En définitive le pattern de distribution de la sensibilité des vecteurs aux insecticides affiche toujours une forte résistance des vecteurs aux PYs et au DDT dans les zones cotonnières anciennes de l'Ouest avec une sensibilité moyenne aux carbamates (bendiocarb) et totale aux organophosphorés (CM et fénitrothion). Les fréquences alléliques de la mutation L1014F *kdr* qui en résultent sont très élevées approchant la fixation dans certains sites de l'Ouest (Orodara) surtout au niveau de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* s.s. avec une augmentation et une expansion remarquable dans la forme moléculaire M où elle n'avait été détectée qu'à une fréquence de 2% dans une seule localité en 2000. Elle est actuellement aussi



détectée dans les populations d'*An. arabiensis* à des fréquences atteignant 30% surtout dans les nouvelles zones cotonnières du Centre-Est du pays jadis exemptes de *kdr*.

La présente étude nous a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de la mutation *kdr* L1014S aussi bien chez les formes M et S d'*An. gambiae s.s.* qu'au sein des populations d'*An. arabiensis* au Burkina Faso. Cependant d'importants travaux de séquençage des introns proches de la mutation *kdr* sont nécessaires pour savoir l'origine de cette mutation (apparition spontanée ou migration de proche en proche depuis le Bénin voisin où elle a été identifiée (Djègbè *et al.*, 2011). Ceci devrait aussi permettre de répondre à la question de savoir si la mutation est apparue indépendamment chez les différentes espèces et formes moléculaires ou s'il y a eu introgression de la mutation d'une forme à une autre comme ce fut le cas pour la mutation L1014F *kdr* (Weill *et al.*, 2000 ; Diabaté *et al.*, 2004a). L'apparition de la mutation *kdr* L1014S a été observée indépendamment dans les deux bassins cotonniers Ouest (ancien) et Centre-Est (nouvel) du Burkina ce qui ne permet pas d'établir une relation directe entre son émergence et l'histoire des pratiques agricoles pour la protection du cotonnier. Toutefois, observée principalement dans les zones cotonnières, sa présence serait aussi liée à la pression de sélection exercée dans ses zones cotonnières qu'elles soient anciennes ou nouvelles même si elle a été aussi détectée dans les populations urbaines d'*An. arabiensis* à Bobo-Dioulasso. Ceci suggère l'influence secondaire de la pression de sélection due à l'utilisation d'insecticides à des fins domestiques ou en maraîchage péri-urbain.

Le présent travail a aussi présenté la première étude menée sur la distribution de la résistance métabolique au sein des populations d'*An. gambiae* au Burkina Faso.

La surexpression de GST détectée dans les populations d'*An. gambiae s.s.* serait à l'origine de la résistance au DDT. Les GSTs agissent par élimination d'une molécule de chlore du DDT pour former un composé moins toxique, une augmentation du taux de déchloration a été observé chez *Aedes aegypti* (Grant *et al.*, 1991) et *An. gambiae* (Prapandathadara *et al.*, 1995) résistants au DDT. Quant aux estérases, la surexpression observée au sein de nos populations serait à l'origine de la résistance aux CXs et aux OPs. En effet les estérases entraînent une séquestration rapide des insecticides accompagnée d'une hydrolyse (Karunaratne *et al.*, 1995). Dans cette étude la surexpression d'estérase a été prépondérante chez la forme moléculaire S d'*An. gambiae*. Hemingway *et al.* (1983) avait attribué la résistance d'*An. arabiensis* au malathion à la surexpression d'estérase.

Les fréquences alléliques de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* principal mécanisme de résistance aux OPs/CXs reportées dans la présente étude ne diffèrent pratiquement pas de celles observées

par Dabiré *et al.* (2012a) sans aucune différence notable entre zones cotonnières *Bt*, bio et conventionnelle. Cette mutation est tout simplement prépondérante dans les zones cotonnières de l'Ouest comme du Centre-Est au sein des deux formes moléculaires S et M d'*An. gambiae s.s.* avec une fréquence allélique plus élevée au sein de la forme S. Aucun individu d'*An. arabiensis* n'a jusque-là été trouvé porteur de cette mutation.

La présence concomitante des mutations *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* et la résistance métabolique est particulièrement alarmante et nécessite un suivi précis et des recherches visant à en comprendre l'origine et à en évaluer l'impact opérationnel sur l'efficacité des stratégies de lutte actuellement mises en place par le Programme National de Lutte contre le Paludisme. Il faut donc envisager un suivi régulier du niveau de résistance et rechercher les mécanismes en présence car tout moyen de lutte basée sur l'utilisation des insecticides nécessite entre autres une bonne connaissance de ces deux facteurs.

En perspectives, il serait important d'approfondir davantage ce travail sur les aspects scientifiques et opérationnels. Au niveau scientifique il serait intéressant de:

- i) compléter les analyses pour obtenir les fréquences alléliques du *kdr* L1014S dans tous les 28 sites d'étude afin de mieux cerner la répartition géographique de cette mutation au Burkina Faso. Il serait d'ailleurs possible d'analyser les spécimens des années précédentes pour mieux exprimer l'évolution de cette mutation au Burkina Faso ;
- ii) faire un séquençage pour comprendre le sens de l'introgession de cette mutation *kdr* L1014S entre les formes M et S d'*An. gambiae s.s.* ;
- iii) mieux comprendre le comportement et le phénotype des populations multirésistantes vis-à-vis des quatre classes d'insecticides ;
- iv) investiguer le lien fonctionnel entre ces mutations de résistance (*kdr* L1014S-L1014S, *ace-1<sup>R</sup>*, résistance métabolique etc).

