



**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO
(UPB)
INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL
(IDR)**



N° d'ordre :



MEMOIRE

Présenté par:

Moussa NAMOUNTOUGOU
Maître es Sciences

Pour l'obtention du :

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

Sur le Thème :

**Distribution de la fréquence des mutations *kdr* et *ace-1* principaux
gènes de résistance aux insecticides dans le complexe d'*Anopheles
gambiae* dans l'Ouest du Burkina Faso**

Soutenu publiquement le 28 Mars 2007

Directeur de mémoire: Pr. OUEDRAOGO Jean-Bosco, IRSS/DRO, Bobo-Dioulasso

Encadreur: Dr DABIRE K. Roch, IRSS/Centre Muraz

Jury :

Dr ZEKIBA Tarnagda
Dr COSTANTINI Carlo
Pr VIGUIER Martinez

IRSS/DRO, Bobo-Dioulasso
IRD/IRSS, Bobo-Dioulasso
IDR, Université Polytechnique de Bobo

DEDICACE

- A la mémoire de mon très cher regretté père
NAMOUNTOUGOU D. Boubacar

- A ma très chère mère DIANOU T. Assétou

DEA-A

1115

- A toute ma famille

NAM

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le cadre des activités de recherche de notre DEA, menées à l'IRSS/Centre Muraz (Burkina Faso). Ce travail a été l'œuvre de plusieurs personnes dont les contributions ont été inestimables et nous voudrions remercier :

Le **Pr. Jean-Bosco OUEDRAOGO**, Directeur régional de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé/Bobo-Dioulasso pour nous avoir accueilli au sein de votre institution et d'avoir accepté de diriger ce travail.

Le **Dr. Roch K DABIRE**, notre encadreur pour avoir accepté de guider ce travail avec rigueur et disponibilité malgré vos multiples occupations. Vos grandes connaissances scientifiques et vos qualités de chercheur nous ont permis de bénéficier largement de votre expérience dans le domaine de la recherche. Vous avez été plus qu'un encadrant, un frère. Votre soutien a été inestimable dans la réalisation de ce travail. Permettez nous de vous traduire toute notre gratitude et notre profond respect.

Le **Pr. Robert T GUIGUEMDE**, Chef du Département Parasitologie pour les différentes formations dont nous avons bénéficié. Veuillez accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Le **Dr. Serge P DIAGBOUGA** Directeur Général du centre MURAZ pour nous avoir accueilli dans votre laboratoire. Trouvez ici, l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.

Le **Pr. Jean KOULIDIATI** de l'Université de Ouagadougou pour ses conseils et encouragements. Recevez ici mes sincères remerciements.

Le **Dr. Jean-Marc COSTA**, de l'Université de Paris pour nous avoir initié aux techniques de Biologie Moléculaire.

Le **Dr Pierre KENGUE**, de l'Université de Montpellier pour nous avoir initié aux techniques de PCR.

Le **Dr. Hermann SORGHO**, pour avoir participé à la réalisation de ce travail. Merci car vos conseils nous ont permis de finaliser ces travaux.

A **Mr Vincent DABILGOU** pour vos, soutien et motivation apportés dans mon cursus universitaire et dans la réalisation de ces travaux. Nous vous en sommes infiniment reconnaissant. Trouvez dans ce document ma parfaite reconnaissance.

A **Mr Samuel DIOMA**, pour son soutien et ses conseils à mon égard. Trouvez dans ce document ma parfaite reconnaissance.

A **Mr Ali OUARI**, pour nous avoir assisté dans nos travaux de laboratoire.

A tous mes amis (es), collègues, camarades en particulier, TRAORE Fatoumata, TOE Hyacinthe, KABORE Jacques pour ces instants de dure labeur et de bonne collaboration.

A tout le personnel du Centre Muraz pour tout le soutien apporté.

A tout le personnel du l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)/Bobo, pour l'accueil et l'appui apporté.

Nous ne saurons terminer sans adresser nos remerciements aux populations qui sont sur notre site d'étude pour avoir faciliter la réalisation de cette étude.

