



**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE  
BOBO-DIOULASSO**

**INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL  
(IDR)**

Laboratoire de Recherche et d'Enseignement  
en Santé et Biotechnologie Animales (LARESBA)



**Centre National de Recherche et de  
Formation sur le Paludisme  
(CNRFP)**

## ***MEMOIRE***

Présenté par :

**Bapio Valérie Elvira Jean Téléspore BAZIE**  
Maître es Sciences

Pour l'obtention du:

**Diplôme d'Etudes Approfondies  
en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques**

***Sur le Thème :***

**Contribution à l'évaluation de la résistance aux insecticides  
des vecteurs du paludisme et de la distribution du gène Kdr  
au BURKINA FASO**

**Soutenu le 20 mars 2007 devant le Jury :**

**Président:** Pr. Marie-Claude VIGUIER-MARTINEZ, Université Polytechnique de Bobo dioulasso.

**Membres:** Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO, Université Polytechnique de Bobo dioulasso.  
Pr. Jean Bosco OUEDRAOGO, Institut de Recherche en Sciences de la Santé.  
Dr. N'Falé SAGNON, Centre Nationale de Recherche et de Formation sur le Paludisme.

## DEDICACES

*Je dédis ce travail à toute ma famille,*

A mon père **Bali Pius BAZIE** (*in mémorium*)

A ma mère **Anne Marie KANTIONO** (*in mémorium*)

A ma grande mère, la sœur **Michelle KANKYONO**

*Vos soutiens et vos attentions, m'ont toujours accompagné, je vous aime.*

A Monsieur **N'Do Piabié Firmin**, son épouse **Blandine** et leurs enfants.

A mes grands parents, Monsieur **BATIONO Maurice**, son épouse **Justine** et leurs enfants.

A mes **frères** et **sœurs**,

*Ce travail est le fruit de vos soutiens multiformes ; Que Dieu vous bénisse !*

## DEDICACES

*Je dédis ce travail à toute ma famille,*

A mon père **Bali Pius BAZIE** (*in mémorium*)

A ma mère **Anne Marie KANTIONO** (*in mémorium*)

A ma grande mère, la sœur **Michelle KANKYONO**

*Vos soutiens et vos attentions, m'ont toujours accompagné, je vous aime.*

A Monsieur **N'Do Piabié Firmin**, son épouse **Blandine** et leurs enfants.

A mes grands parents, Monsieur **BATIONO Maurice**, son épouse **Justine** et leurs enfants.

A mes **frères et sœurs**,

*Ce travail est le fruit de vos soutiens multiformes ; Que Dieu vous bénisse !*

*Nous sommes particulièrement sensibles à l'intérêt que le **Dr Imaël Henri Nestor BASSOLE** a manifesté pour ce travail en le supervisant. Nous vous sommes reconnaissants de votre participation à la conception et à la finalisation de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude.*

*Nos remerciements le **Dr Moussa W. GUELBEOGO**. Malgré vos occupations, vous avez accepté participer à la conception et à la finalisation de ce travail. Vos conseils et vos interventions multiples ont été capitales pour la réussite de ce travail. Soyez rassuré de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.*

*Nos remerciements vont également à l'égard du **Dr Athanase BADOLO**. Malgré vos occupations, vous avez accepté participer à la conception et à la finalisation de ce travail. Vos encouragements et votre disponibilité, nous ont été d'un grand soutien pour la réalisation de ce travail. Soyez rassuré de notre profonde gratitude et nos sincères remerciements.*

*Nous tenons à remercier vivement **Awa GNEME, Alphonse TRAORE, Antoine SANOU, Samuel SERME, Aziz YAMEOGO, Pierre OUEDRAOGO** qui nous ont témoigné leur soutien sans faille, pour la réalisation de ce travail. Vous avez su braver les difficultés dans les manipulations, dans la correction et ré correction de ce travail sans lesquelles il ne serait pas réalisé. Vous nous avez témoigné une amitié et une disponibilité exceptionnelle à laquelle nous sommes particulièrement sensibles. Votre contribution est réellement inestimable. Permettez-nous aujourd'hui de vous exprimer notre sincère gratitude.*

*Il nous est particulièrement agréable de remercier toute l'équipe du laboratoire d'Entomologie et de Cytogénétique, **Laurent KOUDOUGOU, Drissa DRAME, Issa KONATE, Joseph KOUDOUGOU, Madi NABOLE, Gilbert OUEDRAOGO, Joseph NACOULMA, Seydou OUEDRAOGO, Evariste PARE, Aziz YAMEOGO, Mamoudou TRAORE, Pierre OUEDRAOGO, Elie VALEA, Alexis BAKOUAN**. Recevez tous ici nos remerciements les plus sincères pour votre franche collaboration.*

*Nos remerciements vont également au **Dr Issiaka SOULAMA**, et à **Jean Paul OUEDRAOGO** pour tout l'appui dont Nous avons bénéficié, veuillez accepter nos sincères remerciements et ma profonde gratitude.*

*Nous remercions la **famille NIKIEMA** pour son soutien moral et spirituel, c'est aussi le lieu pour moi de renouveler mon affection et mon amour à **Wendkouni Rosine** qui m'a toujours soutenu et fait preuve de compréhension.*

*Nous remercions le groupe liturgique de la **Paroisse Saint Camille** pour son soutien spirituel et matériel.*

*Sans oublier tous **nos camarades et amis**, nous exprimons notre gratitude pour leurs encouragements tout au long de cette étude.*

## RESUME

La résistance des vecteurs de paludisme aux insecticides constitue un obstacle à la lutte anti vectorielle. Son origine quoique attribuée par certains auteurs à l'usage des insecticides en agriculture n'est pas clairement élucidée. Afin de tester cette hypothèse, la sensibilité d'*An. gambiae s.l.* au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine a été évaluée de Juillet à août 2006 dans 4 sites caractérisés par la culture maraichère (Saaba, Nongremasson), et la culture du coton (Zampa, Boromo).

Les tests de sensibilités avec le DDT à 4 %, la deltaméthrine à 0,05 % et la perméthrine 0,75% ont été réalisés selon le protocole standard de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO, 1998) sur des femelles de 2 à 5 jours, issues de larves récoltées sur les sites d'étude. Les techniques de Fanello *et al.* (2002) et de Martinez-Torres (1998) ont été respectivement utilisées pour l'identification des membres du complexe *An. gambiae* et la recherche du gène Kdr.

Les taux de mortalité ont varié de 56 à 92 % pour le DDT, de 98 à 100 % pour la perméthrine et ont été de 100 % pour la deltaméthrine.

Les KDT<sub>50</sub> et KDT<sub>95</sub> les plus long ont été respectivement de 47,52 min (Zampa) et de 105,69 min (Zampa) pour le DDT. Pour la perméthrine la valeur maximale du KDT<sub>50</sub> déterminé est de 13,33min (Nongremasson) et celle du KDT<sub>95</sub> est de 38,34 min (Saaba). Quand à la deltaméthrine, des temps de 7,32min pour le KDT<sub>50</sub> et de 14,82min pour le KDT<sub>95</sub> ont été obtenus.

La PCR a permis d'identifier 95% des membres du complexe *An. gambiae* et de rechercher le gène Kdr en son sein. La forme moléculaire M d'*An. gambiae s.s.* est la plus dominante avec une fréquence de 0,69. Elle est suivie de la forme moléculaire S (0,18) et d'*Anopheles arabiensis* (0,13). La fréquence la plus forte du gène Kdr est trouvée à Zampa (0,23) et la plus faible à Boromo (0,05), au sein du complexe *An. gambiae*, il est plus fréquent chez *An. gambiae s.s.* (0,72) et moins fréquente chez *An. arabiensis* (0,04). L'analyse de ces résultats a montré que la résistance au DDT est effective sur l'ensemble des sites. Les espèces testées demeurent sensible à la perméthrine et à la deltaméthrine. La répartition des espèces sur les sites n'a montré aucune différence statistique. Même si la distribution du gène Kdr dans les différentes localités n'a pas été significative, Elle démontre que la résistance aux pyréthrinoïdes est en cours d'installation.

Mots clés : *An.gambiae.s.l.*, résistance, pyréthrinoïdes, organochloré, Knock down resistance.

## Liste des sigles et abréviations

ADN = Acide Désoxyribonucléique  
ADNr = Acide DésoxyriboNucléique ribosomal  
ARN = Acide RiboNucléique  
ARNr = Acide RiboNucléique ribosomal  
CNRFP = Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme  
dATP = DésoxyriboAdénosine TriPhosphate  
DDT= Dichloro diphenyl diethylchloro ethane  
dCTP = DésoxyriboCytosine TriPhosphate  
dGTP = désoxyriboGuanosine TriPhosphate  
DNTP = DésoxyriboNucléotideTriPhosphate  
dNTPs = désoxyriboNucléotide TriPhosphate stock  
dTTP = désoxyriboThymidineTriPhosphate  
EDTA = Ethylène-Diamine-TétraAcétique  
ELISA = Enzym Linked Immunosorbent Assay  
ETS = Espace Transcrit Externe  
GA = Amorce gambiae  
inch = 25,4 millimètre  
IGS = Espace Inter Génique  
ITS = Espace Transcrit Interne  
KD= Knock down  
Kdr= Knock down resistance  
KDT= Knock down time  
pb = paire de bases  
PCR = Polymerase Chain Reaction  
PH = potentiel d'hydrogène  
PM = picomolaire  
PTC = Programmable Thermal Cyclor  
RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism  
SDS = Sodium Dodecyl Sulfate  
s.l. = sensu lato  
s.s. = sensu stricto  
Taq = *Thermus aquaticus*

TBE = Tris-Borate-EDTA

T<sub>m</sub> = melting Temperature

Tris = Trihydroxyméthyl aminométhane

UN = Amorce universelle

UV = Ultraviolet

W.H.O. = World Health Organization

# SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Définition du paludisme.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Les vecteurs du paludisme.....</b>	<b>5</b>
2.1. Les œufs .....	6
2.2. Les larves.....	6
2.1.3. Les nymphes.....	7
2.1.4. Les adultes.....	7
<b>3. Les méthodes de lutte anti vectorielles.....</b>	<b>9</b>
3.1. Les méthodes physico-chimiques.....	9
3.2. Les méthodes biologiques .....	10
Plusieurs espèces de champignons entomopathogènes ont été isolées et testés sur la plupart des moustiques vecteurs de maladies. Cependant, ceux qui revêtent une importance particulière en santé publique ont les caractéristiques suivantes : .....	11
3.3. Les méthodes chimiques .....	12
<b>4. La résistance d'<i>An. gambiae s.l</i> aux insecticides .....</b>	<b>19</b>
4.1. Les mécanismes de la résistance .....	19
4.2. Les bases moléculaires de la résistance aux insecticides .....	23
4.3. La mutation Kdr au sein du complexe <i>An.gambiae.s.l.</i> .....	24
<b>5. Méthodes d'évaluation de la résistance aux insecticides : test de sensibilité biologique .....</b>	<b>25</b>
<b>6. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....</b>	<b>26</b>
6.1. Définition .....	26
6.2. Principe de l'identification des membres du complexe <i>An. gambiae</i> par la PCR..	27
6.3. La distinction forme moléculaire M/S par la restriction .....	29
6.4. La mise en évidence du gène Kdr par la PCR.....	29
6.5. La technique SSOP-PCR.....	29
6.6. La techniques du HOLA « Hot Oligonucleotid Ligation Assay » .....	30
<b>III. OBJECTIFS.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>33</b>
<b>1. Zone d'étude et d'échantillonnage.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Echantillonnage des larves .....</b>	<b>36</b>
<b>3. Elevage des larves.....</b>	<b>36</b>
<b>4. Test de sensibilité.....</b>	<b>36</b>
4.1. Matériel de test .....	37



4.2. Déroulement du test .....	38
4.3. Analyse des données .....	39
<b>5. Identification moléculaire des membres du complexe <i>An. gambiae.s.l.</i> .....</b>	<b>41</b>
5.1. Extraction de l'ADN .....	41
5.2. Identification des membres du complexe <i>Anopheles gambiae</i> .....	41
5.3. Caractérisation moléculaire du gène Kdr chez <i>An.gambiae.s.s.</i> .....	43
<b>6. Analyses statistiques.....</b>	<b>44</b>
<b>V. RESULTATS.....</b>	<b>45</b>
1. Mortalité d' <i>An.gambiae.s.l.</i> 24h après le test .....	46
2. Temps de Knock down observé dans les quatre sites .....	46
3. Distribution des membres du complexe <i>Anopheles gambiae s.l.</i> dans les quatre villages .....	48
4. Distribution de fréquence du gène Kdr.....	49
4.1 Fréquence du gène Kdr entre les sites.....	49
4.2. Fréquences du gène <i>Knock down résistance</i> (Kdr) au sein des membres du complexe <i>An.gambiae.s.l.</i> dans les quatre villages. ....	49
<b>VI. DISCUSSION .....</b>	<b>51</b>
<b>VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>57</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>65</b>

# **I. INTRODUCTION**

Selon les estimations récentes de l'Organisation Mondiale de la Santé, il y aurait 300 à 500 millions de cas cliniques de paludisme chaque année dans le monde dont plus de 90 % dans les pays de l'Afrique au sud du Sahara (WHO, 2003). En outre, le paludisme provoque chaque année 1,4 à 2,6 millions de décès dans le monde. Cette endémie est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les nourrissons et les jeunes enfants.

Dans les années 1950, l'OMS a lancé, une campagne mondiale d'éradication du paludisme par pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides. Cette campagne s'est soldée par un échec consécutif entre autres au développement du phénomène de résistance des anophèles aux insecticides. En 1969, la 22<sup>ème</sup> assemblée mondiale de la santé a mis fin au concept de « l'éradication » globale par la lutte antivectorielle. Il fut question à partir de ce moment de contrôler le paludisme par la lutte antiparasitaire. Cette tentative de contrôle s'est également soldée par un échec suite à l'apparition de la résistance du *Plasmodium* à la chloroquine (Najera, 1989).

En fait, pour lutter contre une maladie parasitaire à transmission vectorielle, il est évident qu'une seule cible et une seule méthode ne peuvent suffire. A l'action curative du traitement, il était donc important d'ajouter une action préventive, à savoir la lutte contre le vecteur. L'association des différentes méthodes a permis d'élaborer la lutte intégrée. La lutte antivectorielle a bénéficié alors d'une arme nouvelle, la moustiquaire imprégnée d'insecticide pyréthrinoïdes (Darriet *et al.*, 1998). Ce nouvel instrument de lutte occupe une place importante dans la résolution prise par l'initiative «Faire reculer le paludisme». Cette initiative a été lancée en 1998 par l'OMS en partenariat avec l'UNICEF, la Banque Mondiale, de nombreux Etats d'Afrique, d'Asie, d'Amérique, certains membres du secteur privé et les Organisations non gouvernementales, avec pour objectif de diminuer de moitié la charge palustre mondiale d'ici à 2010 par rapport à l'an 2000 (OMS, 2000). Elle préconise l'utilisation intra domiciliaire des moustiquaires imprégnées d'insecticides en particulier des pyréthrinoïdes en association avec des antiparasitaires. Des résultats encourageants ont été obtenus sur la mortalité infantile (Nevill *et al.*, 1996 ; Habluetzel *et al.*, 1997), et sur les paramètres entomologiques Majori *et al.* (1987). Cependant, des investigations réalisées en Afrique Occidentale (Chandre *et al.*, 1999 ; Diabaté, 1999), au Kenya (Vulule *et al.*, 1994) et en Chine (Wang, 1999) ont montré que les principaux vecteurs du paludisme sont de plus en plus résistants aux pyréthrinoïdes. Ce qui pourrait

compromettre l'atteinte des objectifs en 2010. Malheureusement, l'origine de la résistance des vecteurs aux insecticides n'est pas encore clairement élucidée. Selon certaines études (Diabaté *et al.*, 2002), il semble qu'il existe un lien entre l'utilisation des insecticides agricoles et l'émergence de la résistance. Mais, les informations sont encore à l'étape d'hypothèses. Cette étude a donc été initiée pour comprendre l'effet des activités agricole sur la résistance des vecteurs aux insecticides.