Au niveau opérationnel, il serait plus judicieux

- v) d'étudier l'impact de cette multirésistance des populations d'*An. gambiae* sur le niveau d'efficacité des outils de lutte notamment les MILDA comme il a été réalisé au Bénin (N'Guessan *et al.*, 2007 ; Asidi *et al.*, 2012) ;

- vi) d'expérimenter d'autres formulations combinant PYs et OP/CX ou d'OP/CX seuls ou tout simplement de nouveaux insecticides pour le contrôle effectif de telles populations résistantes d'*An. gambiae s.l.*

Dans l'optique d'asseoir une bonne base de management de la résistance des vecteurs qui découle en grande partie même si indirectement, des pratiques agricoles, nous suggérons l'élaboration, au niveau national, de politiques et de principes directeurs relatifs à l'usage des pesticides dans l'optique d'une co-gestion de la résistance des insectes d'intérêt agricole et médical. Nous préconisons dans ce cas une collaboration très étroite des ministères de l'Agriculture, de l'Environnement et de la Santé pour mieux asseoir la base d'une agriculture durable, respectueuse de l'environnement et qui se soucie de la santé de nos populations. Un choix sélectif et judicieux des pesticides à utiliser serait d'une importance capitale car la liste de pesticides appropriés et encore efficaces va en diminuant et la mise sur le marché de nouveaux insecticides de rechange reste toujours incertaine.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références

- Abott W.S., 1925. A simple method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-7.
- Adam J.P., Binson G., Baily H., Eyraud M., Hamon J., 1958. Présence du gène de résistance au Dieldrin chez *Anopheles gambiae* Giles en basse Côte d'Ivoire (A.O.F.). *Bull Soc Path Exot* 51: 326-329.
- Akogbeto M., Djouaka R.F., Kinde-Gazard D.A., 2006. Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malar J* 5: 22.
- Alonso P.L., Lindsay S.W., Armstrong J.R.M., Conteh M., Hill A.G., David P.H., Fegan G., Francisco A., Hall A.J., Shenton F.C., Cham K and Greenwood B.M., 1991. The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of gambian children. *Lancet* 337: 1499-1502.
- Alonso P.L., Lindsay S.W., Armstrong Schellenberg J.R.M., Keita K., Gomez P., Shenton F.C., Hill A.G., David P.H., Fegan G., Cham K., Greenwood B.M., 1993. A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in 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(2): 37-44.
- Anonyme 1997. Rapport technique sur la campagne agricole cotonnière 1996/97. 33P.
- Antonio-Nkondjio C., Simard F., Cohuet A and Fontenille D., 2002. Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles moucheti*, is not indicative of speciation: evidence from sympatric south Cameroon populations. *Infection Genetics and Evolution* 2: 69-72.
- Armstrong J.A., Ramsdale C.D., Ramakrishna V., 1958. Insecticide resistance in *An. gambiae* Giles in Western Sokoto, Northern Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 52: 247-256.
- Askjaer N., Maxwell C., Chambo W., Staalsoe T., Nielsen M., Hviid L., Curtis C., Theander N., 2001. Insecticide-Treated bed nets reduce plasma antibody levels and limit the repertoire of antibodies to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. *Clin Diag Lab Immunol* 8: 1289-1291.
- Asidi A., N'guessan R., Akogbeto M., Curtis C., Rowland M., 2012. Loss of Household Protection from Use of Insecticide-Treated Nets against Pyrethroid-Resistant Mosquitoes, Benin. *Emerg Infect Dis* 18 (7): 1101-6.
- Awolola T.S., Okwa., Hunt R.H., Ogunrinade A.F., Coetzee M., 2002. Dynamics of the malaria-vector populations in coastal Lagos, south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 96(1):75-82.
- Awolola T.S., Oduola A.O., Obansa J.B., Chukwurar N.J., Unyimadu J.P., 2007. *Anopheles gambiae* s.s. breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria. *J Vector Borne Dis* 44: 241-244.

- Awolola T.S., Oyewole I.O., Amajoh C.N., Idowu E.T., Ajayi M.B., Oduola A., Manafa O.U., Ibrahim K., Koekemoer L.L., Coetzee M., 2005. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Trop* 95 : 204-209.
- Ayres C.F., Müller P., Dyer N., Wilding C.S., Rigden D.J., Donnelly M.J., 2011. Comparative genomics of the anopheline glutathione S-transferase epsilon cluster. *PLoS ONE* 6(12): e29237.
- Badolo A., Traoré A., Jones C.M., Sanou A., Flood L., Guelbeogo W.M., Ranson H., Sagnon NF., 2012. Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise? *Malar J* 11: 232 doi:10.1186/1475-2875-11-232.
- Baldet T., 1995. Etude comparative de deux strategies de lutte contre *Culex quiquefasciatus* Say, 1823 par *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 dans la ville de Maroua (Nord Caameroun). *Thèse Université Montpellier II* 294p.
- Bass C., Nikou D., Donnelly M.J., Williamson M.S., Ranson H., Ball A., Vontas J., Field L.M., 2007. Detection of knockdown resistance (*kdr*) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar J* 6: 111.
- Berticat C., Bonnet J., Duchon S., Agnew P., Weill M., Corbel V., 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol Biol* 8(8): 104.
- Binka F.N., Kubaje A., Adjuik M., Williams L.A., Lengler C., Maude G.H., Arma G.E., Kajjihra B., Adiama J.H., Smith P.G., 1996. Impact of permethrin treated bednets on child mortality in kassena-Nankana district, Ghana : a randomized trial. *Trop Med Int Health* 1: 147-154.
- Boccoloni D., Carrara G.C., Cani P.J., Costantini C., 2002. Preliminary data on *An. funestus* chromosomal polymorphism in a peri-urban site of Western Angola. *Parassitologia* 44: 22.
- Boccoloni D., Carrara G.C., Dia I., Fortes F., Cani P.J., Costantini C., 2005. Chromosomal differentiation of *An. funestus* from Luanda and Huembo provinces, Western and Central Angola. *Am J Trop Med Hyg* 73(6): 1071-6.
- Bouma M.J., Parvez S.D., Nesbit R., Winkler A.M., Winkler A.M., 1996. Malaria control using permethrin applied to tents of nomadic Afghan refugees in Northern Pakistan. *Bull World Health Organ* 74 (4): 413-21.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brogdon W.G., McAllister J.C., 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 4: 605-613.