RESUME

De Août 2006 à Janvier 2007, une étude a été menée, dans treize sites du bassin cotonnier de l'Ouest du Burkina Faso avec pour objectif de réactualiser la fréquence du gène *kdr*, et d'investiguer la présence et la dispersion du gène *ace.1* chez *An. gambiae* sl. Les résultats montrent une augmentation importante de la fréquence du gène *kdr* chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae*. Chez cette forme M nous assistons à une progression géographique de ce gène, comparativement aux travaux réalisés par d'autres auteurs en 2000 et le niveau de la fréquence du gène a augmenté de dix fois. Mais si on considère l'ensemble des treize sites il n'y avait pas d'augmentation significative de la fréquence du gène chez la forme S depuis 2000.

Le gène *ace.1* a été observé avec des fréquences relativement élevées chez la forme S dans tout l'Ouest du pays, et seulement dans cinq localités chez la forme M. Quant à la fréquence de ce gène chez *An. arabiensis*, elle a été observée avec une valeur assez élevée dans la seule localité de Diébougou.

Toutefois la fréquence du gène *ace.1* pourrait progresser rapidement au sein des populations d'*An. gambiae* sl à cause de la pression de sélection exercée par l'utilisation des organophosphorés et des carbamates dans agriculture dans ces régions. Mais pourrait 'être éclairci par des bioessais.

Mots clés : insecticides, gènes de résistance *ace.1* et *kdr*, *Anopheles gambiae*, bassin cotonnier, Burkina Faso.

SOMMAIRE

DEDICACE -----	i
REMERCIEMENTS -----	ii
SOMMAIRE -----	iv
SIGLES ET ABREVIATIONS -----	vi
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX -----	vii
LISTE DES ANNEXES -----	vii
INTRODUCTION -----	1
A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE -----	4
1. Les vecteurs du paludisme -----	4
2. Cycle de reproduction des anophèles -----	5
3. Taxonomie des anophèles -----	7
4. La lutte antivectorielle -----	7
4.1. L'aménagement de l'environnement -----	7
4.2. La lutte biologique contre les vecteurs -----	8
4.3. La lutte chimique -----	8
4.4. La lutte génétique -----	9
5. Les insecticides -----	10
5.1. Les Pyréthriinoïdes -----	10
5.2. Les organochlorés -----	10
5.3. Les carbamates -----	11
5.4. Les organophosphorés -----	11
6. La notion de résistance aux insecticides -----	11
6.1. La résistance métabolique -----	11
6.2. Les modifications de la cible -----	11
6.3. Les mécanismes secondaires de la résistance -----	12
6.4. La mutation <i>kdr</i> -----	12
6.5. La mutation <i>ace.1</i> -----	12
7. Problématique -----	13

B. METHODOLOGIE	15
1. Site de l'étude	15
2. Echantillonnage	15
3. Analyses au laboratoire	18
3.1. PCR diagnostique <i>An. gambiae</i> sl	18
3.2. Formes moléculaires M et S d' <i>An. gambiae</i>	18
3.3. Mutation <i>kdr</i> chez <i>An. gambiae</i> sl	18
3.4. Mutation <i>ace.1</i> chez <i>An. gambiae</i> sl	19
4. Gestion et analyse des données	19
C. RESULTATS	20
1. Répartition du complexe <i>An. gambiae</i> dans la zone de l'Ouest	20
2. Distribution de la fréquence du gène <i>kdr</i>	20
3. Distribution de la fréquence du gène <i>ace.1</i>	24
D. DISCUSSION	27
1. Répartition des espèces et formes moléculaires d' <i>An. gambiae</i> sl	27
2. Distribution de la fréquence du gène <i>kdr</i>	27
3. Distribution de la fréquence du gène <i>ace.1</i>	28
CONCLUSION / PERSPECTIVES	31
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	32
ANNEXES	I

SIGLES ET ABREVIATIONS

<i>ace.1</i>	:	Gène de résistance de l'acétylcholinestérase
AChE	:	Acétylcholinestérase
<i>ace1R</i>	:	Allèle codant pour un gène de résistance (AChE1) aux insecticides
<i>An.</i>	:	<i>Anopheles</i>
CNaVdp	:	Canal Sodium Voltage dépendant
DDT	:	Dichloro diphenyl trichloroéthane
IRSS	:	Institut de Recherche en Science de la Santé
<i>Kdr</i>	:	Knockdown resistance
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RR	:	Homozygote résistant
RS	:	Hétérozygote
SS	:	Homozygote sensible
VK	:	Vallée du Kou