Elle a pour objectifs d'analyser l'influence de l'utilisation des insecticides en agriculture et en santé publique sur le développement et l'expansion de la résistance du complexe *Anopheles gambiae* aux insecticides.

## **II. SYNTHÈSE**

# **BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Définition du paludisme

Le paludisme ou *malaria* est une maladie infectieuse due à un parasite Protozoaire du genre *Plasmodium*. Il doit son nom au mot latin *Palus* qui signifie marais ou au mot italien *malaria* qui signifie mauvais air. C'est une maladie qui sévit de façon endémique dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique, de l'Asie du sud et du sud-est et de l'Amérique du sud. Les parasites causaux sont transmis d'un individu à l'autre par la piqûre de la femelle infectée des moustiques du genre *Anopheles*.

## 2. Les vecteurs du paludisme

Les vecteurs du paludisme sont des *Arthropodes* appartenant à la classe des *Insectes*, à l'ordre des *Diptères*, au sous ordre des *Nématocères* et à la grande famille des *Culicidae*. Cette famille compte plus de 3450 espèces et sous espèces regroupées en trois sous familles : la sous famille des *Toxorhynchitinae*, la sous famille des *Anophelinae* et la sous famille des *Culicinae* (Bruce-Chwatt *et al.*, 1985). Parmi ces sous familles, celle des *Anophelinae* est constituée de 3 genres (*Bironella*, *Chagasia*, *Anopheles*). Le genre *Anopheles* est le plus important sur le plan médical. Il regroupe 400 espèces dont 70 sont vectrices de maladies humaines (Bruce-Chwatt *et al.*, 1985).

Certaines espèces sont morphologiquement indifférentiables et reproductivement isolées, ce sont les complexes d'espèces (Mouchet et Carvenale, 1991). *An. gambiae* a été décrit comme un complexe d'espèce et comprend sept espèces jumelles qui sont : *An. gambiae s.s* Gilles, 1902, *An. merus* Doenitz, 1902 ; *An. melas* Théobald, 1903 ; *An. arabiensis* Patton, 1905 ; *An. bwambae* White, 1985 ; *An. quadriannulatus* Théobald, 1911 ; *An. quadriannulatus B* (Hunt *et al.*, 1998).

Au Burkina Faso, *An.gambiae s.s.*, *An. arabiensis*, *An. funestus* sont les principaux vecteurs du paludisme (Petrarca *et al.*, 1986; Majori *et al.*, 1987). *An. gambiae s.s.* présente deux formes moléculaires : la forme moléculaire S et la forme moléculaire M (Favia *et al.*, 1997, 2001 ; della Torre *et al.*, 2001).

Les moustiques sont des insectes holométaboles. Ils possèdent un corps mince et des pattes longues et fines. Les femelles de la plupart des espèces ont des pièces buccales de type piqueur-suceur appelé proboscis. Leur cycle de développement comprend une phase pré imaginaire (œufs, larves, nymphes) et une phase adulte.

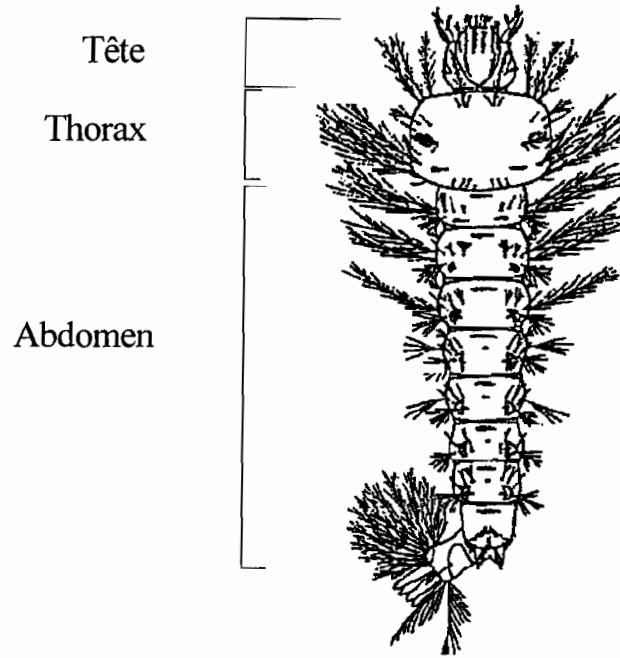
### **2.1. Les œufs**

Chaque ponte comporte 30 à 300 œufs selon l'espèce (Rozendaal, 1999). Les œufs de forme oblongue et de longueur d'environ 0,6 à 0,8 mm sont déposés isolément à la surface de l'eau et flottent grâce à des flotteurs latéraux. L'éclosion a lieu au bout de 2 à 3 jours dans les régions tropicales (Rodhain *et al.*, 1985).

### **2.2. Les larves**

La larve qui émerge est vermiforme et est formée de trois parties: la tête, le thorax et l'abdomen. Elle est apode avec un corps recouvert de soies (**fig.1**). La larve se déplace grâce aux mouvements ondulants de son corps. Celle-ci respire par des stigmates dorsaux situés à l'extrémité de l'abdomen ; c'est ce qui explique sa position de repos parallèle à la surface de l'eau. Le développement de la larve n'est pas continu. La vie larvaire est composée de quatre stades successifs séparés par trois mues larvaires. A l'émergence, la larve de premier stade qui mesure seulement 1 à 2 mm subit trois mues la transformant successivement en larves de stade II, III et IV qui mesure 12 à 15 mm de long (Mouchet *et al.*, 1991).

Les larves d'anophèles sont détritivores ; elles se nourrissent des microorganismes présents dans les gîtes larvaires: levures, bactéries. La durée de la vie larvaire varie de huit (8) à douze (12) jours dans les conditions favorables (Rodhain *et al.*, 1985).



**Figure 1** : Larve d'Anophéliné (OMS, 2004a).

### **2.1.3. Les nymphes**

A la fin du quatrième stade larvaire, la cuticule se fend dorsalement et libère la nymphe. La puppe est formée de deux parties: le céphalothorax et l'abdomen. La contraction des muscles abdominaux est à l'origine des mouvements chez la nymphe. Elle ne se nourrit pas (Mouchet *et al.*, 1991). La durée du stade nymphal va de vingt quatre (24) à soixante douze (72) heures chez *An. gambiae* selon la température (Gwadz *et al.*, 1996). C'est un stade de transition au cours duquel on observe de profondes transformations morphologiques et physiologiques qui aboutissent à l'adulte.

### **2.1.4. Les adultes**

Après quelques jours de vie nymphale, la cuticule du céphalothorax se fend dorsalement selon un plan sagittal et libère successivement les différentes parties de l'insecte adulte. Il reste immobile le temps que les ailes se déploient et que la cuticule durcisse. Les anophèles adultes ont un corps long et grêle formé de trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen. L'émergence dure quelques



minutes et constitue une phase de grande mortalité du fait non seulement des prédateurs à la surface de l'eau mais aussi de la possibilité de noyade.

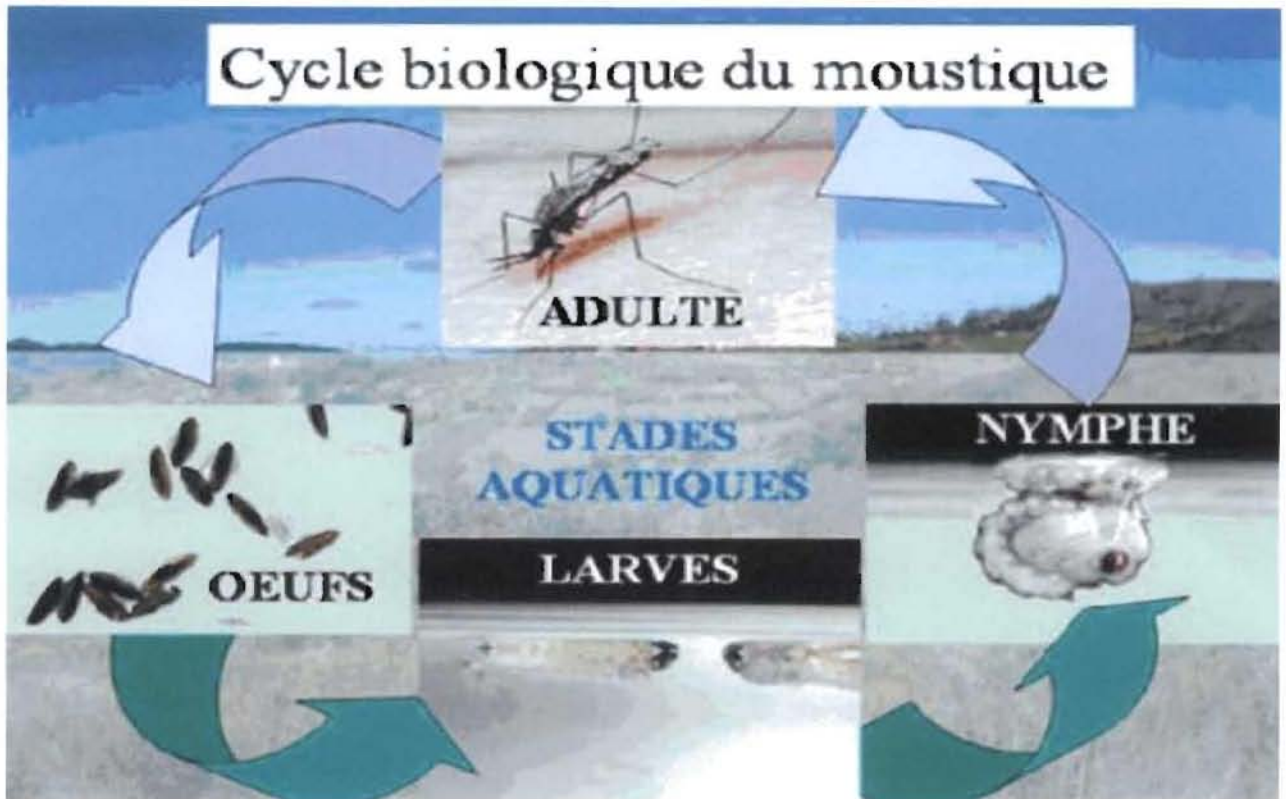
Après l'émergence, les femelles ont besoin de 12 à 24 heures et les mâles de 72 heures pour que leur exosquelette durcisse et que les organes de reproduction se mettent en place. Les femelles prennent ensuite du jus sucré pour leurs besoins énergétiques (Mouchet *et al.*, 1991). Elles s'accouplent avec des mâles plus âgés au bout de vingt quatre (24) à quarante huit (48) heures après l'émergence. L'accouplement est en général crépusculaire et a lieu au cours d'un essaim appelé la danse nuptiale. Après l'accouplement, certains mâles placent un bouchon de fécondation au niveau de la chambre génitale de la femelle pour éviter une nouvelle copulation. Ce bouchon est très fréquent chez les femelles nullipares d'*An. gambiae*.

En général les femelles d'anophèle ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur vie (Bregues *et al.*, 1973). Les spermatozoïdes sont stockés dans un réceptacle, la spermathèque et relargués lors de chaque ponte. Ils conservent leur pouvoir fécondant durant toute la vie du moustique (Bruce-Chwatt *et al.*, 1985).

Chez les anophèles, le sang est indispensable à la maturation des ovaires. Les protéines de l'hémoglobine sont une source d'acides aminés nécessaires au développement des œufs. Le premier repas de sang a lieu au bout de vingt quatre (24) à quarante huit (48) heures de vie adulte. A la fin du repas de sang, le processus de digestion se met en place et la maturation ovarienne commence. Le moustique passe successivement du stade gorgé à semi-gravide puis à gravide. La femelle n'est gravide que trente six (36) à quarante huit (48) heures après le repas de sang (Mouchet *et al.*, 1991). Elle va alors à la recherche d'un site favorable à la ponte. Après la ponte la femelle va à la recherche d'un autre repas de sang pour le cycle suivant (**fig.2**). La période qui s'écoule entre le repas de sang et la ponte est le cycle gonotrophique. Il est d'environ quarante huit (48) heures chez les anophèles à une température de 23°C à 25°C (Bruce-Chwatt *et al.*, 1985). Ce cycle gonotrophique est subdivisé en trois phases:

- la recherche et la prise de sang sur l'hôte vertébré;
- la digestion et la maturation ovarienne;
- la recherche du lieu de ponte par la femelle gravide.

La vie de l'imago est d'une vingtaine de jours en moyenne et elle ne dépasse pas un mois dans les conditions naturelles (Robert *et al.*, 1989).



**Figure 2 :** Cycle biologique des anophèles([www.pasteur.mg/AtlasPalu/vect.htm](http://www.pasteur.mg/AtlasPalu/vect.htm)., consulté le 20/02/2007)

### **3. Les méthodes de luttés anti vectorielles**

L'objectif principal de la lutte antivectorielle est la diminution de la morbidité et de la mortalité palustre grâce à l'abaissement du taux d'inoculation entomologique. L'inoculation nécessitant la présence du vecteur infecté, les méthodes actuelles visent principalement la réduction du contact homme vecteur, la densité du vecteur et la durée de vie du vecteur adulte (OMS, 2004a).

#### **3.1. Les méthodes physico-chimiques**

##### **3.1.1 L'assainissement et l'aménagement de l'environnement**

L'écologie du paludisme est étroitement liée à la présence d'eau, si bien que les eaux stagnantes de surfaces générées par l'activité de l'homme et les pluies sont des gîtes potentiels. De ce fait la réduction du nombre des gîtes larvaires contribue à réduire le risque de transmission du paludisme (OMS, 2004a).

### **3.1.2. La pose d'écran aux ouvertures des habitats**

La pose d'écran aux ouvertures et aux avant-toits des habitats réduit efficacement le contact homme vecteur. Ce type de contrôle vectoriel présente l'avantage d'être permanent (OMS, 2004a).

### **3.1.3. Les matériaux imprégnés**

#### **- La moustiquaire imprégnée**

Les moustiquaires sont des textiles faites de coton, ou de fibres synthétiques de mailles d'environ 61 trous par cm<sup>2</sup>. Elles permettent de réduire le contact mécanique vecteur/homme. Le terme moustiquaire imprégnée lui est attribué par suite de son trempage dans une solution d'insecticide.

L'initiative « Faire reculer le paludisme » projette d'atteindre à l'orée 2010, un taux de protection de 80% des personnes à risque par les méthodes appropriées de lutte anti vectorielle comme les moustiquaires imprégnées d'insecticide. Car elles constituent un moyen essentiel de réduction de la transmission du paludisme (Darriet *et al.*, 1998 ; Lengeler *et al.*, 1996). A la barrière physique de la moustiquaire s'ajoutent les actions répulsives et létales de l'insecticide (OMS, 2004a).

## **3.2. Les méthodes biologiques**

### **3.2.1. Les bactéries entomopathogènes**

#### **- *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis israelensis* est une espèce bactérienne qui vit naturellement dans les sols. Elle produit une toxine efficace sur les larves des moustiques. La toxine s'attaque au tube digestif en faisant éclater les cellules de l'intestin. Sa toxine a une faible rémanence. Elle nécessite de ce fait des applications régulières et fréquentes. Cette bactérie est adaptée à la lutte contre les espèces de moustiques, dont les larves gisent dans l'eau claire.

### - *Bacillus sphaericus*

*Bacillus sphaericus* produit également une toxine larvicide. Elle se développe mieux dans les eaux chargées en matières organiques où vivent les espèces du genre *Culex*.

### 3.2.2. Les champignons entomopathogènes

Plusieurs espèces de champignons entomopathogènes ont été isolées et testés sur la plupart des moustiques vecteurs de maladies. Cependant, ceux qui revêtent une importance particulière en santé publique ont les caractéristiques suivantes :

- Tuer à la fois la forme larvaire et adulte.
- Ne requérir qu'une seule ou quelques application(s) par saison.
- Etre dispersible par les femelles adultes dans les gîtes non encore traités.
- Montrer une activité résiduelle et persistante dans la population de moustique.
- Ne tuer sélectivement que les moustiques.
- Agir dans une marge assez large de température, d'humidité relative et de gîtes variés.
- Etre d'un bon rapport coût/efficacité.
- Avoir une longue durée de vie.
- Ne présenter aucune nuisance pour l'homme et les organismes non ciblés

(Scholte *et al.*, 2004).