- Burkot T.R., Williams J.L., Scheinder I., 1987. Identification of *Plasmodium falciparum* infected- mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 33: 783-788.
- Carnevale P., Robert V., Boudin C., Halna J-M., Pazart L., Richard A., Mouchet J., 1988. La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides au Burkina Faso. *Bull Soc Path Exo* 81(5): 832-846.
- Carnevale P., Mouchet J., 1990. Lutte antivectorielle et lute antipaludique. *Med Trop* 50: 391-338.
- Casimiro S., Coleman M., Hemingway J., Sharp B., 2006. Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique. *J Med Entomol* 43: 276-282.
- Cavalié Ph., Mouchet J., 1961. Les campagnes expérimentales d'éradication du paludisme dans le nord de la république du Cameroun. *Med Trop* 21: 847-870.
- Chandre F., Darriet F., Doannio J.M., Riviere F., Pasteur N., Guillet P., 1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *J Med Entomol* 34: 664-671.
- Chandre F., Darriet F., Manga L., Akogbeto M., Faye O., Mouchet J., Guillet P., 1999a. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ* 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 Assoc* 15: 53-59.
- Chandre F., Darriet, F., Duchon, S., Finot, L., Manguin, S., Carnevale, P., Guillet P., 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol* 14: 81-88.
- Chapman R.F., 1969. The insects structure and function. *The English universities Press Ltd London, UK* : 819p.
- Chauvet G., Rajaonarivelo E., 1973. Modification de comportement d'une espèce et variation de la composition d'une population appartenant au complexe *Anopheles gambiae* pendant et après des pulvérisations d'insecticides domiciliaires dans les environs de Tananarive (Madagascar). *Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd Parasitol* 11(3):155-167.
- Chouaibou M., Etang J., Brevault T., Nwane P., Hinzoumbe C.K., Mimpfoundi R., Simard F., 2008. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop Med Int Health* 13: 476-486.
- Choumara R., Hamon J., Ricossé J., Bailly H., Adam J.P., 1959. Le paludisme dans la zone pilote de Bobo-Dioulasso. *Cah ORSTOM* 1: 1-125.

- Clarke T., 2002. Mosquitoes minus malaria. *Nature* 419: 429-430.
- Coetzee M., Craig M., le Sueur D., 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* 16: 74-77.
- Collins F.H., Petrarca V., Mpofo S., Brandling-Bennett A.D., Were J.B., Rasmussen M.O., Finnerty V., 1988. Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected *Anopheles gambiae* complex mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 39 (6): 545-50.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., Di Deco M.A., 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 483-497.
- Coluzzi M., 1993. Advances in the studies of afrotropical malaria vectors. *Parassitologia* 35 (2): 23-29.
- Coluzzi M., 2000. [Malaria eradication in Calabria, residual anopheles and transmission risk]. *Parassitologia* 42(3-4):211-7.
- Coluzzi M., Sabatini A., della Torre A., Di Deco M.A., Petrerca V., 2002. A polytene chromosome analysis of *Anopheles gambiae* complex. *Science* 298: 1415-1418.
- Culuzzi M., 1984. Heterogeneities of malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull World Health Org* 62: 107-113.
- Culuzzi M., Petrarca V., Dideco M.A., 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles*. *Boll Zool* 52: 45-63.
- Corbel V., N'Guessan R., Brengues C., Chandre F., Djogbenou L., Martin T., Akogbeto M., Hougaard J.M., Rowland M., 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* 101: 207-216.
- Costantini C., Sagnon N., Ilboudo-Sanogo E., Coluzzi M., Boccolini D., 1999. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* 41: 595-611.
- Costantini C., Badolo A., Ilboudo-Sanogo E., 2004. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535 and KBR-3023 against *An. gambiae* complex and other afrotropical vectors mosquitoes. *Trop Med Hyg* 98: 644-652.
- Costantini C., Ayala D., Guelbeogo W.M., Pombi M., Some C.Y., Bassole I.H., Ose K., Fotsing J.M., Sagnon N., Fontenille D., Besansky N.J., Simard F., 2009. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol* 9: 16.
- Coz J., Davidson G., Chauvet G., Hamon J., 1968. Résistance des anopheles aux insecticides en Afrique tropicale et Madagascar. *Cahier ORSTOM Série Ent Med* VI (3/4) 1653.