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Cycle de reproduction des anophèles (Mouchet et Carnevale, 1991) -----	6
Figure 2: Sites d'échantillonnage-----	15
Figure 3 : Fréquence du gène <i>kdr</i> chez <i>An. gambiae</i> ss-----	23
Figure 4 : Distribution de la fréquence de <i>ace.1</i> chez <i>An. gambiae</i> ss -----	26
Tableau 1 : Distribution de la fréquence du gène <i>kdr</i> dans le bassin cotonnier-----	22
Tableau 2: Distribution de la fréquence du gène <i>ace1</i> dans le bassin cotonnier -----	25

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : PCR diagnostique des espèces d' <i>An. gambiae</i> sl -----	I
Annexe 2 : Diagnostique des formes moléculaires M et S -----	I
Annexe 2 : Diagnostique des formes moléculaires M et S -----	II
Annexe 3 : Diagnostique de la mutation <i>kdr</i> -----	III
Annexe 4 : Diagnostique de la mutation <i>ace.1</i> chez <i>Anopheles</i> -----	IV

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire dont *Plasmodium falciparum* est l'agent causal le plus fréquent et le plus virulent, transmis par la piqûre de femelle d'anophèles. Il est responsable de 30-50 % des admissions dans les hôpitaux et d'au moins 50 % des consultations externes dans les zones de forte transmission (OMS, 1998). Entre 1,1 et 2,7 millions d'individus en meurent chaque année dont 90 % provient de l'Afrique au Sud du Sahara (WHO, 1998; Trigg et Kondrachine, 1998). Dans les années 1950, un programme ambitieux d'éradication du paludisme en Europe du Sud a conduit à des résultats spectaculaires (Coluzzi, 1992). Ce programme était basé sur une stratégie de lutte intégrée prenant en compte:

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

Dans la lutte antivectorielle, les premières expériences pratiques de l'utilisation du DDT ont donné l'impression qu'une couverture complète des habitations par des pulvérisations à effet rémanent, pendant une période suffisamment longue, permettrait d'aboutir à l'éradication du paludisme. Ainsi les premières expériences menées dans le sud de l'Europe, en Amérique du Nord et à Taiwan ont semblé confirmer cet espoir.

Cependant, en Afrique le paludisme reste l'une des causes de retard de développement qui en ajoute aux multiples causes de pauvreté et où il sévit de façon endémique dans bon nombre de pays (Lemardeley *et al.*, 1996). Dans l'attente d'un vaccin efficace, plusieurs initiatives ont été développées pour lutter contre cette maladie allant du traitement direct des patients par des antipaludiques à la prévention par l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (WHO, 2000). L'utilisation des matériaux imprégnés d'insecticides a montré qu'on pouvait réduire la morbidité palustre de 50 à 60 % et la mortalité générale de 20 % (Alonzo *et al.*, 1991, 1993; D'Alessandro *et al.*, 1995, Binka *et al.*, 1996). L'OMS recommande d'ailleurs aux états d'intégrer leur utilisation dans les plans nationaux de lutte contre le paludisme. En effet, les moustiquaires imprégnées à base de pyréthrianoïdes sont

considérées comme un puissant outil de prévention dont le mode d'intervention vise à briser le contact homme vecteur (Zaim *et al.*, 2000). Ces moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes ont montré leur efficacité en réduisant le taux de transmission du parasite dans des zones où elles ont été utilisées à large échelle (Binka *et al.*, 1996).

Malgré l'efficacité de cet outil, un problème majeur pouvant être un facteur limitant à leur utilisation se pose : l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes, principaux insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires (Martinez-Torrez *et al.*, 1998).

En Afrique de l'Ouest, la résistance d'*An. gambiae* est apparue dès les premiers traitements à la dieldrine, (Mouchet, 1963). En Côte-d'Ivoire, la mutation *kdr* (Leu-Phe) mise en évidence chez *An. gambiae* aurait probablement été sélectionnée par l'emploi massif du DDT et des pyréthrinoïdes contre les ravageurs du coton (Chandre *et al.*, 1999). Ainsi, des souches résistantes aux différentes classes d'insecticides ne cessent de se répandre dans plusieurs localités du pays.

En 1967, au Burkina Faso, la résistance au DDT est apparue suite à son introduction pour traiter les plants de cotonnier (Hamon *et al.*, 1968). Brun et Sales (1975) attribuent la résistance à la dieldrine d'*An. funestus* à la pression de sélection exercée par la culture du coton à Soumousso. Les travaux de l'équipe de l'IRSS/Centre Muraz ont montré que chez *An. gambiae*, la fréquence du gène de résistance (*kdr*) est plus élevée dans les zones cotonnières habituellement soumises à des traitements insecticides que dans les zones rurales, où les paysans ne pratiquent que les produits vivrières de consommation locale (Diabaté *et al.*, 2002).