### - *Beauveria*

*Beauveria* est le genre de champignons entomopathogènes regroupant plusieurs espèces, dont les spores peuvent être utilisées comme moyen de lutte. Parmi les espèces qui le composent, *Beauveria bassiana* infecterait les stades larvaires et adultes de *Culex tarsalis*, *Culex pipiens* et *An. albimanus* (Clark *et*

*al.*, 1968). Suivant les études de Scholte *et al.*, (2003), on obtiendrait 82% d'adultes d'*An. gambiae* infectés avec une  $LT_{50}$  (letal Time 50) de 3,5 jours comparé à 8,8 jours du groupe contrôle.

### **3.2.3. Les poissons larvivores**

Les espèces les plus utilisées appartiennent à la famille des carpes vivipares et des tilapias. Ce sont les Gambusies (*Gambusia affinis*), les guppys (*Poecilia reticulata*) et les tilapias (*Oreochromis spp*).

#### **- *Gambusia affinis***

*Gambusia affinis* est un petit poisson de forme fuselé de 5 centimètres de long, de couleur argentée. Il dévore les larves, les nymphes et les moustiques adultes qui se posent à la surface de l'eau. Lorsque les aquariums de *Gambusia* sont placés dans les pièces habitées ils réduisent la densité des larves et des moustiques adultes.

#### **- *Poecilia reticulata***

*Poecilla reticulata* vit dans les eaux des tropiques, douces ou saumâtres. Le fait qu'il se nourrisse de larves de certains genres de moustiques (*Culex*), fait de lui un élément biologique de lutte.

### **3. 3. Les méthodes chimiques**

Les composés utilisés au début contre les organismes nuisibles étaient des pesticides de première génération relativement simple à base d'arsenic, de soufre, de chaux, de dérivés du pétrole, de substance à base de fluor ou extraite de plantes comme la nicotine. Ces pesticides se caractérisent par leur toxicité relativement élevée pour les organismes non visés et surtout leur rémanence ou encore leur lente décomposition dans l'environnement (Philogene, 1991).

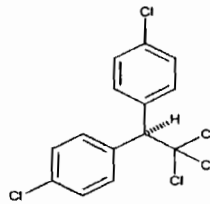
Par la suite des composés synthétiques dits de deuxième génération ont été mis en place, il s'agit des organochlorés, des organophosphorés et des carbamates

(Philogene, 1991). Ces dits pesticides de deuxième génération et les pyréthrinoïdes sont encore utilisés de nos jours en agriculture et dans la lutte antivectorielle.

### 3.3.1. Les classes d'insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle.

#### - Les organochlorés : DDT

Le dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT) (**fig.3**) est un composé qui présente une grande solubilité dans les solvants organiques, les graisses et le pétrole. La combinaison de ses trois propriétés (répulsivité, irritabilité et toxicité) vis-à-vis des moustiques lui a valu sa place dans les programmes de lutte contre le paludisme. L'OMS ne recommande son usage que pour la lutte antivectorielle et sous la forme de pulvérisations intra domiciliaires à effet rémanent (appliquées uniquement sur les murs intérieurs des habitations) (OMS, 2004b). Le DDT agit en perturbant l'ouverture des canaux sodium le long de l'axone chez l'insecte qui meurt après hyperexcitation, convulsions et paralysie.



*1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane*

**Figure 3** : Structure chimique du DDT

([www.3dchem.com/molecules.asp?ID=90](http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=90). Consulté le 06/12/2006)

#### - Les organophosphorés

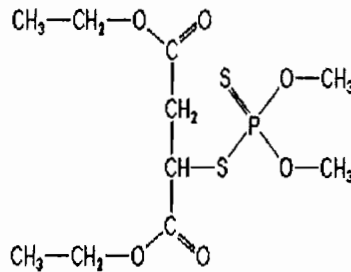
Les organophosphorés agissent en inhibant l'acétylcholinestérase, provoquant ainsi l'accumulation d'acétylcholine et le blocage de la transmission de l'influx nerveux.

On distingue deux grands groupes d'organophosphorés :

- les insecticides exothérapeutiques : le malathion (**fig.4**), le parathion (**fig.5**) et le temephos (**fig.6**), ils pénètrent directement dans l'organisme des insectes par des voies diverses.

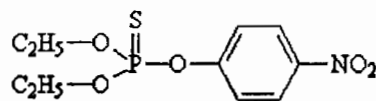
- les insecticides endothérapeutiques ou systémiques qui ont la propriété de pénétrer dans les végétaux et d'être transportés par la sève. Ces insecticides subissent quelques fois des transformations chimiques, mais restent toxiques pour les insectes

qui consomment ces végétaux. La forme oxydée de ces pesticides a la faculté de se fixer sur l'acétylcholinestérase.



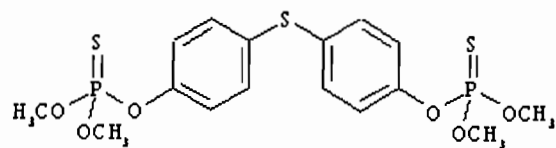
**Figure 4** : Structure chimique du malathion

(<http://www.ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm> consulté le 21/12/2006).



**Figure 5** : Structure chimique du Parathion

(<http://www.chemistry.about.com/library/graphics/blphtion.htm> consulté le 20/12/2006).



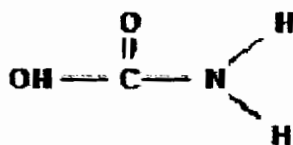
**Figure 6** : Structure chimique du Temephos

([http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/temephos\\_red.htm#IIC](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/temephos_red.htm#IIC) consulté le 20/12/2006).

#### - Les carbamates

Les carbamates (NH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H) sont des esters de l'acide carbamique (**fig.7**). Ce sont également des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ils sont considérés comme des insecticides de circonstances spéciales ou seulement utilisés dans les

cas où l'utilisation des autres insecticides se heurte à un échec (Diabaté, 1999). Le propoxur est le plus utilisé de ce groupe.



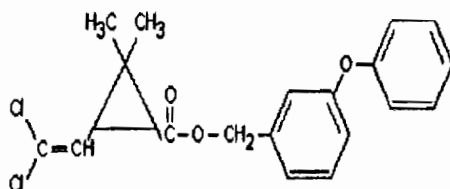
**Figure 7:** Structure chimique de l'acide carbamique

([www.gfev.univ-tln.fr/AcidesCarbox/Acid.html](http://www.gfev.univ-tln.fr/AcidesCarbox/Acid.html) consulté le 21/12/2006)

### - Les Pyréthrinoïdes

Selon leur origine, ils ont été classés en pyréthrinoïdes naturelles ou insecticides botaniques extraites des plantes (*Solanaceae*, *Compositaceae*) et en pyréthrinoïdes synthétiques (carboxylester).

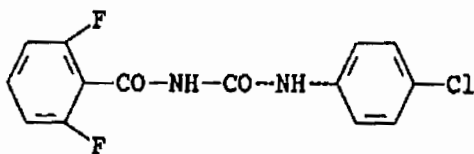
Ils pénètrent facilement la cuticule des insectes et interviennent au niveau du système nerveux de l'insecte pour perturber l'action du neurotransmetteur GABA. Ils ont également pour cible le canal sodium voltage dépendant constitué par quatre domaines (I-IV) et six domaines transmembranaires. Leur action à ce niveau contribue aussi à perturber le signal nerveux (Hemingway *et al.*, 2004). Les pyréthrinoïdes sont largement utilisés dans l'agriculture (Chandre *et al.*, 1999 ; Diabaté *et al.*, 2004) et dans l'imprégnation des moustiquaires à cause de leur effet irritant marqué sur les moustiques (Chandre *et al.*, 1999). Les plus utilisés sont : la perméthrine (**fig.8**), la deltaméthrine (**fig.9**), la lambdacyalothrine (**fig.10**), la cyperméthrine (**fig.11**) et la cyfluthrine (**fig.12**). Parmi ces insecticides, l'alpha-cyperméthrine confère une efficacité maximale aux moustiquaires imprégnées contre *An. gambiae* (Hougard, 2003).



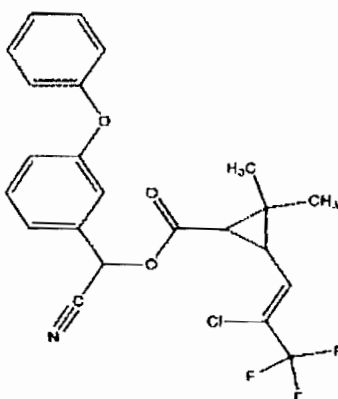
**Figure 8 :** structure chimique de la perméthrine

([http://www.internat.martinique.free.fr/question\\_academie\\_medecine.htm](http://www.internat.martinique.free.fr/question_academie_medecine.htm) Consulté le 20/12/2006).

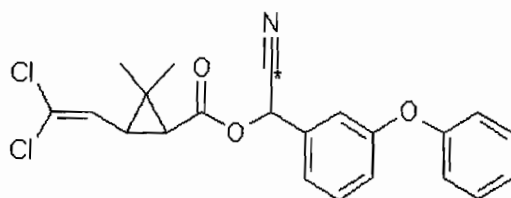




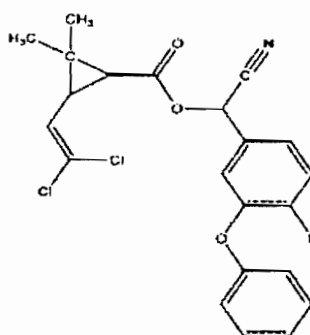
**Figure 9** : structure chimique de la deltaméthrine  
 (<http://www.e.brousse.9online.fr/chimie.html> consulté le 20/12/2006).



**Figure 10** : structure chimique du lambda-cyhalothrine.  
 (<http://www.pesticideinfo.org/ChemGifs/PC35463.gif>, consulté le 20/02/2007)



**Figure 11** : structure chimique de la Cyperméthrine  
 ([http://www.izotop.hu/html/molbio/insec\\_3.htm](http://www.izotop.hu/html/molbio/insec_3.htm), consulté le 20/12/2006)



**Figure 12** : Structure chimique de la cyfluthrine  
 ([www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec...](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec...), consulté le 20/02/2007)

### 3.3.2. Les répulsifs

Ce sont des substances odoriférantes qui ont la faculté de repousser les insectes. Ils présentent en générale une faible rémanence et une durée moyenne de répulsion de 6 à 7h.

Ils ont cinq 5 modes d'action variables :

- Inhibition de la réponse à un signal attractif.
- Réorientation du message sensoriel de l'attraction à la répulsion.
- Activation d'un récepteur qui contrôle un comportement compétitif.
- Activation simultanée de différent type de récepteur causant la perte du signal spécifique permettant la localisation de l'hôte.

On distingue deux groupes de répulsifs : les répulsifs naturels et les répulsifs synthétiques

#### - Les répulsifs naturels

Certaines plantes aromatiques comme *Azadirachta indica*, *Eucalyptus spp*, *Daniellia oliveri* sont utilisées à l'état frais ou à l'état sec contre les piqûres des moustiques (Palsson *et al.*, 1999 ; Seyoum *et al.*, 2002).

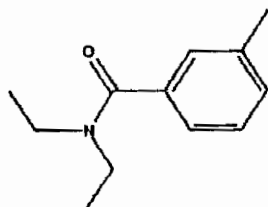
D'autres comme *Lippia javanica*, *Pelargonium reniforme* et *Cymbopogon excavatus* confèrent par leur extraits alcooliques une protection variant entre 60 à 80% contre *An.arabiensis* (Govere *et al.*, 2000).

#### - Les répulsifs synthétiques

Le N, N-Diethyl-3-methyl-benzamide (DEET), l'éthyl-butylacétylaminopropionate (IR3535 ou « Insect repellent 35/35 ») et l'ester methyl-1 proylique de l'acide (hydroxy-2 éthyl) –2 pipéridine carboxylique (KR3023 ou Icaridin) sont les répulsifs synthétiques les plus utilisés.

#### \* Le DEET

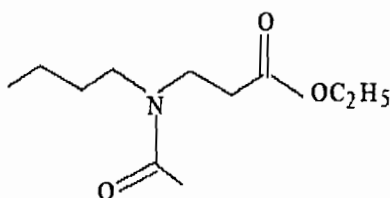
Le DEET (**fig.13**) offre un temps de protection bref et son efficacité vis à vis des vecteurs du paludisme est variable selon les espèces. Cela s'observe avec *Aedes.aegypti* qui tolère moins le DEET par rapport à *An. pulcherrimus* et *An. albimanus* (Rutledge *et al.*, 1978 ; Schreck, 1985 ; Curtis *et al.*, 1987).



**Figure 13** : Structure chimique du DEET  
([www.infoscience.fr/.../moustique/moustique4.html](http://www.infoscience.fr/.../moustique/moustique4.html) consulté le 23/02/2006)

**\* IR3535**

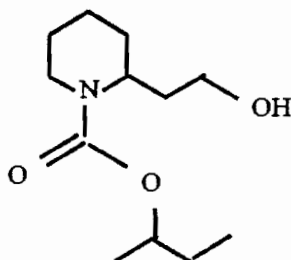
Selon une étude réalisée en 1998 par l’OMS, l’action de l’IR3535 est pratiquement identique à celle du DEET. L’IR3535<sup>®</sup> protège à 100 % pendant 10h contre *Aedes aegypti* (MTS, 2001) et à 90% pendant 6h contre *An. gambiae* Giles et *An. funestus* Giles (Marchio, 1996).



**Figure 14** : Structure chimique de l’IR3535 (WHO, 2001).

**\* KR3023**

Le KR3023 est plus efficace que le DEET contre *Aedes aegypti* (L), *Aedes Albopictus* (Skuse) et *An. gambiae* (Yap *et al.* , 1998; Badolo *et al.* , 2004 ). Il présente l’avantage d’être applicable sur la peau, les surfaces et d’avoir un profile toxicologique favorable (Nentwig *et al.* , 2002 ).



**Figure 15** : Structure chimique du KR3023 (WHO, 2004).

### **3.3.3. Les régulateurs de croissance**

Ces produits ont en commun le fait de désorganiser d'une façon ou d'une autre le développement des insectes.

#### **- Les inhibiteurs de la synthèse de chitine.**

La chitine est la substance qui donne sa dureté à la cuticule des arthropodes. Certains produits comme le Diflubenzuron ont pour effet de bloquer les glandes qui la produisent. L'insecte reste donc mou et succombe rapidement aux agressions du milieu. Ces produits ont une toxicité très faible pour les vertébrés mais sont dangereux pour les crustacés dont la carapace contient également de la chitine.

#### **- Les composés hormonaux**

La mue des insectes est commandée par un système d'hormones. L'une d'entre elles, l'Hormone Juvénile, reste présente chez l'insecte durant tout le stade larvaire. L'arrêt de sa sécrétion commande la métamorphose en adulte. Des composés de synthèse comme le S-Méthoprène ou le Pyriproxifen imitent l'hormone Juvénile. Leur présence dans le milieu conduit à la mort de l'insecte à l'émergence.

## **4. La résistance d'*An. gambiae s.l* aux insecticides**

Le phénomène de résistance a été défini par l'O.M.S comme « la capacité d'une population d'insectes à tolérer des doses d'insecticides qui seraient létales pour la majorité des individus dans une population normale de la même espèce» (OMS, 2004a).

### **4.1. Les mécanismes de la résistance**

Les mécanismes de résistances peuvent être repartis en trois types: les modifications comportementales, physiologiques et biochimiques.

#### **4.1. 1. Les mécanismes de la résistance comportementale**

On peut distinguer deux catégories de mécanismes comportementaux de “résistance”, qui permettent aux insectes d’éviter le contact avec le produit toxique ou qui limitent la durée de ce contact.

##### **- La résistance associée à la mobilité de l’insecte**

L’insecte peut être amené à se déplacer pour fuir un environnement où des substances toxiques sont présentes. Chez le moustique l’irritabilité du DDT entraîne un comportement de fuite ou d’évitement, de sorte qu’il a tendance à quitter les maisons traitées avant d’avoir absorbé la dose létale (Darriet *et al.*, 2002). Ce comportement est la conséquence d’une simple répulsion par les substances toxiques ou de leur reconnaissance par l’insecte. Ainsi celui ci évite leur contacte et échappe à leurs effets (Davidson, 1953).