- Coz J., Hamon J., Sales S., Eyraud M., Brengues J., Subra R., Accrombessi R., 1966. Etudes entomologiques sur la transmission du paludisme humain dans une zone de forêt humide dense, la région de Sassandra, République de Côte d'Ivoire. *Cahier ORSTOM Ser Ent Med Parasitol* 7: 13-42.
- Czeher C., Labbo R., Arzika I., Duchemin J.B., 2008. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J* 7 :189.
- D'Alessandro U., Olaleye B.O., McGuire W., Langerock P., Bennett S., Aikins M.K., Thomson M.C., Cham M.K., Cham B.A., Greenwood B.M., 1995. Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednets programme. *Lancet* 345: 479-483.
- Dabiré K.R., Baldet T., Diabaté A., Dia I., Costantini C., Cohuet A., Guiguemdé T.R., Fontenille D., 2007. *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticides resistance status and role in malaria transmission. *J Med Entomol* 44(6): 990-997.
- Dabiré K.R., 2008. Le paludisme dans les savanes africaines: bio-écologie, transmission et résistance des vecteurs aux insecticides au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest). *Thèse de doctorat, Dakar* 1, 159p.
- Dabiré K.R., Diabaté A., Djogbenou L., Ouari A., N'Guessan R., Ouédraogo J.B., Hougard J-M., Chandre F., Baldet T., 2008. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J* 7: 188.
- Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Toe K.H., Ouari A., Kengne P., Bass C., Baldet T., 2009a. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 1113-1120.
- Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Kengne P., Simard F., Bass C., Baldet T., 2009b. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa). *Trop Med Int Health* 14, 396-403.
- Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Wondji C., Chandre F., Simard F., Ouédraogo J.B., Martin T., Weill M., Baldet T., 2012a. Trends in Insecticide Resistance in Natural Populations of Malaria Vectors in Burkina Faso, West Africa: 10 Years' Surveys. In: Perveen F, editors. *Insecticides - Pest Engineering*. ISBN. InTech: pp. 479-502.
- Dabiré K.R., Namountougou M., Sawadogo S.P., Lassina B.Y., Toé K.H., Ouari A., Gouagna L-C., Simard F., Chandre F., Baldet T., Bass C., Diabaté., 2012b. Population dynamics of *Anopheles gambiae* s.l. in Bobo-Dioulasso city: bionomics, infection rate and susceptibility to insecticides. *Parasit Vectors* 5:127.
- Darriet F., Robert V., Tho View N., 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 pyréthrinoides dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parassitologia* 33 : 111-119.
- della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-Yovo J., Favia G., Petrarca V., Coluzzi M., 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 10(1): 9-18.
- della Torre A., Costantini C., Besansky N.J., Caccone A., Petrarca V., Powell J.R., Coluzzi M., 2002. Speciation within *Anopheles gambiae* - The glass is half full. *Science* 298: 115-117.
- della Torre A., Tu Z., Petrarca V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Bioch Mol Biol* 35: 755-769.
- Dia I., Diop T., Rakotoarivony I., Kengne P., Fontenille D., 2003. Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* Theobald (Diptera : Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a sudano- guinean zone (Ngari, Sénégal). *J Med Entomol* 40 (3): 279-283.
- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Akogbeto M., Darriet F., Brengues C., Guiguemdé T.R., Guillet P., Hemingway J., Hougard J.M., 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 67: 617-622.
- Diabaté A., 2003. Le paludisme au Burkina Faso: étude de la transmission et répartition géographique de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux pyréthrinoides. *Thèse de doctorat, Montpellier 2*, 123p.
- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K.R., Kengne P., Simard F., Guiguemdé T.R., Guillet P., Hemingway J., Hougard J.M., 2003. Kdr mutation, genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. *J. Med. Entomol* 40(2): 195-198.
- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K.R., Simard F., Ouédraogo J-B., Guillet P., Hougard J-M., 2004a. First report of *kdr* mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. *J Am Mosq Control Ass* 20 (2): 195-196.
- Diabaté A., Brengues C., Baldet T., Dabiré K.R., Hougard J.M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J., Chandre F., 2004b. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health* 9: 1267-1273.
- Diabaté A., Dabiré K.R., Kengne P, Baldet T., Ouari A., Costantini C., Simard F., Fontenille D., 2006. Mixed-swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* in a sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol* 43: 480-483.

- Djegbe I., Boussari O., Sidick A., Martin T., Ranson H., Chandre F., Akogbeto M., Corbel V., 2011. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J* 10: 261.
- Djogbenou L., Chandre F., Berthomieu A., Dabire K.R., Koffi A., Alout H., Weill M., 2008a. Evidence of introgression of the *ace-1*(R) mutation and of the *ace-1* duplication in West African *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS ONE* 3: e2172.
- Djogbenou L., Dabire R., Diabaté A., Kengne P., Akogbeto M., Hougard J.M., Chandre F., 2008b. Identification and geographic distribution of the ACE-1<sup>R</sup> mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg* 78: 298- 302.
- Djogbenou L., Labbé P., Chandre F., Pasteur N., Weill M., 2009. Ace-1 duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. *Malar J* 8:70.
- Djogbenou L., Noel V., Agnew P., 2010. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar J* 9: 12.
- Djouaka R.F., Bakare A.A., Coulibaly O.N., Akogbeto M.C., Ranson H., Hemingway J., Strode C., 2008. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9: 538.
- Doannio J.M.C., Dossou-Yovo J., Diarrasouba G., Chauvancy G., Darriet F., Chandre F., Henry M.C., Nzeymana I., Guillet P., Carnevale P., 1999. Efficacité des moustiquaires pré-imprégnées de perméthrine OLYSET en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoides I. Evaluation entomologique. *Med Trop* 59: 349-354.
- Dongus S., Nyika D., Kannady K., Mtasiwa D., Mshinda H., Fillinger U., Drescher A.W., Tanner M., Castro M.C., Killeen G.F., 2007. Participatory mapping of target areas to enable operational larval source management to suppress malaria vector mosquitoes in Dar es Salaam, Tanzania. *Int J Health Geogr* 6(1): 37.
- Eisele T.P., Lindblade K.A., Wannemuehler K.A., Giming J.E., Odhiambo F., Hawley W.A., Ter Kuile F.O., Howards P.P., Rosen D.H., Nahlen B.L., Vulue J.M., Slutsker L., 2005. Effect of sustained insecticide-treated bed net use on all-cause child mortality in an area of intense perennial malaria transmission in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 73(1): 149-156.
- Eldefrawi A.T., 1976. The acetylcholine receptor and its interaction with insecticide. In insecticide biochemistry and physiology, ed. C.F. Wilkinson. *Plenum Press New York* 297-326.
- Elissa N., Mouchet J., Riviere F., Meunier J.Y., Yao K., 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* ss to pyrethroids in Cote d'Ivoire. *Ann Soc Bel Med Trop* 73: 291-294.
- Elliot M., Janes N.F., 1978. Synthetic pyrethroids - a new class of insecticide. *Chemical*

*Society Review* 7: 473-505.