En effet, il avait été montré que le gène *kdr* est exclusivement distribué chez la forme S (95%) d'*An. gambiae* dont la typologie des gîtes est liée aux eaux de pluies (Touré *et al.*, 1998). Cependant, l'émergence du gène d'abord chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae* *ss* (Fanello *et al.*, 2000 ; Diabaté *et al.*, 2003), et par la suite chez quelques individus d'*An. arabiensis* en zone cotonnière à l'Ouest du Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2004), confirme la forte pression de sélection exercée par l'utilisation à usage agricole des pyréthrinoïdes.

La résistance aux pyréthrinoïdes du principal vecteur du paludisme *An. gambiae*, représente une menace pour l'efficacité des programmes de lutte antivectorielle basée sur cet outil. La recherche d'insecticides de remplacement est devenue une priorité, ainsi des études ont montré l'efficacité des moustiquaires imprégnées de nouvelles molécules

(organophosphorés et carbamates), à réduire la densité des moustiques à l'intérieur des habitations (Asidi *et al.*, 2004).

Des moustiquaires imprégnées par un mélange de bifenthrine (pyréthrianoïde) et de chlorpyrifos-méthyl (organophosphoré) ont montré l'effet de synergie intéressant sur *An. gambiae* (Bonnet *et al.*, 2004). Il a été également montré que des moustiquaires imprégnées par un mélange de bifenthrine (pyréthrianoïde) et de carbosulfan (carbamate) présentaient un effet de synergie sur *An. gambiae* (Corbel *et al.*, 2002). Cependant une résistance du vecteur principal du paludisme *An. gambiae* vis-à-vis de ces molécules pourrait donc constituer un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés. En effet le premier cas de résistance de *Culex pipiens fatigans* aux organophosphorés, a été observé à Douala (Cameroun) en 1958, à la suite de traitement au malathion, (Mouchet *et al.*, 1960). Des travaux menés en Côte-d'Ivoire ont montré par des tests insecticides une insensibilité aux organophosphorés et carbamates d'*An. gambiae*, (N'Guessan *et al.*, 2003). Très récemment, il a été mis au point une technique PCR permettant d'isoler le gène *ace.1*, qui pourrait être impliqué dans la résistance d'*An. gambiae* si aux organophosphorés et aux carbamates (Weill *et al.*, 2004).

Récemment au Burkina Faso, lors d'une étude d'évaluation de bâches imprégnées d'insecticides en cases expérimentales dans la zone rizicole de la Vallée du Kou, il a été observé, en plus du gène *kdr*, la présence du gène *ace.1* au sein des populations d'*An. gambiae* ss (Dabiré com. pers.).

Notre étude a pour but de réactualiser la fréquence du gène *kdr* et d'investiguer la présence et la dispersion du gène *ace.1*, qui pourrait être à l'origine de la résistance aux organophosphorés et aux carbamates dans le bassin cotonnier.

A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les vecteurs du paludisme

Les moustiques constituent le groupe de vecteurs le plus important en médecine humaine. Ils assurent la transmission du paludisme, des filarioses lymphatiques, des arboviroses telles que la fièvre jaune, la dengue, et les encéphalites arbovirales (Rodhain et Perez., 1985). Il existe 3200 espèces de moustiques appartenant à 37 genres différents. Seul le genre *Anopheles* assure la transmission du paludisme. On compte environ 400 espèces mais seulement une soixantaine d'entre elles peuvent être considérées comme vecteurs et une trentaine comme de bons vecteurs (Rodhain et Perez, 1985). Des études en Afrique ont mis en évidence la complexité du système vectoriel, et ont montré que le paludisme était transmis par cinq vecteurs majeurs : *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili*, *An. moucheti* (Hamon *et al.*, 1956 ; Coluzzi, 1984 ; Mouchet *et al.*, 1993 ; Fontenille et Lochouarn, 1999).