##### **- La résistance associée à l’immobilité de l’insecte**

Ce type de résistance s’observe chez l’insecte qui réduit ses activités locomotrices afin de limiter le temps de contact avec l’insecticide.

#### **4.1.2. Les mécanismes de la résistance physiologique**

La résistance physiologique s’exprime au niveau des tissus et des organes ; elle est caractérisée par une diminution de la pénétration ou par une augmentation de l’excrétion des insecticides (Haubruge *et al.*, 1998).

##### **- La pénétration réduite**

Pour atteindre leurs cibles moléculaires, les insecticides pénètrent à l’intérieur des insectes en traversant soit la cuticule, soit les parois du tube digestif. Cette pénétration a lieu à une vitesse variable en fonction de la molécule toxique et de l’espèce. Si la cinétique de pénétration est suffisamment lente, l’insecticide pourra être dégradé par les systèmes de détoxification et aura peu d’effet sur l’insecte (Haubruge *et al.*, 1998).

### **- L'excrétion des insecticides**

Ce type de résistance est mal connu chez les insectes ; cependant un cas de résistance au vanadate et au thiabendazole chez *Caenorhabditis elegans* est associé au gène SKS1 (+) (Multi Drug Resistance). Lorsque ce gène est surexprimé, il entraîne la synthèse d'une protéine qui expulse le toxique hors du nématode (Haubruge *et al.*, 1998)

### **4.1. 3. Les mécanismes de la résistance biochimique**

La résistance biochimique se situe au niveau cellulaire. Elle consiste d'une part, en une augmentation de l'activité enzymatique des systèmes de détoxification et d'autre part, en une diminution de l'affinité des sites d'action vis-à-vis des insecticides (Haubruge *et al.*, 1998).

#### **- La détoxification**

La détoxification des insecticides chez les insectes se traduit le plus souvent par une perte de l'activité des produits avec un développement du phénomène de résistance. Quatre types d'enzymes participent à ce processus : les cytochromes P450, les glutathion-S-transférases (GST), les hydrolases (Estérases) et les oxydases (Haubruge *et al.*, 1998).

#### **\*Les cytochromes P450**

Les cytochromes P450 fonctionnent comme les éléments du système immunitaire. Ils interviennent dans les réactions de défenses et sont induits par la présence des substances toxiques qu'ils métabolisent (Haubruge *et al.*, 1998). Les cytochromes P450 sont les accepteurs finaux d'une chaîne de transporteurs d'électrons qui comporte une flavoprotéine : la NADPH-cytochrome P-450 réductase qui transfère les deux électrons du NADPH au cytochrome P450. Celui-ci, grâce à ces électrons peut greffer un atome d'oxygène sur son substrat modifiant ainsi sa structure (Haubruge *et al.*, 1998).

Chez les souches résistantes, la métabolisation de plusieurs carbamates est en relation avec une forte activité des mono-oxygénases à cytochromes P-450. Elle est associée à la fraction microsomale ainsi qu'au cofacteur NADPH et est susceptible d'être bloquée par le pypéronyl butoxide. Le système cytochrome P450

intervient dans la résistance de *Culex pipiens* au propoxur (Shrivastata *et al.*, 1970) et d'*Anopheles albimanus* vis-à-vis des pyréthrinoïdes (Brogdon *et al.*, 1997).

#### **\* Les estérases**

Les estérases catalysent l'introduction d'une molécule d'eau au niveau d'une liaison ester ou amide, spécifique du substrat. Les estérases impliquées dans les résistances peuvent être réparties en deux catégories : les carboxylestérases qui ont une action directe dans la dégradation d'organophosphorés et les estérases non spécifiques qui fixent l'insecticide sans le dégrader (Haubruge *et al.*, 1998). Les carboxylestérases présentant une activité accrue ou pas à l'égard de l'ester de naphthyle jouent un rôle important dans la résistance aux pesticides.

La résistance liée aux estérases peut être inhibée par l'utilisation du triphényl de phosphate qui diminue l'activité des estérases vis-à-vis de l'acétate de naphthyle (Hemingway, 1992 ; 1995).

#### **\* Les oxydases**

Les oxydases assurent la conjugaison des insecticides avec la forme réduite du glutathion, conduisant ainsi à la formation d'un métabolite moins toxique que le produit initial.

#### **\* Les glutathion S-transférases**

Les glutathion S-transférases (GST) catalysent la conjugaison des xénobiotiques au glutathion endogène, formant ainsi un acide mercapturique qui est ensuite facilement excrétable. Il existe deux formes de GST chez les insectes. Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules des corps gras et des muscles (Franciosa., *et al* 1985).

#### **- La modification des cibles**

La plupart des insecticides de synthèse agissent sur le système nerveux et ses afférents, par conséquent leur inaptitude à agir sur celui-ci conduirait à la résistance.

#### **\* Le canal sodium « voltage dépendant » (C<sub>svd</sub>)**

La pyréthriinoïde ou le DDT provoquent chez l'insecte un effet Knock down (KD). Cet effet est dû à la fixation des pyréthriinoïdes ou du DDT sur le Canal sodium voltage dépendant (C<sub>svd</sub>) qui est situé sur la membrane plasmique des cellules nerveuses. Le C<sub>svd</sub> change de conformation lorsqu'il est soumis à une variation de potentiel de membrane et prend une forme de pore dans lequel les ions sodium s'engouffrent. Ce phénomène est à l'origine de la phase ascendante des potentiels d'action. Le DDT ou le pyréthriinoïde en se fixant sur l'un des sites d'action où s'ancrent les substances neurotoxiques, empêche la fermeture du canal perturbant ainsi la transmission synaptique de l'influx nerveux (Lombet *et al.*, 1988). La modification de l'un ou des sites d'action du C<sub>svd</sub> jouerait un rôle important dans le phénomène de la résistance.

#### **\* L'acétylcholine estérase (AChE)**

L'AChE est la cible des organophosphorés et des carbamates, son rôle est d'hydrolyser l'acétylcholine pour permettre la fermeture des canaux associés aux récepteurs du neurotransmetteur. Une modification sur l'AChE aurait pour résultat une résistance aux organophosphorés et aux carbamates.

#### **\* Les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyriques (GABA<sub>r</sub>)**

Les GABA<sub>r</sub> sont les cibles de nombreux insecticides organohalogénés, dont la dieldrine et le lindane. Ces insecticides se fixent au récepteur de l'acide gamma-butyrique et inhibent le fonctionnement du canal chlore qui lui est associé. L'ouverture de ce canal induit une hyperpolarisation de la membrane nerveuse et son inactivation prolongée, perturbe l'ensemble du fonctionnement du système nerveux (Haubruge *et al.*, 1998). Tout comme les cibles précédentes, la résistance est conséquence au changement de ces récepteurs.

### **4.2. Les bases moléculaires de la résistance aux insecticides**

La biologie moléculaire a permis de mettre en évidence deux mécanismes de résistance : la surproduction de protéines de détoxification et les mutations ponctuelles.



#### 4.2.1. La sur-expression des gènes

La production élevée d'estérase détoxifiants les insecticides est liée à une amplification génique. Chez *Culex quinquefasciatus*, la résistance aux organophosphorés s'explique par le fait que cette souche possède jusqu'à 250 copies d'un gène codant pour une estérase appelé « Estérase B1 » (Mouchès *et al.*, 1990). La résistance liée à la surproduction de cytochrome P450 est probablement due à l'action d'un facteur de régulation altéré et agissant en trans (Haubruge *et al.*, 1998). Le mécanisme de la glutathion-S-transférase est voisin de celui des cytochromes P450. Il s'agirait d'une surexpression sans amplification génique et un accroissement de l'activité spécifique d'une ou de plusieurs GST, liées à l'insertion de nucléotides causant l'addition d'acide aminés au niveau de la protéine (Fournier *et al.*, 1992 ; Franciosa *et al.*, 1985).

#### 4.2.2. Les mutations ponctuelles

Une ou plusieurs mutations ponctuelles peuvent modifier l'activité d'une enzyme de façon à ce qu'elle métabolise mieux les insecticides. Cette possibilité est très probable pour les cytochromes P450 et les GSTs. Le même type de modification peut diminuer la sensibilité d'une cible envers un insecticide comme celle observée avec l'acétylcholinestérase pour les organophosphorés et les carbamates ou la protéine du canal sodium pour le DDT et les pyréthriinoïdes. Les essais de laboratoire ont permis de révéler qu'une mutation du type kdr se trouverait à la base de la modification de cette protéine. La mutation Kdr se caractérise par une substitution d'une paire de base (TTA en TTT) ou (T|A en T( A) (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Ranson *et al.*, 2000) entraînant respectivement un changement de **leucine** en **phénylalanine** ou **leucine** en **sérine** dans le codon 104 de la séquence du gène de la « protéine canal sodique voltage » dépendant (Hemingway, 2004)

#### 4.3. La mutation Kdr au sein du complexe *An.gambiae.s.l.*

La distribution de la mutation Kdr au sein du complexe *An.gambiae.s.l.* est variable. En Afrique de l'Ouest, celle qui est présente chez *An.gambiae.s.s*

(Martinez-Torres *et al.*, 1998), diffère par une substitution de base de celle trouvée chez la même espèce en Afrique de l'Est (Ranson *et al.*, 2000).

L'espèce *An. gambiae s.s.* prise isolement dans ses différentes formes moléculaires, montrait une fréquence élevée de la mutation chez la forme S par rapport à la forme M (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Brooke *et al.*, 1999 ; Chandre *et al.*, 1999 ; Fanello *et al.*, 2002). Le même type de mutation est également présent chez *An. arabiensis* (Diabaté *et al.*, 2004 ; Verhaeghen *et al.*, 2006). L'analyse de l'allèle Kdr au sein de ce complexe a montré qu'il existait des homozygotes R/R et des hétérozygotes R/S au sein de ce groupe.

## **5. Méthodes d'évaluation de la résistance aux insecticides : test de sensibilité biologique**

La méthode OMS standard consiste à mesurer la mortalité d'un nombre de femelles d'anophèles d'une espèce connue, exposées dans des tubes spéciaux, à des papiers filtres imprégnés avec une concentration létale (dite dose discriminante) d'un insecticide. L'expérience est répétée quatre fois pour calculer le pourcentage (%) de mortalité dans les tubes contrôles et les tubes tests. Si la mortalité des contrôles est comprise entre 5% et 20%, la mortalité après exposition doit être corrigée en utilisant la formule d'Abbott (OMS, 2004a).

$$\% \text{Mortalité corrigée} = \frac{\% \text{Mort. Observée} - \% \text{Mort. Témoin}}{100 - \% \text{Mort. Témoin}} \times 100$$

L'appréciation de la sensibilité biologique se fait selon les critères définis par l'OMS en 1998, à savoir :

- de 98 à 100% de mortalité, la population testée est sensible.
- de 80 à 97% de mortalité, il y a une résistance possible à confirmer.
- moins de 80% de mortalité, la résistance est probable.

## 6. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

### 6.1. Définition

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) est basée sur la répllication *in vitro* de l'ADN et se fait par incubation dans un thermocycleur.

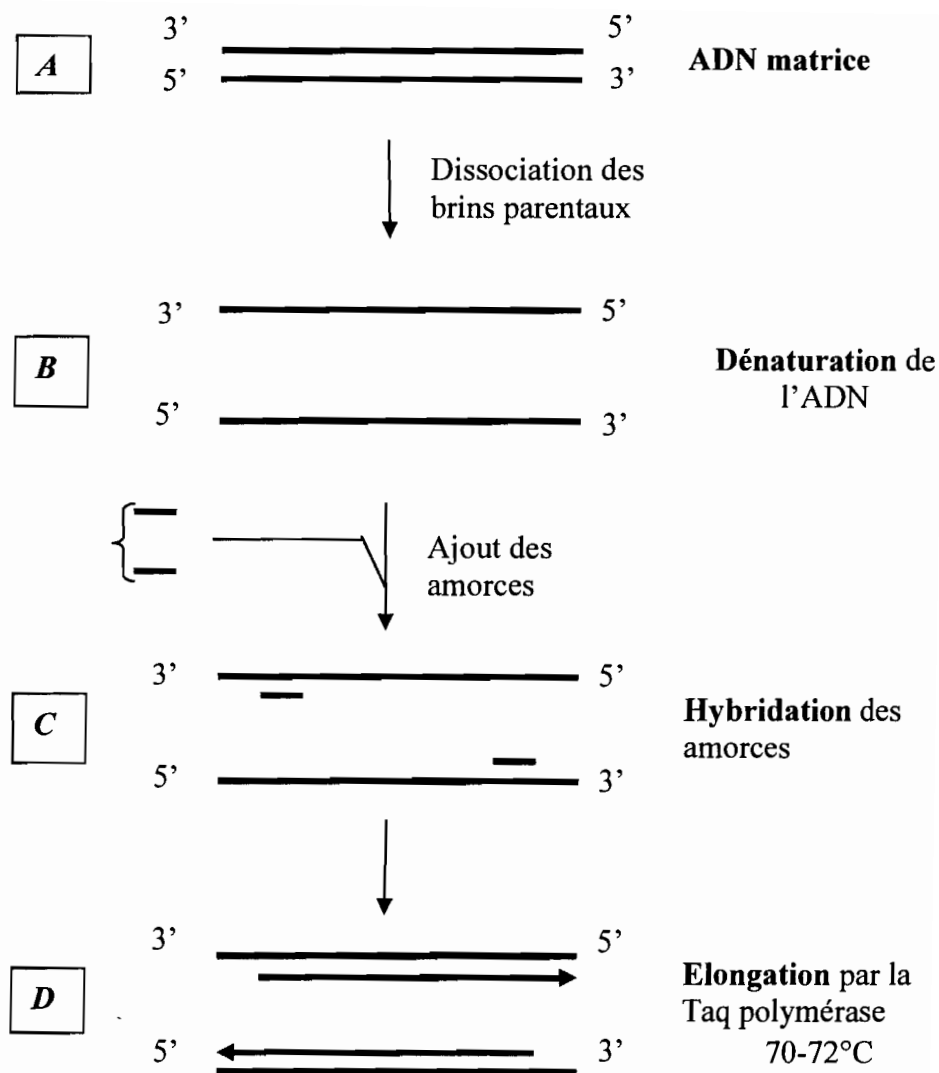
L'amplification de l'ADN est constituée de plusieurs cycles. Chaque cycle comporte trois étapes (**fig. 16**).

- la première étape consiste à chauffer l'ADN double brin à une température de 92-95°C pendant 30 à 60 secondes. Cette opération permet la séparation des deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes : c'est la **dénaturation**.

- la seconde étape est l'**hybridation** des amorces de manière spécifique à l'ADN simple brin. Le principe de l'hybridation est basé sur la complémentarité des bases (A=T, G=C). Elle se fait entre 50 et 65°C pendant 30 à 60 secondes. Les amorces servent de support à la Taq polymérase, qui se fixe à leur extrémité 3'OH.

- la dernière étape du cycle est la polymérisation ou phase d'**élongation**. Au cours de cette étape la Taq polymérase synthétise l'ADN à partir de déoxyribonucléotides Triphosphates (dNTP). L'élongation se fait dans le sens 5' vers 3', à la température de 70-72°C pendant 30 à 120 secondes.

Une trentaine de cycles sont nécessaires pour obtenir une quantité suffisante d'ADN pour la révélation (Paskewitch et Collins, 1990). La révélation peut se faire soit par électrophorèse, soit *in situ* par révélation isotopique ou immunochimique.



**Figure 16:** Schéma d'amplification d'une séquence d'ADN

## 6.2. Principe de l'identification des membres du complexe *An. gambiae* par la PCR

L'application de la PCR à l'identification des membres du complexe *An. gambiae* est basée sur l'analyse des mutations nucléotidiques au niveau de l'Acide DésoxyriboNucléique ribosomal (ADNr) présentes chez l'anophèle par centaines de copies organisées en tandem. Chaque unité répétitive est formée dans l'ordre de 5' vers 3', d'un espace transcrit externe (ETS), des régions codant pour les Acides RiboNucléiques ribosomiaux (ARNr) 18S et 28S qui sont séparées par un espace transcrit interne (ITS) contenant la région codant pour l'ARNr 5,8S (**Fig.17**). Ces motifs sont séparés entre eux par des espaces intergéniques (IGS) (Scott *et al.*,

1993). L'étude des différentes parties des ARNr du complexe *An. gambiae* a montré au niveau des espaces intergéniques, des variations interspécifiques et intraspécifiques. A côté des IGS très polymorphes, on trouve des régions codantes et très bien conservées chez toutes les espèces du complexe (Paskewitz *et al.*, 1990). Des régions bien conservées peuvent se retrouver dans les régions non codantes (Scott *et al.*, 1993). Les régions des ADN à amplifier sont choisies de telle sorte que celles-ci soient encadrées par les deux (2) oligonucléotides amorces.