- Elliot M., 1989. The pyrethroids: early discovery, recent advance and the future. *Pesticide Science* 27: 337-351.
- Etang J., Fondjo E., Chandre F., Morlais I., Brengues C., Nwane P., Chouaibou M., Ndjemai H., Simard F., 2006. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 74: 795-79.
- Fanello C., Santolamazza F., della Torre A., 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol* 16: 461-464.
- Fanello C., Petrarca V., della Torre A., Santolamazza F., Dolo G., Coulibaly M. Allouche A., Curtis C.F., Toure Y.T., Coluzzi M., 2003. The pyrethroid knockdown resistance gene in the *An. gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 12: 241-245.
- Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Siden-Kiamos I., Louis C., 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 10: 19-23.
- Feyereisen R., 1999 - Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44:507-33.
- Fontenille D., Campbell G.H., 1992. Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar? *Am J Trop Med Hyg* 56(3): 247-253.
- Fontenille D., Lochouart L., 1999. The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia* 41: 267-271.
- Fournet F., Maud C., Ouari A., Meyer P-E., Toé H.K., Gouagna L.C., Dabiré K.R., 2010. Diversity in anopheline larval habitats and adult composition during the dry and wet seasons in Ouagadougou (Burkina Faso). *Malar J* 9:78.
- Gillies M., de Meillon B., 1968. The *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Inst Med Res* 54: 343.
- Gillies M.T., Coetzee M., 1987. A supplement to the *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Vol. 55. In *Publications of the South African Institute of Medical Research, Johannesburg, South Africa* 143.
- Gimonneau G., Boyer J., Morand S., Besansky J.N., Diabaté A., Simard F., 2010. A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behavioral Ecology* 21: 1087-1092.
- Gimig J.E., Lindblade K.A., Mount D.L., 2005. Laboratory wash resistance of long-lasting insecticidal nets. *Trop Med Int Health* 10(10): 1022-1029.
- Graham K., Rehman H., Ahmad M., Kamal M., Khan I., Rowland M., 2004. Tents pretreated with insecticide for malaria control in refugee camps : an entomological evaluation.

*Malar J* 3: 25.

- Graham K., Kayedi M.H., Maxwell C., Kaur H., Rehman H., Malima R., Curtis C.F., Rowland M., 2005. Multi-country field trials comparing wash-resistance of permanent and conventional insecticide-treated nets against anopheline and culicine mosquitoes. *Med Vet Entomol* 19: 72-83.
- Grant D.F., Dietze E.C., Hammock B.D., 1991. Glutathione S-transferase isoenzymes in *Aedes aegypti*: purification, characterisation, and isoenzyme-specific regulation. *Insect Biochemistry* 21: 421-433.
- Guelbéogo W.M., Grushko O., Boccolini D., Ouedraogo P.A., Besansky N.J., Sagnon N-F., Costantini C., 2005. Chromosomal evidence of incipient speciation in the Afrotropical malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Med Vet Entomol* 19: 458-469.
- Guillet P., N'Guessan R., Darriet F., Traore-Lamizana M., Chandre F., Carnevale P., 2001. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol* 15: 105-112.
- Guimaraes R.M., Asmus C.I.R.F., Meyer A., 2007. DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health. *Cad Saude Publica* 23(12): 2835-2844.
- Hamon J., Adam J.P., Grjebine A., 1956. Observations sur la répartition et le comportement des anophèles de l'Afrique Equatoriale française, du Cameroun et de l'Afrique occidentale. *Bulletin of the World Health Organization* 15: 541-591.
- Hamon J., Mouchet J., 1961. Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. *Médecine Tropicale* 21: 643-660. @
- Hamon J., 1963. Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta). Cycles d'agressivité et variations saisonnières. *Ann Soc Ent France* 132: 85-144.
- Hamon J., 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., Mouchet J., Chauvet G., Lumaret R., 1963. Bilan de 14 années de lutte contre les vecteurs de paludisme dans les pays francophones d'Afrique tropicale et à Madagascar, considérations sur la persistance de la transmission et perspectives d'avenir. *Bull Soc Path Exot* 56: 933-971.
- Hamon J., Sales S., Venard P., Coz J., Brengues J., 1968a. The presence in southwest Upper Volta of populations of *Anopheles funestus* Giles resistant to dieldrin. *Med Trop* 28: 221-226.
- Hamon J., Subra R., Sales S., Coz J., 1968b. Presence in the southwestern part of Upper Volta of a population of *Anopheles gambiae* "A" resistant to DDT. *Med Trop* 28: 521-528.
- Hamon J., Mouchet J., Brengues J., Chauvet G., 1970. Problems facing anopheline vector

- control measures. *Miscellan. Pub Entomol Soc Amer* 1: 28-44.
- Hassal K.A., 1990. The biochemistry and uses of pesticides: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. *VCH Publ Inc New York, USA*. 536 p.
- Haubruge E., Amichot M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol Agron Soc Environ* 2 (3): 161-174.
- Hemingway J., Callaghan A., Amin A.M., 1990. Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Med Vet Entomol* 4: 275-282.
- Hemingway J., Davidson G., 1983. Resistance to organophosphate and carbamate insecticides in *Anopheles atroparvus*. *Parassitologia* 25: 1-8.
- Hemingway J., Ranson H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45: 371-391.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L., Ranson H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-665.
- Hemingway J., Karunaratne S.H., 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
- Henry M-C., Assi S-B., Rogier C., Dossou-Yovo J., Chandre F., Guillet P., Carnevale P., 2005. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of côte d'ivoire *Am J Trop Med and Hyg* 73 (5): 859-864.
- Himeidan Y.E., Chen H., Chandre F., Donnelly M.J., Yan G., 2007. Short Report: Permethrin and DDT Resistance in the Malaria Vector *Anopheles arabiensis* from Eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 77(6): 1066-1068.
- Hochberg Y., 1988. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 75: 800-2.
- Hossaim M.I., Curtis C.F., Smith M.D., Ellis S., 1986. Laboratory studies of permethrin impregnated nets and their effects on mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 842-843.
- Huchard E., Martinez M., Alout H., Douzery E.J., Lutfalla G., Berthomieu A., Berticat C., Raymond M., Weill M., 2006. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc Biol Sci* 22: 273(1601): 2595-604.
- Hunt R.H., Coetzee M., Fettene M., 1998. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 231-235.