En Afrique subsaharienne, le complexe *An. gambiae* compte de nos jours sept espèces. Il s'agit de :

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

La répartition géographique de ces espèces est liée à des contraintes climato-écologiques. Globalement, *An. gambiae* occupe majoritairement la zone de forêt et de savanes humide et sèche. Cette espèce vit en sympatrie avec *An. arabiensis* dans la quasi totalité de la savane afro-tropicale non méridionale. Les deux espèces d'*An. quadriannulatus* sont rencontrées en Ethiopie et dans l'Est de l'Afrique méridionale. Quant aux trois autres espèces, *An. melas* et *An. merus* vivent respectivement sur le littoral Ouest et Est de l'Afrique, enfin *An. bwanae* est rencontré dans la forêt de Semliki en Ouganda (White, 1985). Ces trois dernières espèces sont allopatriques, mais vivent en sympatrie à la fois avec *An. gambiae*

et/ou *An. arabiensis* (Bryan *et al.*, 1987). De ces sept espèces, *An. gambiae* ss et *An. arabiensis* sont les vecteurs les plus importants et les plus répandus en Afrique tropicale.

Les analyses cytogénétiques portant sur le caryotype d'inversion chromosomique, en particulier les inversions sur le bras droit du chromosome 2 (2R), ont montré que *An. gambiae* ss est constituée de plusieurs sous populations non panmictiques (Coluzzi *et al.*, 1985 ; Petrarca *et al.*, 1987 ; Touré *et al.*, 1994). En effet, en Afrique de l'Ouest *An. gambiae* a été démantelée en cinq unités appelées formes chromosomiques (Bamako, Bissau, Forêt, Mopti et Savane), réparties suivant des paramètres éco-éthologiques (Coluzzi *et al.*, 1985). Le marqueur moléculaire (PCR-RFLP) développé pour cette espèce par Favia *et al.* (1997 ; 2001) a démembré ces cinq unités taxonomiques en deux groupes distincts appelés formes moléculaires M et S.

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

Les *Anopheles* sont des insectes holométaboles dont le cycle de développement est marqué par une phase préimaginale aquatique (œuf, larve, nymphe) et une phase adulte aérienne (imago). La durée du développement larvaire est très variable, *An. gambiae* si accomplit son développement larvaire en moins de 10 jours dans les collections d'eaux stagnantes, temporaires, peu profondes, ensoleillées, faiblement chargées en matières organiques et où la température de l'eau dépasse 30°C (Christie, 1959). La biologie de l'adulte est orientée avant tout vers la fonction de reproduction. La femelle n'est fécondée qu'une fois dans la vie, mais les mâles peuvent féconder plusieurs femelles (Craig, 1963). Le cycle de maturation des ovocytes qui débute avec le repas de sang et se termine avec la ponte est dénommé : cycle gonotrophique.

2. Cycle de reproduction des anophèles

Les adultes nouvellement éclos, s'accouplent et les femelles fécondées prennent un ou plusieurs repas de sang, suivant les espèces, et pondent. Les œufs déposés à la surface de l'eau, de forme plus ou moins ovoïde, sont pourvus latéralement de flotteurs, leur permettant de conserver une position horizontale.

A la sortie de l'œuf, la larve mesure à peine un millimètre, mais elle subit trois mues consécutives qui, par les modifications morphologiques qu'elles entraînent, la conduisent au quatrième stade ou larve adulte. La durée du stade larvaire, très variable peut aller de six à vingt-quatre jours. A la fin du stade larvaire, la larve, parvenue à son complet développement, cesse de se nourrir. Elle subit alors sa quatrième mue en donnant une nymphe. La durée de la vie nymphale, également variable, oscille, suivant les espèces entre un et six jours.

A l'éclosion, la nymphe s'immobilise à la surface de l'eau, allonge son abdomen puis le moustique adulte (imago), par une fente dorsale le long du thorax, dégage sa tête, ses ailles puis ses pattes, enfin son abdomen. Quelques minutes après, ayant déplié et étalé ses ailles, il peut prendre son vol. La durée totale du cycle, de l'œuf à imago, est de douze à vingt jours en moyenne. Elle peut être réduite ou allongée par des conditions défavorables. (Holstein, 1949).