La PCR permet une identification des espèces du complexe *An. gambiae*. Elle est également utilisée pour l'identification des formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.* Cependant, la PCR ne permet pas de faire la distinction entre les formes chromosomiques Bamako et Savanna. Ce problème ne se pose pas au Burkina où la forme chromosomique Bamako n'existe pas (Touré *et al.*, 1998).

Trois amorces sont utilisées pour l'identification d'*An. gambiae s.s.* et d'*An. arabiensis*. Il s'agit des amorces universelle (UN), *gambiae* (GA) et *arabiensis* (AR). L'amorce Universelle est commune aux deux espèces, l'amorce *gambiae* est spécifique à *An. gambiae s.s.* et l'amorce *arabiensis* est spécifique à *An. Arabiensis* (Paskewitz *et al.*, 1990).

Les amorces R3, R5, Mop/int et B/Sint sont utilisées pour l'identification des formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.* Mop/int est utilisée pour l'identification de la forme moléculaire Mopti et B/S pour celle des formes moléculaires B et S (Favia *et al.*, 2001).

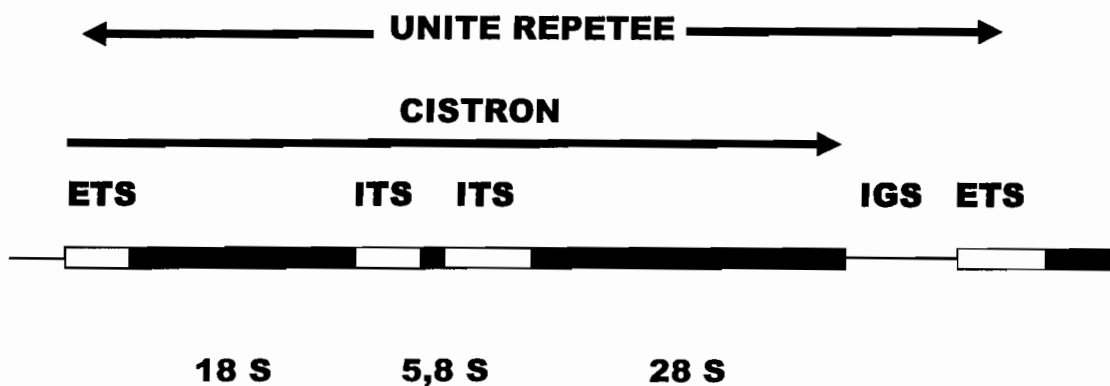


Figure 17 : Schéma d'une unité répétée en tandem

### **6.3. La distinction forme moléculaire M/S par la restriction**

La PCR-RFLP consiste à réaliser d'abord une amplification suivant le protocole de Paskewitz *et al* (1990), ensuite une restriction par une enzyme de restriction (*MseI*, *CfoI* ou *HhaI*).

L'existence de site de restriction (GCG/C) sur l'ADN amplifié de la forme chromosomique Savanna permet de faire agir une enzyme de restriction selon la technique de Fanello *et al* (2002). Le produit de cette digestion enzymatique est soumis à une migration sur gel d'agarose 1,5% et les bandes sont ensuite interprétées. La préparation du Mix (PCR, restriction) et le programme sont décrits en annexe.

### **6.4. La mise en évidence du gène Kdr par la PCR**

Le principe est basé sur l'analyse des mutations nucléotidiques portant sur une région de l'ADN codant pour la protéine du canal para sodium, l'un des sites de fixation des insecticides. Une PCR est faite selon le protocole Martinez-Torres *et al.*, (1998) en présence de couple d'amorce spécifique sensible ( $Agd_4/Agd_2$ ), résistant ( $Agd_1/Agd_3$ ) et contrôle ( $Agd_1/Agd_2$ ). Les produits de la PCR sont ensuite soumis à une migration sur gel d'agarose 1,5% puis les bandes sont interprétées.

### **6.5. La technique SSOP-PCR**

La SSOP-PCR utilise des spécimens dénaturés et amplifiés par PCR (**fig.19**). L'amplifiat est transféré sur des membranes de nylon et hybridé avec deux sondes d'oligonucléotides (l'un complémentaire de l'allèle sensible et l'autre complémentaire de l'allèle résistant) marqué à l'extrémité 3' par une substance non radio active [dioxygénine (DIG)]. La révélation est faite par dosage immunoenzymatique à l'aide d'un conjugué d'anticorps et la lecture par chimioluminescence. Cette méthode est caractérisée par l'hybridation spécifique de chaque sonde avec sa cible. Elle présente aussi l'avantage de génotyper efficacement les hétérozygotes (RS) ou les homozygotes (RR,SS) pour les deux allèles (R : résistant, S : sensible).

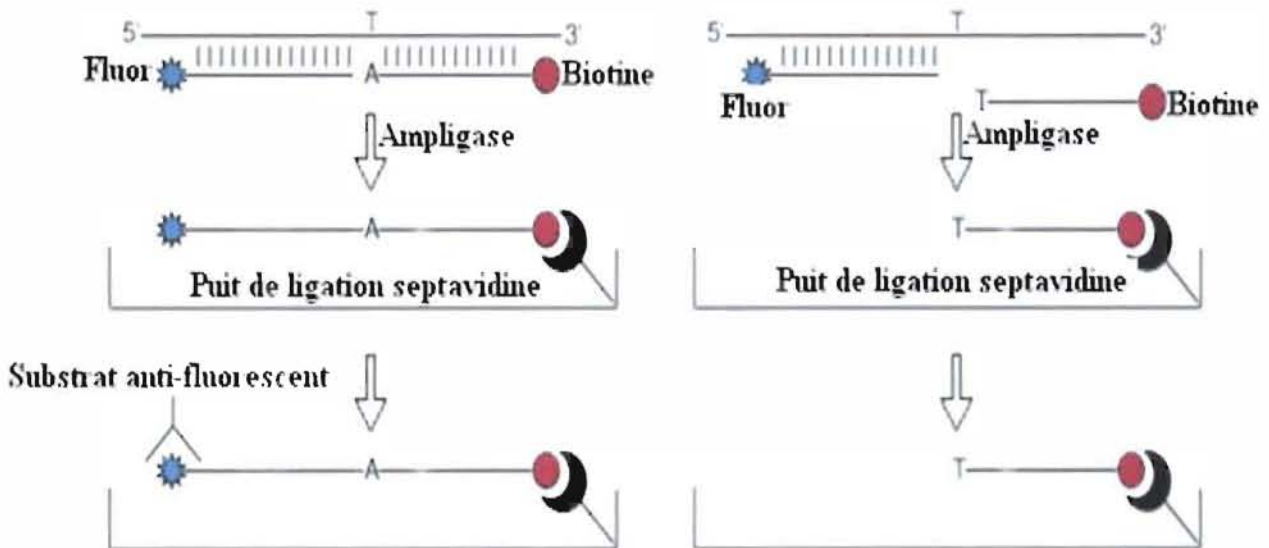
Dans le cas de la SSOP-PCR les amorces utilisées dans le protocole de Martinez-Torres *et al* (1998) sont remplacées par les amorces suivantes :

brin sens 5'TGGATTGAATCAATGTGGGATTG-3',  
 brin anti sens 5' -TGCCGTTGGTGCAGACAAGG- 3'.

(Kolaczinsky *et al.*, 2000).

### 6.6. La techniques du HOLA « Hot Oligonucleotid Ligation Assay »

Cette méthode utilise 3µl de produit PCR, en présence de deux types d'oligonucléotides (sensible et résistant, fig.8). Les oligonucléotides sont marqués par un fluorochrome et fixé à une plaque par un principe d'affinité biotine-avidine (Lynd *et al.*, 2005). Une deuxième amplification précède la révélation qui se fait par des anticorps antifuorochrome.



**Figure 18:** Technique du HOLA “hot ligation assay” (Lynd *et al.*, 2005)

### **III. OBJECTIFS**



### **Objectif général :**

Evaluer la résistance aux insecticides et la distribution du gène Kdr chez *Anopheles gambiae s.l.* dans différentes zones éco-climatiques avec différents niveaux d'exposition aux insecticides.

### **Objectifs spécifiques :**

- Tester la sensibilité. au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine des populations d'*Anopheles gambiae s.l.* provenant de 4 sites écologiques différents.
- Déterminer la distribution d'*An. arabiensis* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* dans ces dits sites.
- Rechercher le gène Kdr chez *An. arabiensis* et les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.*

# **IV. MATERIEL ET METHODES**

## 1. Zone d'étude et d'échantillonnage

L'étude s'est déroulée de juillet à novembre 2006 sur quatre sites différents (fig.19) : un site péri-urbain, deux sites ruraux et un site urbain.

Le site péri-urbain est situé à 20km du CNRFP, au sud de Ouagadougou dans le département de Saaba, province du Kadiogo. La présence d'un lac artificiel dans ce village permet la culture du riz et de légumes durant toute l'année. Cette retenue d'eau constitue un gîte permanent pour les moustiques et particulièrement les anophèles.

Un des sites ruraux est situé à environ 180 km à l'Est de Ouagadougou dans le village de Zampa, province du Boulgou et l'autre dans la province des Ballé à environ 180 km à l'Ouest de Ouagadougou. Sur les deux sites, le coton est cultivé de manière intensive.

Le site urbain est situé dans la ville de Ouagadougou aux abords du barrage numéro 3. Là également, les cultures de légumes et de riz se succèdent selon la saison.

Le climat dans ces sites est caractéristique des régions de savanes soudaniennes, avec une saison sèche de novembre à mai et pluvieuse de juin à octobre. La pluviométrie moyenne varie de 600 à 900 mm d'eau par an.

Les principaux vecteurs du paludisme rencontrés dans ces zones sont *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis*, et *An. funestus s.l.*. Ils transmettent dans 95% des cas *Plasmodium falciparum*.

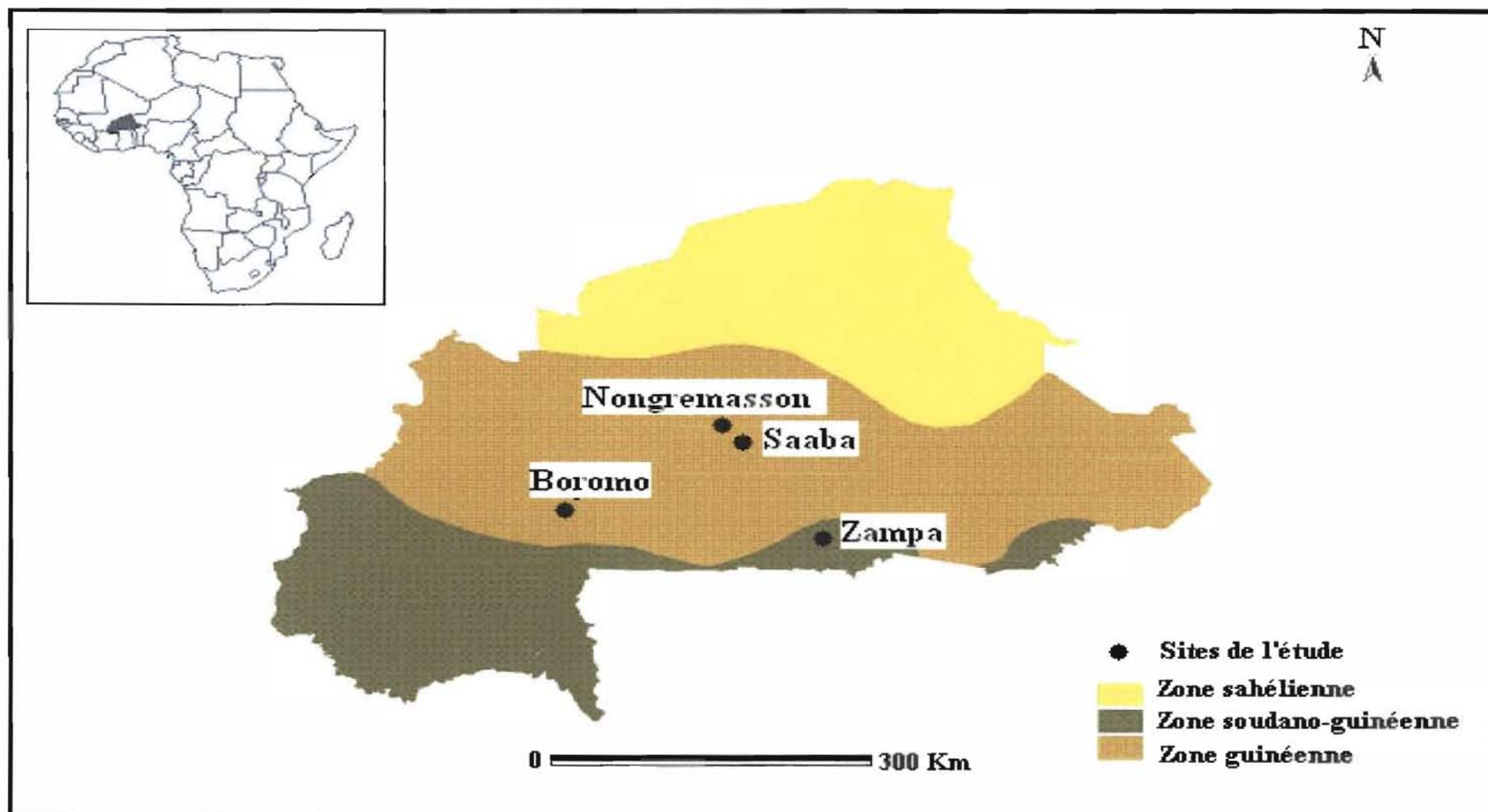


Figure 19 : situation géographique des quatre sites d'étude.

## **2. Echantillonnage des larves**

Une série de onze (11) collectes de larves à Nongremasson et Saaba, deux (2) à Zampa et une (2) à Boromo a été réalisée. Les collectes ont été faites en équipe avec les agents du CNRFP de juillet à août 2006.

Les prélèvements ont été faits selon la méthode du « Dipping » à l'aide de louches en aluminium munies de manches longues. Dans les petites collections d'eau (flaques et empreintes) la totalité du gîte a été prélevée. Quant aux gîtes de grande taille (canal, barrage, cave de briques), des prélèvements en plusieurs points ont été effectués. Les larves ont été ramenées à l'insectarium pour l'élevage.

## **3. Elevage des larves.**

A l'insectarium les larves sont triées puis mises dans des bacs, contenant l'eau de forage. Elles sont réparties en moyenne de cent (100) par bac pour optimiser leur croissance. L'utilisation de l'eau de forage non traitée a pour but d'éviter l'influence des résidus chimiques tels que l'hypochlorite de sodium sur la croissance larvaire. Les larves sont nourries avec des croquettes pour chat qui sont des aliments riches en protéine et en minéraux utilisées pour nourrir les larves. Chaque bacs est recouvert de toile moustiquaire et entreposé dans une salle dont l'humidité relative varie entre 70 à 80% et la température entre 25 à 30°C.

La photopériode est assurée par des tubes fluorescents éclairant de 6heure du matin à 6h du soir. A la fin de la phase imaginale les nymphes sont prélevées et mis dans une cage cubique de 30cm de côté. A l'émergence, les adultes sont nourris de jus sucré à 20% de saccharose. Les imagos de deux (2) à cinq (5) jours, sont contrôlés morphologiquement et les femelles sont isolées pour être soumises au test de sensibilité.

## **4. Test de sensibilité**

Suivant la méthode OMS (WHO, 1998), les épreuves de sensibilité ont consisté à déterminer la mortalité d'un nombre de femelles à jeun d'*An. gambiae s.l.* âgées de 2 à 5 jours à partir de la date d'émergence.