- Janeira F., Vicente J.L., Kanganje Y., Moreno M., Do Rosario V.E., Do Rosario V.E., Cravo P., Pinto J., 2008. A primer- introduced restriction analysis-polymerase chain reaction method to detect knockdown resistance mutations in *Anopheles gambiae*. *J Med Entomol* 45: 237-241.
- Jones C.M., Liyanapathirana M., Agossa F., Weetman D., Ranson H., Donnelly J.M., Wilding C., 2011. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl An Sci* [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1201475109](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1201475109).
- Jones C.M., Toé K.H., Sanou A., Namountougou M., Hughes A., Diabaté A., Dabiré K.R., Simard F., Ranson H., 2012. Additional Selection for Insecticide Resistance in Urban Malaria Vectors: DDT Resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS ONE* 7(9): e45995.
- Karch S., Garin B., Asidi N., Mazambi Z., Salaun J.J., Mouchet J., 1993. Moustiquaires imprégnées contre le paludisme au Zaïre. *Ann Soc Belg Med Trop* 73 (1): 37-53.
- Karunaratne S.H.P.P., Hemingway J., Jayawardena K.G.I., Dassanayaka V., Vaughan A., 1995. A kinetic and molecular differences in the amplified and non- amplified esterases from insecticide resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Journal of Biology and Chemistry* 270: 31124-31128.
- Kazanidou A., Nikou D., Grigoriou M., Vontas J., Skavdis G., 2009. Short Report: A multiplex PCR Assay for simultaneous genotyping of *kdr* and *ace-1* loci in *Anopheles gambiae*. *Am J Trop Med Hyg* 80 (2): 236-238.
- Kerah-Hinzoumbé C., Péka M., Nwana P., Donan-Gouni I., Etang J., Samè-Ekobo A., Simard F., 2008. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from south-western Chad, Central Africa *Malar J* 7:192.
- Kitau J., Oxborough R.M., Tungu P.K., Matowo J., Malima R.C., Magesa S.M., Bruce J., Moshia F.W., Rowland M.W., 2012. Species shifts in the *Anopheles gambiae* complex: do LLINs successfully control *Anopheles arabiensis*? *PLoS One* 7(3):e31481.
- Konate L., Diagne N., Brahimi K., Faye O., Legros F., Rogier C., Petrarca V., Trape J.F., 1994. [Biology of the vectors and transmission of *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* and *P. ovale* in a village in the savanna of west Africa (Dielmo, Senegal)]. *Parasite* 1(4): 325-33.
- Kristan M., Fleischmann H., della Torre A., Stich A., Curtis C.F., 2003. Pyrethroid resistance/susceptibility and differential urban/rural distribution of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s. malaria vectors in Nigeria and Ghana. *Met Vet Entomol* 17: 326-332.
- Labbe P., Berthomieu A., Berticat C., Alout H., Raymond M., Lenormand T., Weill M., 2007. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol* 24: 1056-1067.
- Lemasson J.J., Fontenille D., Lochouarn L., Dia I., Simard F., Ba K., Diop A., Diatta M.,

- Molez J.F., 1997. Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J Med Entomol* 34: 396-403.
- Lines J., 1996. Mosquito nets and insecticides for net treatments: a discussion of existing and potential distribution systems in Africa. *Tropical Medicine and International Health* 1: 616-632.
- Livadas G., Georgiopoulos G., 1953. Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. *Bull World Health Org* 8(4): 497-511.
- Lund A.E., Narahashi., 1983. Kinetics of Sodium Channel Modification as the Basis for the variation in the Nerve Membrane Effects of Pyrethroids and DDT Analogs. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 20: 203-216.
- Lynd A., Ranson H., McCall, P.J., Randle N.P., Black W.C., Walker E.D., Donnelly M.J., 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (*kdr*) detection in *Anopheles gambiae*. *Malar J* 4: 16.
- Mabaso M.L.H., Sharp B., Lengeler C., 2004. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health Org.* 9(8): 846-856.
- Macdonald G., Göckel G.W., 1964. The malaria parasite rate and interruption of transmission. *Bull Org Mond Santé* 31: 365-377.
- Marreli M.T., Li C., Rasgon J.L., Jacobs-Lorena., 2007. Transgenic malaria resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on plasmodium-infected blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(13): 5580-5583.
- Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Berge J.B., Devonchire A.L., 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.
- Massoulié J., Sussman J., Bon S., Silman I., 1993. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res* 98: 139-46.
- Maturama F., Clark J.M., 1985. Investigations on the suitability of using nerve membrane fragments incorporated into artificial liposomes and a method for the study of pesticidal action on sodium channel activity. *Neurotoxicology* 6(2): 271-288.
- Metzger W.G., Maxwell C.A., Curtus C.F., 1998. Anti-sporozoite immunity and impregnated bednets in Tanzanian villages. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 727-729.
- Mitchell S.N., Stevenson B.J., Müller P., Wilding C.S., Yawson A.E., Field S.G., Hemingway J., Paine M.J.I., Ranson H., Donnelly M.J., 2012. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *PNAS* 109: 6147-6152.