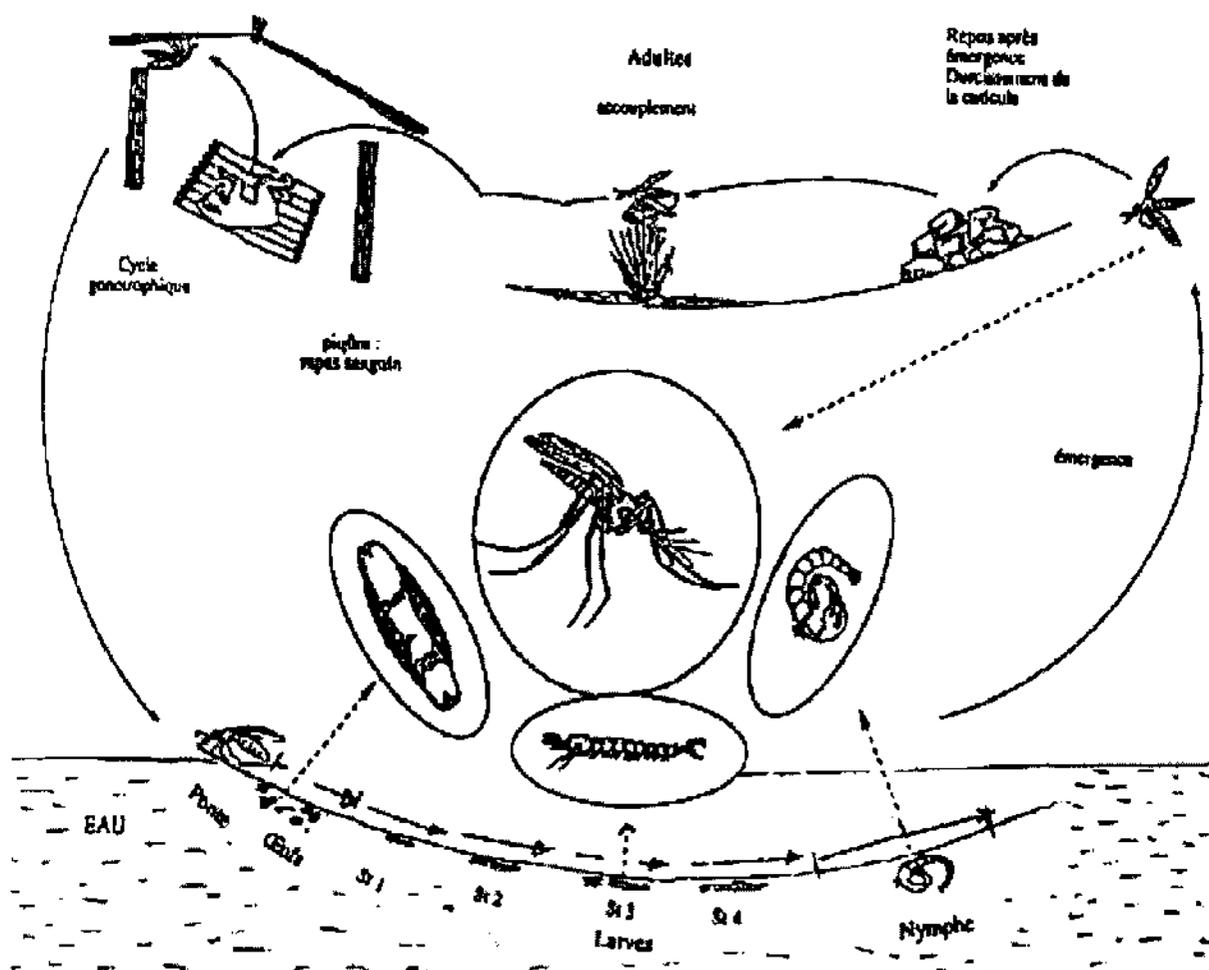


Figure 1 : Cycle de reproduction des anophèles (Mouchet et Carnevale, 1991)

3. Taxonomie des anophèles

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*
- 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). Plusieurs espèces d'anophèles vecteurs du paludisme chez l'homme ont été identifiées dont les principales sont : *An. gambiae* ss, *An. arabiensis*, *An. funestus* sl, *An. moucheti*, *An. sinensis* (Gentilini, 1993 ; Costantini *et al.*, 1999). Au Burkina Faso, les trois premiers sus-cités sont considérés comme les principaux vecteurs du paludisme (Majori *et al.*, 1987 ; Petrarca *et al.*, 1996).

4. La lutte antivectorielle

De nombreuses méthodes sont utilisables pour lutter contre les moustiques, mais pour répondre à des critères d'efficacité et de sélectivité, la lutte doit tenir compte avant tout de la bio-écologie et du comportement des espèces cibles ainsi que du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission (WHO, 1995). En fonction de ces éléments elle peut se pratiquer à différent niveau.