#### 4.1. Matériel de test

##### - *Le Kit OMS*

Les tests ont été réalisés avec les kits OMS comprenant des tubes d'aspiration (**fig.20**), des tubes d'exposition à l'insecticide marqués en rouge (**fig.21**), des tubes d'observation marqués en vert (**fig.22**), des anneaux de cuivre et d'argent, des papiers filtres de 145x120 mm imprégnés d'insecticide, des papiers de contrôle imprégnés d'huile (ou à défaut des feuilles blanches normales) et des aspirateurs à bouche.

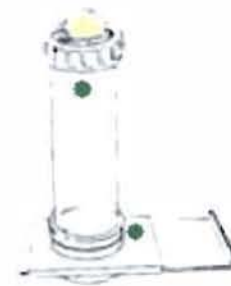
Les tubes d'observation et d'exposition mesurent 125mm de long et 45mm de diamètre. Les tubes d'observation (vert) sont tapissés de feuilles blanches normales sans insecticide et retenu contre la paroi par un anneau d'argent tandis que les tubes d'exposition (rouge) sont tapissés de papier imprégné d'insecticide retenu également contre la paroi par un anneau de cuivre. Les tubes d'aspiration ont servi à introduire les moustiques dans les tubes d'observation.



**Figure20** : Tube d'aspiration (WHO, 2006)



**Figure 21** : tube d'exposition  
(WHO, 2006)



**Figure22**: Tube observation  
(WHO, 2006)

### *- Les insecticides*

Des femelles d'anophèles ont été testées vis-à-vis de deux pyréthriinoïdes (la perméthrine à 0,75%, et la deltaméthrine à 0,05%) et d'un organochloré (le DDT à 4%). Les concentrations observées pour ces insecticides sont considérées comme discriminatives de la sensibilité (WHO, 1998).

## **4.2. Déroulement du test**

Un test normal, demande un minimum de cent cinquante (150) moustiques par insecticide. Cent (100) sont exposés à l'insecticide et cinquante (50) servent de témoins. Les tubes d'exposition réservés aux témoins sont tapissés de papier blanc normal sans insecticide. Cent cinquante (150) femelles a jeun ont été transférées dans les tubes d'observation. Les moustiques sont repartis par nombre de vingt cinq (25) par tube. L'ensemble est laissé en observation pendant 60min dans le but de permettre aux moustiques de récupérer et de s'assurer que le transfert n'a eu aucun effet léthal sur eux. Les moustiques tombés durant cette mise en observation sont remplacés avant le début du test, par des vivants de même provenance, espèce, âge et même état. Le déroulement du test peut être décrit en quatre (4) étapes.

**Etape 1 :** A l'issue des 60 min d'observation, un dispositif technique est mis en place pour obtenir des conditions favorables au test (température :  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  ; humidité relative : 70 à 80%). Les tubes sont montés deux (2) à deux (2) l'un contre l'autre sur un tiroir (**tube contrôle/tube d'exposition ; fig.24**). Le tiroir comprend une glissière permettant son ouverture et sa fermeture et deux faces dont l'une est marquée en vert et l'autre en rouge. La face marquée en vert du tiroir est dirigée vers le tube d'observation (vert) et la face marquée en rouge vers le tube d'exposition (rouge)

**Etape2 :** Ouvrir la glissière de sorte à faire communiquer les 2 tubes et faire passer tous les moustiques du tube d'observation vers le tube d'exposition (**fig.21**). Le passage se fait en soufflant avec délicatesse à travers la toile de moustiquaire tapissant le bout du tube contenant les moustiques. Fermer la glissière après le passage, déconnecter le tube d'observation et garder les tubes en position verticale

pendant toute la durée du test. Les moustiques des tubes témoins sont traités de la même manière.

**Etape 3 :** Au passage dans chaque tube, un chronomètre est mis en marche et le temps est compté. L'exposition a duré 60min au cours desquelles le nombre de moustique qui tombe sous l'effet de choc « Knock down » (KD) de l'insecticide est noté à intervalle de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 et 60 (min).

**Etape 4 :** A la fin du temps d'exposition, les moustiques sont re-transférés dans les tubes d'observation et laissés 24 heures avec un coton imbibé de solution de saccharose, dans les mêmes conditions de température et d'humidité (**fig.22**). Au bout de ces 24h d'observation, la survivance et la mortalité sont évaluées dans le lot des moustiques soumis à l'insecticide et dans celui des moustiques témoins.



**Figure23 :** Mise en tube des moustiques (WHO, 2006)



**Figure24 :** Tube monté 2 à 2 lors du transfert (WHO, 2006)

#### 4.3. Analyse des données

Elle a consisté à déterminer le taux de mortalité et les temps de *Knock down* (KD) 50 et 95%.



### 4.3.1. Mortalité

Pour une bonne interprétation des résultats, la mortalité du lot témoin doit être inférieure à 5%; en cas de mortalité comprise entre 5% et 20%, la formule d'Abbott qui corrige la mortalité des moustiques exposés, permet encore l'exploitation des données. Si la mortalité du lot témoin est > 20%, le test est à refaire.

- En fonction des résultats, l'OMS recommande l'interprétation suivante :

**98 à 100% de mortalité** équivaut à une **sensibilité**.

**80 à 97% de mortalité** équivaut à une **résistance possible à confirmer** (En refaisant le test ou mieux en testant la descendance des individus survivants).

**< 80% de mortalité** équivaut à une **résistance probable**.

Ces critères sont à moduler selon les conditions expérimentales avec des conditions optimales de réalisation. Une mortalité inférieure à 95% dans les effectifs supérieurs à 100 permet de suspecter fortement une résistance.

### 4.3.2. Détermination des temps *Knock down* (KD) 50 et 95%

Les temps de  $KD_{50}$  et  $KD_{95}$  correspondent au temps au bout desquels respectivement 50% et 95 % de la population sont tombés sous de l'effet de choc de l'insecticide. Le nombre de moustiques morts ou paralysés au fond du tube (moustiques "*knocked-down*") noté toutes les 5 minutes pendant le temps d'exposition diagnostique de 60 minutes a été utilisé pour déterminer les temps *Knock down*.

L'analyse des temps de KD apporte plus d'information sur l'apparition précoce de la résistance que la seule mortalité. L'augmentation des temps de KD est plus rapidement observée que la diminution significative de la mortalité.

## **5. Identification moléculaire des membres du complexe *An. gambiae.s.l.***

### **5.1. Extraction de l'ADN**

L'ADN total de chaque moustique est extrait selon le protocole décrit par Paskewitz *et al* (1990). Le moustique est homogénéisé dans 100µl de solution tampon de cassage «Grinding buffer» (5M de NaCl, 0,5M d'EDTA, 1M de tris-HCl, 10% de SDS et pH = 7,5), à l'aide de pestelles et de rotors, puis incubée à 65°C pendant 30 min. On ajoute ensuite 14 µl d'acétate de potassium à 8M pour précipiter les protéines et après avoir bien mélangé au vortex, on incube à -20°C pendant 30 min. On procède ensuite à une centrifugation à 14.000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est alors prélevé puis ajouté à 200µl d'éthanol 100% contenu dans un tube (Eppendorf) préalablement préparé (portant le numéro d'identification du moustique).

Le nouveau mélange est incubé à -20°C pendant 30 min, puis centrifugé à nouveau à 14.000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est vidé, on ajoute 200µl d'éthanol 70°C et l'on centrifuge à nouveau pendant 5 min. Le surnageant est encore vidé et le tube séché dans l'étuve à vide ou sous une hotte. Le culot d'ADN obtenu est dissout dans 300µl d'eau distillée stérile et conservé à -20°C.

### **5.2. Identification des membres du complexe *Anopheles gambiae***

Les membres du *complexe An. gambiae* ont été identifiés par la technique de Fanello *et al* (2002).

#### **5.2.1. Amplification**

Pour chaque spécimen, 0,8µl d'ADN ont été amplifiés dans 9,2µl d'un mixte composé d'une solution d'H<sub>2</sub>O, de Buffer X10, de MgCl<sub>2</sub>[25mM], de dNTPs[10mM], de UN[4mM], de GA[2mM], de AR[6mM] et 0,07µl de taq.

- UN ou amorce universelle est commun à toutes les espèces d'Anophèles (séquence en annexe1).

- GA est une amorce spécifique d'*Anopheles gambiae.s.s* (séquence en annexe).

- AR est une amorce spécifique d'*Anopheles arabiensis* (séquence en annexe.1).

L'amplification a lieu dans un thermocycleur de type PTC-100 ou PTC-200 ou Mastercycler selon le programme suivant : 2 min à 94°C, suivi de 30 cycles consistant chacun en une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30s, une hybridation des amorces à 50°C pendant 30s, une élongation à 72°C pendant 30s. L'amplifié est ensuite maintenu à 72°C pendant 7min pour parfaire l'élongation. La composition volumétrique du mixte est présentée en annexe.

### **5.2.2. Restriction**

Les produits de la PCR sont soumis à une digestion par l'enzyme *CfoI* qui reconnaît la séquence GCG/C. Dans chaque tube est ajouté 1µl de mixte composé de Buffer, de l'eau bi-distillée et de l'enzyme (*CfoI*) et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 3h (Fanello *et al.*, 2002). La composition volumétrique du mixte est présentée en annexe.

### **5.2.3. Electrophorèse**

Les produits de la digestion enzymatique sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromide d'éthidium à 3%.

Ce gel est préparé en dissolvant 1,5 g d'agarose dans 100 ml de tampon TBE (Tris-Borate-EDTA. 0,5 X). Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition dans un four à micro-onde. Le gel est refroidi à environ 45°C et 3 µl de bromide d'éthidium sont ajoutés. Le bromide d'éthidium se fixe sur les ponts hydrogènes des acides nucléiques, ce qui rend les bandes d'ADN fluorescentes. Le mélange est ensuite coulé dans un bac à électrophorèse contenant des peignes et laissé à la température ambiante pour la solidification.

Après la solidification du gel, les peignes sont retirés. Le gel est déposé dans un bac rempli de TBE 0,5X et 12 µl d'un mélange (2 µl de tampon de migration plus 10 µl de l'ADN amplifié et digéré) est logé dans chaque puits. Les puits extrêmes (le premier et le dernier puits) sont chargés avec les contrôles positifs constitués d'*Anopheles arabiensis* et de la forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* La migration est faite à 100 volts (V) pendant 30 mn et la lecture des bandes d'ADN se fait par

révélation aux rayons ultra violets (UV) à 312 nm. Le gel est placé au dessus des rayons ultra violets et grâce à la fluorescence du bromide d'éthidium, les bandes d'ADN deviennent visibles. Une photographie du gel est réalisée et interprétée.

#### 5.2.4. Interprétation des bandes d'ADN

Après la restriction par l'enzyme *CfoI*, l'espèce *An. arabiensis* se caractérise par une bande à **315 bp**. La forme moléculaire **M** de l'espèce *An. gambiae s.s.* présente une bande à **390 bp**, tandis que la forme moléculaire **S** d'*An. gambiae s.s.* se caractérise par deux bandes, la première à **300 bp** et la deuxième à **100bp (photo1)**.

### 5.3. Caractérisation moléculaire du gène Kdr chez *An.gambiae s.l.*

Cette caractérisation a été faite après l'identification moléculaire des membres du complexe *An. gambiae s.l.* Cette caractérisation est basé sur l'analyse des mutations nucléotidiques portant sur une région de l'ADN codant pour la protéine du canal para sodium, l'un des sites de fixation des insecticides.

#### 5.3.1. Amplification

L'ADN est amplifié selon le protocole décrit par Martinez-Torres *et al* (1998). 0.5µl d'ADN sont amplifié dans 10 µl de solution mixte contenant du Buffer (1X), MgCl<sub>2</sub> (1.5 M), dNTPs (0.1 M), de la taq (1.5 U), Agd1 et Agd2 (40 pmole) et amorces spécifiques Agd3 et Agd4 (20 pmoles).

Agd1 et Agd2 sont respectivement des amorces sens et anti sens communes à la souche homozygote (sensible : **SS** ou résistante : **RR**) et hétérozygote (**RS**).

Agd3 est spécifique à la souche résistante.

Agd4 s'hybride sur le génome de la souche sensible.

Le mélange est incubé dans un thermocycleur selon le programme suivant : Un premier cycle de 94 °C pendant 3 min, 48 °C pendant 30 s, 72 °C pendant 30 s, suivi de 45 cycle de 94 °C pendant 30 s, 48 °C pendant 30 s, 72 °C pendant 30 s et d'une élongation finale à 72 °C pendant 5 min. La composition volumétrique du mix est présentée en annexe.

### **5.3.2. Electrophorèse**

Un gel de 1,5% d'agarose et de 6% de Bromide d'éthidium est préparé dans les mêmes conditions que celui qui a servi à l'identification des espèces. 12 µl de produit PCR sont migrés pendant 45min sous une tension de 100 volts.

### **5.3.3. Interprétation des bandes d'ADN**

Les homozygotes (SS ou RR) et les hétérozygotes (RS) présentent tous une bande à 300bp. La deuxième bande des SS se situe à 140bp et celle des RR à 200bp. En plus de la bande à 300bp, deux bandes situées l'une à 200bp et l'autre à 140bp caractérisent les RS.

## **6. Analyses statistiques**

Les données ont été saisies dans Excel. Les  $KDT_{50}$  et  $KDT_{95}$ , ont été calculés à partir du logiciel XL-STAT 7.5.3, selon le modèle log-probit (Finney, 1971), avec un intervalle de confiance de 95% et une convergence de 0.000001. La comparaison de la fréquence du gène Kdr entre village a été faite avec le test de Student à l'aide du logiciel SYSTAT.9.

## **V. RESULTATS**

## 1. Mortalité d'*An.gambiae.s.l.* 24h après le test

Les pourcentages de mortalité enregistrée dans les témoins ont toujours été inférieurs à 5%. Aucune correction de la mortalité n'a donc été nécessaire.

Ces pourcentages de mortalité ont varié de 56 à 93% pour le DDT. Le plus faible pourcentage a été observé à Zampa (56%) et le plus élevé à Nongremasson (93%). Les taux de mortalité ont varié de 98 % à Boromo et Saaba à 100 % à Zampa et Nongremasson pour la perméthrine (**Tableau I**). Pour ce qui concerne la deltaméthrine une mortalité de 100 % a été observée dans les trois villages où elle a été testée.

**Tableau I** : Taux de mortalité et effectif des populations testées ( ) aux trois insecticides dans les 4 sites.

Village	DDT 4%	Perméthrine 0,75%	Deltaméthrine 0,05%
Boromo	88%(102)	98%(107)	100%(97)
Nongemasson	93%(102)	100%(106)	100%(105)
Saaba	92%(107)	98%(105)	*
Zampa	56%(100)	100%(102)	100%(100)

\* : insecticide non testé

## 2. Temps de Knock down observé dans les quatre sites

Les tableaux I,II, III et IV regroupent les données respectives des KDT<sub>50</sub> et KDT<sub>95</sub> du DDT, de la perméthrine, et de la deltaméthrine pour les quatre sites d'études.

Pour ce qui concerne le DDT, les KDT déterminés pour les différentes localités ont varié de 30,52 à 47,52 pour le KDT<sub>50</sub> et de 66,77 à 105,69 min pour le KDT<sub>95</sub> (**Tableau II**). Les plus courts KDT<sub>50</sub> et KDT<sub>95</sub> ont été observés dans le village de Nongremasson. Les plus long temps de KD<sub>50</sub> et KD<sub>95</sub> ont été observés à Zampa.

**Tableau II** : Temps de KDT<sub>50</sub>, KDT<sub>95</sub> et les intervalles de confiances () à 95% pour le DDT4% par village.