- Moreira L.A., Wang J., Collins F.H., Jacobs-Lorena M., 2004. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics* 166: 1337-1341.
- Mouchet J., Carnevale P., 1988. Le paludisme, composante de l'environnement africain. *Orstom-actualités* 20 : 8p.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Ravaonjanahary C., Richard A., Robert V., 1993. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers Santé* 3: 320-338.
- Mouchet J., Carnevale P., 1997. [Impact of changes in the environment on vector-transmitted diseases]. *Sante ORSTOM* 7(4):263-9.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J., 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. *Edition John Libbey*. Pp. 12-117.
- Muller P., 1955. Das insektizid dichlorodiphenyltrichloroethane und seine bedeutung. Basel: Birkhäuser.
- Muller P., Chouaibou M., Pignatelli P., Etang J., Walker E.D., Donnelly M.J., Simard F., Rason H., 2008a. Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Mol Ecol* 17: 1145-1155.
- Muller P., Warr E., Stevenson B.J., Pignatelli P.M., Morgan J.C., Steven A., Yawson A.E., Mitchell S.N., Ranson H., Hemingway J., Paine M.J., Donnelly M.J., 2008b. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* 4: e1000286.
- N'Guessan R., Corbel V., Akogbeto M., Rowland M., 2007. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis* 13: 199-206.
- N'Guessan R., Darriet F., Guillet P., Carnevale P., Traore-Lamizana M., Corbel V., Koffi A.A., Chandre F., 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol* 17: 19-25.
- N'Guessan R., Asidi A., Boko P., Odjo A., Akogbeto M., Pigeon O., Rowland M., 2010. An experimental hut evaluation of PermaNet (®) 3.0, a deltamethrin-piperonyl butoxide combination net, against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in southern Benin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104(12): 758-65.
- Ndjemai H.N., Patchoke S., Atangana J., Etang J., Simard F., Bilong C.F., Reimer L., Cornel A., Lanzaro G.C., Fondjo E., 2009. The distribution of insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 1127-1138.
- Nwane P., Etang J., Chouaibou M., Toto J.C., Keraf-Hinzoumbe C., Mimpfoundi R., Awono-

- Ambene H.P., Simard F., 2009. Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infect Dis* 9: 163.
- OMS, 1992. Résistance des vecteurs aux pesticides. Genève: OMS, 1992 Série Rapport technique n°123.
- Ouédraogo M., Toé A.M., Ouédraogo T.Z., Guissou P.I., 2011. Pesticides in Burkina Faso: Overview of the Situation in a Sahelian African Country. In: Stoytchevan M, editors. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management. *ISBN InTech*: pp. 35-48.
- Park Ross G.A., 1936. Insecticide as a major measure in control of malaria. *Quart Bull Inf Health Org League of Nations* 5: 813-822.
- Pennetier C., Corbel V., Hougard J-M., 2005. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 72: 739-744.
- Petrarca V., Vercruyse J., Coluzzi M., 1987. Observations on the species of the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal River basin. *Med Vet Entomol* 1: 303-312.
- Pinto J., Lynd A., Elissa N., Donnelly M.J., Costa C., Gentile G., Caccone A., do Rosario V.E., 2006. Co-occurrence of East and West African *kdr* mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Med Vet Entomol* 20: 27- 32.
- Pock Tsy J-M., Duchemin J-B., Marrama L., Rabarison P., Le Goff G., Rajaonarivelo V., Robert V., 2003. Distribution of species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malar J* 2(1): 33.
- Prapandathadara L., Hemingway J., Ketterman A.J., 1995. Partial purification and characterization of Glutathion-S-Transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 47: 119-133.
- Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J., Collins F.H., 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.
- Ranson H., Hemingway J., 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 226-41.
- Ranson H., Abdallah H., Badolo A., Guelbeogo W.M., Kera-Hinzoumbe C., Yangalbe-Kalnone E., Sangnon N., Simard F., Coetzee M., 2009. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi- country study highlight the extent of the problem. *Malar J* 8: 299.

- Ranson H., N'guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z., Corbel V., 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 27(2): 91-8.
- Raymond M., Rousset F., 1995. GENEPOP Version 1.2 A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
- Ridl F.C., Bass C., Torrez M., Govender D., Ramdeen V., Yellot L., Edu A.E., Schwabe C., Mohloai P., Maharaj R., 2008. A pre-intervention study of malaria vector abundance in Rio Muni, Equatorial Guinea: their role in malaria transmission and the incidence of insecticide resistance alleles. *Malar J* 7: 194.
- Robert V., Awono-Ambene H.P., Thioulouse J., 1998. Ecology of larval mosquito, with special reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in market-garden wells in the urban area of Dakar, Senegal. *J Med Entomol* 35: 948-955.
- Robert V., Gazin P., Boudin C., Molez J.F., Ouedraogo V., Carnevale P., 1985. The transmission of malaria in a wooded savannah area and a rice-growing area around Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Ann Soc Belg Med Trop* 65: 201-214.
- Robert V., Gazin P., Ouédraogo V., Carnevale P., 1986. Le paludisme urbain à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Cahiers ORSTOM Ser Ent Parasitol* 24: 121-128.
- Robert V., Macintyre K., Keating J., Trape J.F., Duchemin J.B., Warren M., Beier J.C., 2003. Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 68: 169-176.
- Robert V., Ouedraogo V., Carnevale P., 1991. La transmission du paludisme humain dans un village au centre de la rizière de la vallée du Kou, Burkina Faso. *Le paludisme en Afrique de l'Ouest* p. 7-17.
- Rodhain F., Perez C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. *Maloine Editeur*, Paris, 458p.
- Rogan W., Chen A., 2005. Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet* 366: 763-73.
- Rossi P., Belli A., Mancini L., Sabatinelli G., 1986. Enquête entomologique longitudinale sur la transmission du paludisme à Ouagadougou, Burkina Faso. *Parassitologia* 28: 1-15.
- Rugemalila J-B., Wanga C.L., Kilama W., 2006. Sixth Africa malaria day in 2006: how far have we come after the Abuja Declaration ? *Malar J* 5: 102.
- Sabatinelli G., Rossi P., Belli A., 1986. Etude sur la dispersion d'*An. gambiae* dans la zone urbaine à Ouagadougou. *Parassitologia* 30: 178-179.
- Sadasivaiah S., Tozan Y., Breman J.G., 2007. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for indoor residual spraying in Africa: how can it be used for malaria control? *Am J Trop Med Hyg* 77(6): 249-63.
- Santolamazza F., Calzetta M., Etang J., Barrese E., Dia I., Caccone A., Donnelly M.J.,