Village	DDT 4%	
	KDT <sub>50</sub> (min)	KDT <sub>95</sub> (min)
Boromo	<b>37,36</b> (35,51-39,42)	<b>79,90</b> (71,92-91,18)
Nongremasson	<b>30,52</b> (29-32,11)	<b>66,77</b> (60,70-75,08)
Saaba	<b>34,84</b> (33,28-36,50)	<b>69,50</b> (63,67-77,43)
Zampa	<b>47,52</b> (44,74-50,97)	<b>105,69</b> (91,61-127,92)

Pour la perméthrine, le KDT<sub>50</sub> a varié de 5,16 à 13,33min et les KDT<sub>95</sub> de 25.63 à 38,34 dans tous les sites (**Tableau III**). Le temps minimal de KDT<sub>50</sub> a été observé à Boromo (5,16min) et le maximal à Nongremasson (13.33min). Quant au KDT<sub>95</sub>, la plus petite valeur a été relevée à Nongremasson (25.63min) et la plus grande à Saaba (38,34). Le KDT<sub>95</sub> de la perméthrine a été en dessous d'une heure pour tous les échantillons des quatre villages.

**Tableau III** : Temps KDT<sub>50</sub>, KDT<sub>95</sub> et les intervalles de confiance () à 95% pour la perméthrine par village.

Village	Perméthrine 0.75%	
	KDT <sub>50</sub> (min)	KDT <sub>95</sub> (min)
Boromo	<b>5,16</b> (3,99-6,27)	<b>34,93</b> (29,48-43,50)
Nongremasson	<b>13,33</b> (12,55 -14,07)	<b>25,63</b> (23,75-28,12)
Saaba	<b>12,07</b> (11,00-13,11)	<b>38,35</b> (34,45-43,60)
Zampa	<b>12,94</b> (12,07 -13,76 )	<b>27,51</b> (25,335-30,40)



La deltaméthrine 0.05% n'a été testé que pour trois sites (Boromo, Nongremasson, et Zampa). Les temps varient de 4,9min à 7,32 pour le KDT50 et de 9,28 à 14,82 pour le KDT95 (**Tableau IV**). Les temps les plus courts ont été observés à Nongremasson et les plus longs à Zampa.

**Tableau IV** : Temps de KDT50, KD95 et les intervalles de confiance ( ) à 95% pour la Deltaméthrine par village.

Village	Deltaméthrine 0.05%	
	KDT50 (min)	KDT95 (min)
Boromo	<b>5,82</b> (5,20-6,39)	<b>13,022</b> (11,603-15,17)
Nongremasson	<b>4,9</b> (4,37 -5,34)	<b>9,284</b> (8,260-11,10)
Saaba	*	*
Zampa	<b>7,32</b> (6,73-7,87)	<b>14,827</b> (13,44-16,80)

\* : Insecticide non testé

### **3. Distribution des membres du complexe *Anopheles gambiae* s.l. dans les quatre villages**

Sur les 1132 moustiques testés, 1073 ont été identifiées avec succès par la technique de la PCR soit un taux de succès de 95%. La forme moléculaire M d'*An. gambiae.s.s* a été dominante dans les quatre villages avec une fréquence moyenne de 0,70. La plus forte fréquence de la forme M a été observée à Saaba. Elle est suivie de la forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* avec une fréquence moyenne de 0,18. La plus forte fréquence de la forme S a été enregistré à Zampa. d'*An. arabiensis* à Boromo (0,32) et Nongremasson (0.16) (**Tableau V**).

**Tableau V :** Distribution des membres du complexe *An. gambiae s.l.* dans les 4 villages

Localités	<i>An.arabiensis</i>	Forme moléculaire M	Forme moléculaire S	Effectifs
Boromo	0,32	0,46	0,21	284
Nongremasson	0,16	0,74	0,11	390
Saaba	0,01	0,88	0,11	200
Zampa	0,01	0,70	0,29	199

#### 4. Distribution de fréquence du gène Kdr

##### 4.1 Fréquence du gène Kdr entre les sites

Les fréquences du gène Kdr ont varié de 0,05 à 0,23. La forte fréquence a été observée Zampa (0,23) et la plus faible à Boromo (0,05). L'analyse statistique de ces résultats montre qu'il n'y a pas de différence statistique entre les fréquences du gène Kdr dans les quatre villages ( $t = 1$  ;  $df = 3$  et  $p = 0.306$ )

**Tableau VI :** Fréquences du gène Kdr et effectifs des moustiques par village

Localités	Fréquences	Effectifs
Boromo	0,05	284
Nongremasson	0,07	388
Saaba	0,06	198
Zampa	0,23	197

##### 4.2. Fréquences du gène *Knock down résistance*(Kdr) au sein des membres du complexe *An.gambiae.s.l.* dans les quatre villages.

Le gène Kdr a été observé en au niveau des trois membres du complexe *An. gambiae*.

A l'exception de Saaba, les fréquences du gène Kdr ont été plus fortes au niveau de la forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s.* suivie de la forme moléculaire M d'*An. gambiae s.s* et d'*An. arabiensis* dans tous les sites, avec respectivement des

fréquences moyennes de 0,18; 0,078 ; 0,01. Les membres d'*An. arabiensis* qui ont présenté le gène Kdr proviennent tous de la localité de Nongremasson.

A Boromo les gènes Kdr ont été exclusivement observés au niveau de la forme moléculaire S d'*An. gambiae s.s* tandis qu'à Saaba c'est uniquement chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae s.s* que ces gènes ont été enregistrés.

**TableauVII :** Fréquence du gène Kdr au sein des membres du complexe *An. gambiae s.l.* dans les 4 sites d'études

Localités	<i>An. arabiensis</i>	forme moléculaire M	forme moléculaire S	Effectifs
Boromo	0,00	0,004	0,22	284
Nongremasson	0,04	0,07	0,12	388
Saaba	0,00	0,07	0,00	198
Zampa	0,00	0,17	0,38	197

## **VI. DISCUSSION**

Selon les critères définis par l’OMS, un taux de 100% de mortalité à un insecticide testé à la dose discriminante, traduit une bonne sensibilité. Si ce taux varie de 80 à 98%, il indique une résistance à confirmer. En dessous de 80%, il y a une résistance probable.

Les résultats obtenus avec le DDT indiqueraient une résistance probable à Zampa (56%) et une résistance à confirmer à Boromo (88%), Nongremassom (93%) et Saaba (92%).

Dans les quatre localités, les taux de mortalité ont varié de 98 à 100% avec la perméthrine traduisant ainsi une sensibilité à cet insecticide. Avec la deltaméthrine, on obtient des pourcentages de mortalité de 100% qui exprimeraient une sensibilité d’*An.gambiae.s.l* à cet insecticide dans les trois villages où elle a été testée. Nos résultats sont similaires à ceux de Diabaté *et al* (2002) au Burkina Faso, au cours d’une étude estimant la mortalité du complexe *Anopheles gambiae* issue de différentes zones (urbaine, rizicole, cotonnière et contrôle), par rapport à la perméthrine 1%, la deltaméthrine 0,05% et le DDT 4%. Une autre investigation récente (Ilboudo-Sanogo *et al.*, données non publiées) réalisée en 2005 sur la sensibilité d’*Anopheles gambiae s.l* aux insecticides à Boromo, Nongremassom, Saaba et Zampa a permis d’obtenir des taux de mortalité variant de 93 à 100% à la perméthrine 0,75%, de 99 à 100% à la deltaméthrine 0,05% et de 89,56 à 99% au le DDT 4%. La comparaison de ces données à celles de la présente étude montre une augmentation de la sensibilité des vecteurs à la perméthrine en 2006 contre une progression de la résistance au DDT. Pour ce qui est de la deltaméthrine, les vecteurs sont restés sensibles au cours des deux années.

L’observation globale de ces pourcentages de mortalité dans les quatre villages, montrerait une tendance à la résistance aux insecticides dans les zones à activités agricoles intenses. Les insecticides utilisés en agriculture étant les mêmes que ceux utilisés en santé publique, il se pourrait qu’une pression de leurs part soit en relation avec le phénomène de la résistance rencontré dans les zone de forte activité agricole comme Zampa et Boromo. Cet argument est aussi partagé par Akogbeto *et al* (2006), qui ont recherché au cours de leurs études, des résidus de pesticide dans le sol et les eaux des aménagements agricoles pouvant favoriser l’émergence des souches résistantes, des vecteurs du paludisme au Bénin.

Dans les sites périurbain et urbain, Saaba et Nongremassom bien que la maraîchéculture ne demande pas les mêmes besoins en insecticide que dans les zones

rurales, l'usage des insecticides associées à celle des bombes aérosols et serpentins contribueraient à la résistance au DDT, comme le montreraient Ouédraogo J.B. *et al.*, (données non publiées) et Matola *et al.*, (1990).

Au cours de l'étude actuelle, les tests de sensibilité ont permis de déterminer les temps de knock down 50 et 95 (KDT<sub>50</sub> et KDT<sub>95</sub>) des insecticides testés. En faisant encore le parallélisme aux données non publiées de Ilboudo-Sanogo *et al.*, la diminution des KDT50 de la perméthrine entre 2005 et 2006 confirmerait un regain de la sensibilité d'*An.gambiae s.l.* à cet insecticide. Tandis que l'allongement de celui du DDT ne ferait que démontrer la résistance au DDT à Zampa, Boromo, Nongremasson et Saaba. Avec la deltaméthrine on note une baisse des KDT50 et KDT95 de 2005 à 2006. Ce qui confirmerait d'avantage la sensibilité d'*An. gambiae s.l.* à ce pyréthrianoïde. La résistance au sein des membres du complexe *Anopheles gambiae.s.l.* serait aussi fonction de la distribution de ses membres. La technique de Fanello *et al* (2002) aurait permis d'identifier 1072 sur 1132 spécimens, soit un taux de succès de 95%.

Dans les quatre localités étudiées, la forme moléculaire M d'*Anopheles gambiae.s.s.* représenterait la plus forte fréquence (0,69). Elle est suivie de la forme moléculaire S (0,18) et de l'espèce *Anopheles arabiensis* (0,13). Ces fréquences confirment les observations déjà faites par Ilboudo-Sanogo (2001), sur la dominance de la forme moléculaire M d'*An. gambiae s.s.* par rapport aux autres espèces du complexe *An. gambiae s.l.* dans les différentes zones du Burkina Faso. La fréquence de chaque espèce donnée dans chaque zone serait en rapport avec les conditions bioclimatiques évoquées dans les études antérieures par Coluzzi (1979). Suivant cette distribution, la recherche du gène Kdr s'est révélée effective dans tous les sites. Des fréquences Kdr de 0,05 ; 0,06 ; 0,07 et 0,23 ont été respectivement trouvées à Boromo, Saaba, Nongremassom et Zampa. Elles sont supérieures à celle qu'ont trouvées Ilboudo-Sanogo *et al.*, (données non publiées) en 2005 où les fortes fréquences avaient été notées à Zampa (0,03) et Boromo (0,029).

Sur l'ensemble des sites étudiés la fréquence du gène Kdr chez *An. arabiensis* est seulement représenté à Nongremasson. Ce résultat est similaire à celui de Diabaté *et al* (2004) dans une étude sur la «Distribution de la mutation Kdr leucine-phenylalanine à travers le complexe *Anopheles gambiae* au Burkina Faso ». Dans la même étude, les fréquences du gène Kdr obtenues par Diabaté *et al* (2004) pour la forme moléculaire S d'*Anopheles gambiae* évoluaient de 0,17 à 0,6 alors que celle de

la forme moléculaire M était de 0,2. Parmi les échantillons qu'ils avaient traités, ils n'avaient trouvé la mutation Kdr que chez un seul spécimen d'*Anopheles arabiensis*. La tendance de la répartition du gène Kdr chez les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s* observée par Diabaté *et al* en 2002 est la même que celle observée par la présente étude chez les forme M (0,17) et S (0,8) d'*An. gambiae s.s* .

Cette inégale répartition du gène Kdr entre M et S avait fait pensé au départ à l'existence d'une forte barrière génétique entre les deux forme (Hougard *et al.*, 2002), mais ce fait n'excluait pas l'absence totale du flux de gène. Par ailleurs l'hypothèse de l'introgession possible d'une forme à l'autre (Weill *et al.*, 2000; Hougard *et al.*, 2002) expliquerait cette inégalité.

De manière générale la prise en compte de la période de la collecte des larves de juillet à août 2006 permettrait de penser que les insecticides utilisés pour l'épandage des champs de coton, des bassins de riziculture et la population rurale et urbaine, pourraient se retrouvés dans les gîtes larvaires et contribués à la sélection des vecteur dès la phase pré-imaginale.

## **VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



Les tests de sensibilité aux insecticides ont permis de noter une résistance à confirmée au DDT et une sensibilité à la perméthrine dans les quatre villages. La deltaméthrine est sensible dans les trois villages (Boromo, Nongremasson et Zampa) où elle a été testée.

A Zampa, toutes les conditions seraient réunies pour dire que la résistance au DDT est une réalité.

L'identification des espèces *An. arabiensis* et les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s* à montré que la forme moléculaire M était la plus dominante dans les quatre villages. Elle est suivie de la forme moléculaire S et d'*An. arabiensis*.

Le gène Kdr à été trouvé dans tous les villages chez *An. gambiae s.l.* la fréquence la plus forte de ce gène s'observe à Zampa (0,23). Sa distribution au sein du complexe dans les différents sites de l'étude est marquée par une fréquence élevée chez la forme moléculaire S avec une forte fréquence à Zampa (0,38). Chez *An. arabiensis*, la mutation Kdr n'a été trouvé uniquement qu'à Nongremasson.

Selon des données non publiées en 2005 (Ilboudo-Sanogo et al) on noterait une augmentation de la fréquence du gène Kdr dans les populations d'*An. gambiae s.l.* des 4 localités en 2006 ; même si la différence de fréquences entre les 2 années n'est pas toujours statistiquement significative, nous pouvons parler d'une progression de la résistance des vecteurs aux insecticides dans ces localités.

L'interprétation des données des enquêtes sociologiques sur les insecticides utilisés (données non traitées du CNRFP) et la recherche de leurs résidus d'insecticides dans les sols et les eaux des gîtes larvaires pourraient apporter des éléments élucidant l'origine de la résistance et son impacte sur la dynamique des populations vectorielles du paludisme.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Akoghéto M.C., Djouaka R.F. and Kindé-Gazard D.A., 2006.** Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malaria Journal*, **5**: 22.

**Badolo A., Ilboudo-Sanogo E., Ouédraogo A.P. and Costantini C., 2004.** Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complexes mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Tropical Medicine and International Health*, **9**: 330-334.

**Bregues J., et Coz J., 1973.** Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae* Giles (Sp.A) et *Anopheles funestus* Giles, en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest. *Cahier O.R.S.T.O.M., Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **11** : 107-126.

**Brodgon WG., Mcallister JC. and Vulule J., 1997.** Heme peroxydase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosq. Control Assoc*, **13**: 233-237.

**Brook BD., Hunt RH, Koekemoer LL, Dossou-Yovo J and Coetzee M., 1999.** Evaluation of polymerase chain reaction assay for detection of pyrethroid insecticide resistance in the malaria vector species of the *Anopheles gambiae* complexe. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **15**: 565-568.

**Bruce-Chwatt L.J, and De Zulueta J., 1985.** Essential Malariology. *W. Heinemann med. Books Ltd*, London, chap., **8**:166-209.

**Chandre F., Darriet F., Manga L., Akoghéto M., Faye O., Mouchet J., and Guillet P., 1999.** Situation de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization*, **77**(3): 230-234.

**Clark T.B., Kellen W., Fukuda T. and Lindegren J.E., 1968.** Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, **11**: 1-7.

**Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., and Di Deco M.A., 1979.** Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. And Hyg*, **73**: 483-497.

**Curtis C. F., Lines J. D., Ijumba J., Callaghan A., Hill N. and Karimzad M. A., 1987.** The relative efficacy of repellents against mosquito vectors of disease. *Medical and Veterinary Entomology*, **1**: 109-119.

**Darriet F., N'Guessan R., Hougard J.M., Traoré M., Lamizana L. and Carnevale P., 2002.** Un outil expérimental indispensable à l'évaluation des insecticides : les cases-pièges. *Bull Soc Pathol Exot*, **95**(4) : 299-303.

**Darriet F., Guillet P., N'Guessan R., Doannio J.M.C., Koffi A.A. et al.,** 1998. Impact de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.s. à la perméthrine et à la deltaméthrine sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées. *Méd Trop*, **58**, 349-354.

**Davidson G.,** 1953. Experiments on the effect of residual insecticides in houses against *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Bull. Entomol. Res*, **44**: 231-245.

**della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-yovo J., Favia G., Petrarca V., and Coluzzi M.,** 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology* **10** (1) : 9–18.

**Diabaté A.,** 1999. Evaluation de la résistance des vecteurs du paludisme vis à vis des pyréthrinoïdes au Burkina Faso. *Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle en sciences biologiques appliquées, option Biologie et Ecologie Animales. Université de Ouagadougou, Burkina Faso* 128p.

**Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Akogbeto M., Guigemdé T.R., Darriet F., Brengues C., Guillet P., Hemingway J., Small G.J., and Hougard J.M.,** 2002. The role of agricultural use of insecticides in résistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.s. in Burkina Faso. *American journal of tropical medicine and hygiene.*, **67**(6): 617-622.

**Diabaté A., Brengues C., Baldet T., Dabire K.R., Hougard J.M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J., and Chandre F.,** 2004. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Tropical Medicine and International Health.*, **12**(9): 1-7.

**Fanello C., Santolamazza F. and Della Torre A.,** 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complexe by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology* **16**: 461-464.

**Favia G., Della Torre A., Bagayaoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N. F., Touré Y. T. and Coluzzi M.,** 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Molecular Biology* **6**: 377-383.

**Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sidén-Kiamos and Louis C.,** 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.. *Insect Molecular Biology*, **10** (1):19-23.

**Finney D.J.,** 1971. Probit analysis. *Cambridge University Press*.

**Fournier D., Bride J.M., Poirie M., Bergé J.B., and Plapp F.W.,** 1992. Insect glutathione S-transferase : biochemical characterization of the major form houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem*, **267**: 1840-1845.

**Franciosa H. and Bergé JB.,**1985. Glutathion S-transferase in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and GST-2 families. *Insect Biochem. Mol. Biol*, **25**:311-317.

**Gwadz R. and Collins F.H.,** 1996. Culicine mosquitoes and the agents they transmit (73-84). In: *The biology of disease vectors. Beaty B. J. & Marquardt W. C. (edt). University Press of Colorado, 632p.*

**Govere J., Durrheim D.N., Baker L., Hunt R. and Coetzee M.,** 2000. Efficacy of tree insect repellents against the malaria vector *Anopheles arabiensis*. *Medical and Veterinary Entomology*,**14**: 441-444.

**Habluetzel A., Diallo D.A., Esposito F., Lamizana L., Pagnoni F., Lengeler C., Traore C. and Cousens S.N.,** 1997. Do insecticide-treated curtains reduce all-cause child mortality in Burkina Faso. *Tropical Medicine and International Health*, **2** (9): 855-862.

**Haubruege E. and Amicho 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.,** 1992. Genetic of insecticide resistance in mosquito vectors in disease. *Parasitology Today*, **8**(9): 296-298.

**Hemingway, J., Small, G.J., Lindsay, S. and Collins, F.H.,** 1995. Combined use of biochemical, immunological and molecular assays for infection, species identification and resistance detection in field populations of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). In: *Symondson, W.O.C., Lydell, E. (Eds.), The Ecology of Agricultural Pests: Biochemical Approaches. Chapman and Hall, London.*

**Hemingway J., Hawkes N. J., McCarroll L. and Ranson H.,** 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34** : 653–665.

**Hougard JM., Fontenille D., Chandre F., Darriet F., Carnevale P. and Guillet P.,** 2002. Combating malaria vectors in Africa : current directions of research. *Trends in Parasitology*, **18** (7): 283-286.

**Hougard JM., Duchon S., Darriet F., Zaim M., Rogier C. and Guillet P.,** 2003. Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. *Bulletin of the World Health Organization*, **81**:324-333.

**Hunt R. H., Coetzee M. and Fettene M.,** 1998. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Tran. R Soc. Trop. Me. Hyg.* **92**, 231-235.

**Iboudo-Sanogo, E.** 2001. Influence des rideaux imprégnés d'insecticide sur les paramètres entomologiques de la transmission du paludisme en zone rurale au

Burkina Faso. *Thèse unique de doctorat en sciences biologiques appliquées, option entomologie médicale. Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 135pp.*

**Kolaczinski J.H., Fanello C., Hervé J-P., Conway D.J., Carnevale P. and Curtis C.F., 2000.** Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bulletin of Entomological Research*, **90** :125–132.

**Lengeler C., Cattani J. and De Savigny D., 1996.** Net gain. A new method for preventing malaria deaths. *IDRC Ottawa/ OMS Genève*, 189 p.

**Lombet A., Mourre C. and Ladzunski M., 1988.** Interactions of insecticides of pyrethroid family with specific binding sites on the voltage-dependent sodium channel from mammalian brain. *Brain Res.*,**459**: 44-48.

**Lynd A., Ranson H., McCall P.J., Randle N. P., Black IV W.C., Walker E.D., and Donnelly M.J., 2005.** A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 4: 16.

**Majori G., Sabatinelli G. and Coluzzi M.,1987.** Efficacy of permethrin impregnated curtains for malaria vector control. *Medical and Veterinary Entomology*, 1: 185-192.

**Marchio , F., 1996.** Insect repellent 3535 a new alternative to DEET. *SÖFW-Journal* , **122** : 478 – 485 .

**Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M. S., Darriet F., Berge J. B., Devonshire A. L., Guillet P., Pasteur N. and Pauron D., 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*.s.s. *Insect Molecular Biology*, 7: 179-184.

**Matola Y. G. et al., 1990.** Epidemiologic assessment of the impact of a rural area in Tanzania. *Bull Soc Fr Pathol*, **8** (suppl. 2), 1202.

**Ministère Thaïlandais de la santé (MTS), 2001.** Laboratory and Field Evaluations of IR3535 and DEET against Mosquito Vectors, in *Journal of American Mosquito Control Association*.

**Mouchès C., Paulin Y., Agarwal M., Lemieux L., Herzog M., Abadon M., Beyssat-Arwonty V., Hyrien O., de Saint-Vincent BR., Georghiou GP. and Pasteur N.,1990.** Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2574-2578.

**Mouchet J. et Carnevale P., 1991.** Les vecteurs de la transmission, in *Paludisme M Danis et J.Mouchet coord. ELLIPSES Ed.* 35-59.

- Najera J.A.**, 1989. Malaria and the work of WHO. *Bull WHO*, **67**: 229-243.
- Nentwig G., Boeckh J., Hoever F.P., Krüger B.W. and Röder K.**, 2002. Bayrepel® (KBR 3023), a new mosquito repellent: from laboratory synthesis to a worldwide commercial product. *Proceedings II European Conference on Travel Medicine*.p.85
- Nevill C.G., Some E.S., Mung'ala V.O., Muteni W., New L., Marsh K., Lengeler C. and Snow R.W.**, 1996. Insecticide treated bednets reduce mortality and severe morbidity of malaria among children on the Kenyan Coast. *Trop. Med. Int. HLTH*, **1**(2):139-146.
- OMS**, 2000. Cadre pour la surveillance des progrès et l'évaluation des résultats et de l'impact. *WHO/CDS/RBM/2000.25*
- OMS**, 2004a. Lutte contre les vecteurs du paludisme. *WHO/CDS/WHOPES/2002.5 Rev.1*
- OMS**, 2004b. Questions fréquemment posées à propos de l'utilisation du DDT pour la lutte antivectorielle. *WHO/HTM/RBM/2004.54*
- Palsson K. and Jaenson T. G.**, 1999. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa. *Acta tropica*,**72**:39-52.
- Paskewitz S. M. and Collins F. H.**, 1990. Use polymerase chain reaction to identify mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**: 367-373
- Petrarca V., Petrangeli G., Rossi P., and Sabatinelli G.**,1986. Etude chromosomique d'*Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* à Ouagadougou (Burkina Faso) et dans quelques villages voisins. *Parassitologia*, **28** : 41-61.
- Philogene B.J.R.**, 1991. L'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes : problèmes et perspectives. *La lutte anti-acridienne*. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris © 1991, pp. 269-278.
- Ranson H., Jensen B., Wang X., Hemingway J., and Collins F. H.**, 2000. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* **9**, 499–507.
- Robert V.**, 1989. La transmission du paludisme humain : la zone des savanes d'Afrique de l'Ouest. Thèse, Université de Paris 6 325p
- Rodhain F. and Perez C.**, 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, éditeur Maloine s.a. Paris, France 458pp.
- Rozendaal J.A.**, 1999. La lutte antivectorielle – Méthodes à usage individuel et communautaire. (ISBN 92 4 254494 9)

- Rutledge L. C., Moussa M.A., Lowe C.A. and Sofield R. K., 1978.** Comparative sensitivity of mosquito species and strains to the repellent diethyl toluamide. *Journal of Medical Entomology*, **14**: 536-541.
- Scholte E.-J., Knols B.G.J., Samson R.A. and Takken W., 2004.** Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, **4**: 19.
- Scholte E.-J., Takken W. and Knols B.G.J., 2003.** Pathogenicity of five East African entomopathogenic fungi to adult *Anopheles gambiae s.s.* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Proceedings of the Section Experimental Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society*, **14**: 25-29.
- Schreck C.E. and Self L.S., 1985.** Traitement des moustiquaires pour une meilleure protection contre les piqûres et les maladies transmises par les moustiques. *WHO/VBC*, **914** :5p
- Scott S.A., Brogdon W.G. and Collins F.H., 1993.** Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **49**: 520-529.
- Seyoum A., Palsson K., Kung'a S., Kabiru E. W., Killeen G. F., Hassanali A. and Knols B. G., 2002.** Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. *Transactions of the royal society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**: 225-231.
- Shrivastata SP., Georghiou GP., Metcalf RL. and Fukuto TR., 1970.** Carbamate resistance in mosquitoes: the metabolism of propoxur by susceptible and resistant larvae of *Culex pipiens fatigans*. *Bull. World Health Organ*, **42**: 931-942.
- Touré, Y.T., Petrarca, V., Traoré S.F., Coulibaly, A., Maiga, H.M., Sankaré, O., Sow M., Di Deco, M.A. and Coluzzi M., 1998.** Distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of *Anopheles gambiae* complexe in Mali. West Africa. *Parasitologia* **40**:477-511.
- Verhaeghen K., Bortel W.V., Roelants P., Backeljau T. and 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. *Malaria Journal*, **5**:16.
- Vulule J.M., Beach R.F., Atieli F.K., Roberts J.M., Mount D.L. and Mwangi R.W., 1994.** Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. *Med Vet Entomol*, **8**:71-75.
- Wang J., 1999.** Resistance to two pyrethroids in *Anopheles sinensis* from Zhejiang, China. *J Am Mosq Control Assoc*, **15**(3):308-11.



**Weill M., Chandre F., Brengues C. et al., 2000.** The Kdr mutation occurs in the mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology*, **9**: 451-455.

**WHO, 1998.** Test procedures of insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. *Report of the WHO informal consultation*. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12:12-17.

**WHO, 2001.** IR3535 technical material. Interim specification. WHO/IS/TC/667/2001.

**WHO, 2003.** Africa malaria report. <http://www.who.int/amd2003/amr2003.htm>.

**WHO, 2004.** Icaridin technical material. specification. WHO/ TC/740/2004.

**WHO, 2006.** Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3: 45.

**Yap H.H., Jahangir K., Chong A.S., Adanan C.R., Chong N.L., Malik Y.A. and Rohaizat B., 1998.** field efficacy of a new repellent, KBR 3023, against *Aedes albopictus* (SKUSE) and *Culex quinquefasciatus* (SAY) in tropical environment. *Journal of Vector Ecology*, **23**: 62-68.

# **ANNEXES**

## 1 : Préparation des mix pour l'amplification et la restriction

- ✓ Composition volumétrique du mix pour l'identification d'*An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*

Réactifs	Volume
H <sub>2</sub> O	6,33
Buffer (10X)	1
Mg Cl <sub>2</sub> (25mM)	1
DNTP (10mM)	0,2
UN (4pM)	0,2
GA (2pM)	0,2
AR (6,2pM)	0,2
Taq polymérase (0,35 UI)	0,07
<b>Volume total du mix</b>	<b>9,2</b>
ADN à ajouter au mix	0,8
<b>Volume total</b>	<b>10</b>

- ✓ Séquences et température d'hybridation (T<sub>h</sub>) des amorces utilisées dans l'identification des espèces d'*An. gambiae s.l.*

Amorces	Séquences	T <sub>h</sub> =2(A+T)+4(G+C) °C
UN	5'-GTG-TGC-CCC-TTC-CTC-GAT-GT-3'	64
GA	5'-CTG-GTT-TGG-TCG-GCA-CGT-TT-3'	62
AR	5'-AAG-TGT-CCT-TCT-CCA-TCC-TA-3'	58

**NB** : les volumes sont exprimés en µl et correspondent aux volumes nécessaires à l'amplification d'un extrait d'ADN.

✓ **Composition volumétrique du mix pour la restriction.**

Réactifs	Volume
H <sub>2</sub> O	0,6
Buffer (10X)	0,38
Enzyme <i>CfoI</i> (0,05 UI)	0,02
<b>Volume total</b>	<b>1</b>

*NB : les volumes sont exprimés en µl et correspondent aux volumes nécessaires à la digestion ou restriction.*

✓ **Composition volumétrique du mix pour l'identification du gène Kdr.**

Réactifs	Volume
H <sub>2</sub> O	4,92
Buffer (10X)	1
Mg Cl <sub>2</sub> (25mM)	0,6
DNTP (10mM)	0,5
Agd <sub>1</sub> /Agd <sub>2</sub> (20µM)	0,32
Agd <sub>3</sub> /Agd <sub>4</sub> (20µM)	0,32
Taq polymérase (0,35 UI)	0,1
<b>Volume total du mix</b>	<b>8,4</b>
ADN à ajouter au mix	1,6
<b>Volume total</b>	<b>10</b>

Agd<sub>1</sub> : 5'-ATA-GAT-TCC-CCG-ACC-ATG-3' (Matinez-Torres *et al.*, 1998)

Agd<sub>2</sub> : 5'-AGA-CAA-GGA-TGA-TGA-ACC-3'

Agd<sub>3</sub> : 5'-AAT-TTG-CAT-TAC-TTA-CGA-CA-3'

Agd<sub>4</sub> : 5'-CTG-TAG-TGA-TAG-GAA-ATT-TA-3'

*NB : les volumes sont exprimés en µl et correspondent aux volumes nécessaires à l'amplification d'un extrait d'ADN.*

## SUMMARY

Malaria vectors resistance to insecticides is an obstacle to vectors control. Such a resistance may be due to agricultural use of pesticides but this relationship is not clearly established. In order to test this assumption, the sensitivity of *Anopheles gambiae s.l.* to DDT, permethrin and deltamethrin was evaluated from July to August 2006 in 4 rural villages, where insecticides are used in rice and cotton cultivation (Boromo, Zampa) and in vegetable gardens (Saaba, Nongremasson).

To assess susceptibility to insecticide using the standard WHO (1998) procedures, two to five days old female mosquitoes were used. The 50% and 95% knock down time (KDT<sub>50</sub> and KDT<sub>95</sub>) and the 24 hours mortality rate were determined. All specimens identified as *An. gambiae s.l.* were PCR tested for species and the molecular forms identification (Fanello *et al.*, 2002) and detection of the Leu-Phe kdr mutation (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Data were analyzed using XLSTAT software. 1132 *An. gambiae s.l.* were tested for susceptibility to DDT and pyrethroids. The mortality rate for permethrin varied between 98% and 100%. Mosquitoes sensitivity increased as confirmed by KDT<sub>50</sub> values between 5.16 and 12.07 min. Mortality rate varied between 56 and 96%, which confirmed vectors resistance to DDT. Vectors population remained deltamethrin-sensitive during this period with a mortality rate 100%). Kdr gene was found in all *An. gambiae s.l.* members including *An. arabiensis* and the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* Moreover, we showed that the frequency of the Kdr gene was higher in Zampa (0.23) and low in Boromo(0.05). In the *An. gambiae* complex, the Kdr gene is more frequent in *An. gambiae s.s.* (0.72) and less frequent in *An. arabiensis* (0.04). Vectors resistance to DDT is actual but they seemed sensitive to pyrethroids. However the presence of Kdr gene in the study area showed that resistance to pyrethroids is under installation, so it should be taken into account for decision-making.

Key words: *An. gambiae s.l.*, resistance, pyrethroids, organochlorin, Knock down resistance.