- Petrarca V., Simard F., Pinto J., della Torre A., 2008. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J* 7: 74.
- Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H., 1993. Identification of single specimens of *An. gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 520-529.
- Sharakhov I.V., Sharakhova M.V., Mbogo C.M., Koekemoer L.L., Yan G., 2001. Linear and spatial organisation of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics* 159: 211-218.
- Simard F., Ayala D., Kamdem G.C., Pombi M., Etouana J., Ose K., Fotsing J-M., Fontenille D., Besansky N.J., Costantini C., 2009. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecology* 9: 17.
- Sinègre G., Babinot M., Vigo G., Gaven G., Julien J.L., 1993. *Bacillus sphaericus* et démoustication urbaine. Bilan de cinq années d'utilisation expérimental de la spécialité Sphérinmons dans le sud de la France. *Doc. EILDMD n°62* 21p.
- Slotman M.A., Tripet F., Cornel A.J., Meneses C.R., Lee Y., Reimer L.J., Thiemann T.C., Fondjo E., Fofana A., Traoré S.F., Lanzaro G.C., 2007. Evidence for subdivision within the M molecular form of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology* 16(3): 639-49.
- Snow R., Marsk K., 1995. Will reducing malaria transmission alter malaria mortality among Africa children ? *Parasitol Today* 11: 188-190.
- Snow R.W., Jawara M., Curtis C.F., 1987. Observations on *Anopheles gambiae* s.l. during trial of permethrin treated bed nets in the Gambia. *Bull Entomol Res* 77: 279-286
- Snow R.W., Rowan K., Lindsay S.W., Greenwood B.M., 1988. A trial of bednets (mosquito nets) as a malaria control strategy in a rural area of the Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 212-215.
- Snow R.W., 2000. The burden of malaria: understanding the balance between immunity, public health and control. *J Med Microbiol* 49: 1053-1055.
- Swallengrebel N.H., Anneke S., de Meillon B., 1931. Malaria investigation in Transvaal and Zululand. *Publ S Afr Inst Med Res XXVIII*: 245-276.
- Tchinda G.G., Atashili J., Achidi E.A., Kamga H.I., Njunda A.L., Ndumbe P.M., 2012. Impact of malaria on hematological parameters in people living with HIV/AIDS attending the Laquintinie Hospital in Douala, Cameroon. *PLoS One* 7(7): e40553.
- Touré Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maiga H.M., Sangaré O., Sow M., Di Decco M.A., Coluzzi M., 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477-511.
- Touré Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maiga H.M., Sangaré O., Sow M., Di

- Decco M.A., Coluzzi M., 1994. Ecological genetics studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.s. in Mali, West Africa. *Genetica* 94: 213-223.
- Touré Y.T., 1982. Etude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. *Cahier ORSTOM sér Entomol Méd Parasitol* 20: 125-131.
- Touré Y.T., 1984. Sensibilité d'*Anopheles gambiae* aux insecticides dans la zone du barrage de Sélingué. *Parassitologia* 40: 477-511.
- Trape J.F., Rogier C., 1996. L'impact de l'urbanisation sur le paludisme en Afrique centrale. *Thèse Université de Paris Sud*, 409p.
- Trape J.F., Lefebvre-Zante E., Legros F., Ndiaye G., Bouganali H., Druilhe P., Salem G., 1992. Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 47: 181-189.
- Tripet F., Wright J., Cornel A., Fofana A., Mcabee R., Meneses C., Reimer L., Slotman M., Thiemann T., Dolo G., Traoré S., Lanzaro G., 2007. Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (*kdr*) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 81-87.
- Verhaeghen K., Van Bortel W., Roelants P., Backeljau T., Coosemans M., 2006. Detection of the East and West African *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. *Malar J* 5: 16.
- Vontas J.G., Small G.J., Hemingway J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 357: 65-72.
- Walter J.R., Aimin C., 2005. Health risks and benefits of bis (4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet* 366:763-773.
- Weill M., Chandre F., Brengues C., Manguin S., Akogbéto 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: 451-455.
- Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., Raymond M., 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423: 136-137.
- Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M., 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13: 1-7.
- Weill M., Fort P., Berthomieu A., Dubois N., Raymond M., 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc Biol Sci* 7 269 (1504).

- White G.B., 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). *Systematic Entomology*, 10: 501-522.
- World Health Organization 1995. Vector control for malaria and other vectors-born diseases. *Technical report Series* 857: 91p.
- World Health Organization 1998. Report of the WHO informal consultation on test procedures for insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/CPC/MAL/98.
- World Health Organization. World Malaria Report 2009. Geneva: 2009.
- World Health Organization. Launch of the Global Plan for Insecticide Resistance Management in malaria vectors. Available at: [http://www.who.int/malaria/vector\\_control/gpirm\\_event\\_report\\_2012.pdf](http://www.who.int/malaria/vector_control/gpirm_event_report_2012.pdf). Accessed 2012 May 15.
- Wondji C., Simard F., Fontenille D., 2002. Evidence for genetic differentiation the molecular forms M and S within the forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol* 11: 11-19.
- Wondji C., Simard F., Petrarca V., Etang J., Santolamazza F., della Torre A., Fontenille D., 2005. Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J Med Entomol* 42: 998-1005.
- Yadouleton A.W., Asidi A., Djouaka R.F., Braïma J., Agossou C.D., Agossou C.D., Akogbeto M.C., 2009. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J* 8: 103.
- Yadouleton A., Martin T., Padonou G., Chandre F., Asidi A., Djogbenou L., Dabiré K.R., Aikpon R., Boko M., Glitho I., Akogbeto M., 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. *Parasit Vectors* 4: 60.
- Yewhalaw D., Bortel W.V., Denis L., Coosemans M., Duchateau L., Speybroeck N., 2010. First evidence of high knockdown resistance frequency in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 83: 122-125.
- Zaim M., Aitio A., Nakashima N., 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 14: 1-5.

# ANNEXES

Sélection d'articles