4.1. L'aménagement de l'environnement

Le problème des vecteurs et des nuisances dans les grands centres résulte de l'urbanisation anarchique et extensive, de la dégradation de l'environnement et de sa mauvaise gestion. Les méthodes d'aménagement de l'environnement sont les mieux à même d'apporter une solution pérenne ; Cela recouvre toute une gamme de tâche et d'activités qui ont été valablement définies et classées par un comité d'experts de l'OMS. Ces mesures exigent parfois des investissements importants alors que les résultats sont souvent longs à

apparaître au point que les municipalités manquent assez souvent de volonté mais aussi de moyen pour s'y investir. Toute lutte antivectorielle par le biais de l'aménagement de l'environnement nécessiterait une participation active de la communauté. Elle pourrait s'adjoindre à l'action des municipalités en nettoyant assez régulièrement les alentours des concessions afin d'éliminer les gîtes de reproduction des vecteurs.

4.2. La lutte biologique contre les vecteurs

La lutte biologique contre les vecteurs peut faire appel à différents agents (poissons larvivores, virus, champignons, bactéries). Les plus promoteurs sur le terrain sont deux bactéries sporulantes appartenant au genre *Bacillus* (WHO, 1984) : *Bacillus thuringiensis var. israelensis* ou (B.t.i.) et *Bacillus sphaericus*. Ces bactéries forment des spores et des toxines entomopathogènes puissantes et stables. Elles n'ont aucune toxicité pour l'homme et peuvent donc être appliquées dans les réservoirs domestiques d'eau potable et en présence de cultures vivrières ; même jusqu'au moment de la récolte. Cependant l'activité résiduelle du B.t.i. est très courte (quelques jours) et son utilisation sur le terrain nécessite donc des applications répétées toutes les semaines.

4.3. La lutte chimique

Elle est basée sur l'utilisation des insecticides pour lutter contre les vecteurs du paludisme et les insectes nuisants. Les nombreux insecticides utilisés de nos jours tant dans le domaine de l'agriculture que dans la santé publique se répartissent en deux grands groupes : les insecticides inorganiques (produits fluorés, phosphorés, et soufrés) leur usage est limité en raison de leur manque de sélectivité sur la faune cible, et les insecticides organiques (organochlorés, organophosphorés, carbamates, et les dérivés des plantes).

La dégradation des programmes de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent a fini par aboutir à la résurgence du paludisme et à l'abandon de la campagne mondiale d'éradication, à la résurgence du vecteur. Cependant les nouvelles mesures de lutte visant les moustiques adultes, pulvérisation intradomiciliaire à effet rémanent et moustiquaires imprégnées d'insecticides sont applicables à de vastes zones géographiques que des mesures plus spécifiques, locales ou écologiques, pour traiter les larves.

Les moustiquaires imprégnées à base de pyréthriinoïdes sont considérées comme un puissant outil de prévention dont le mode d'intervention vise à briser le contact homme vecteur (Zaim *et al.*, 2000). Elles ont montré une réduction de la mortalité et de la morbidité liée au paludisme au Kenya aussi bien dans la tranche d'âge de 1-5 ans qui s'est prolongée au delà de 5 ans sans modification du seuil d'immunité (Eisele *et al.*, 2005).

Malgré les efforts des différents programmes enrôlés dans la lutte contre le paludisme notamment le programme Roll Back Malaria (RBM) en Afrique de l'Ouest, seulement moins de 2 % d'enfants dorment sous moustiquaires imprégnées d'insecticides (WHO, 2003). Auparavant les moustiquaires étaient imprégnées de façon temporaire, et la re-imprégnation après utilisation de la moustiquaire occasionnait des déplacements de l'utilisateur, de son domicile vers la structure de santé dotée d'un centre de re-imprégnation. Mais pour palier aux multiples problèmes que rencontrait cette technique, des études ont été menées dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Dabiré *et al.*, 2006), sur l'introduction des moustiquaires à longue durée d'action. Dans cette nouvelle technique d'imprégnation la deltaméthrine est mélangée à une résine qui enrobe les fibres, ainsi l'insecticide est progressivement relargué, permettant à la moustiquaire de conserver pendant longtemps son efficacité. Cependant l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthriinoïdes pourrait être un handicap pour leur utilisation dans l'imprégnation des moustiquaires (Martinez-Torres, 1998).

4.4. La lutte génétique

Bien que les essais de la lutte génétique contre le vecteur soient récents, des progrès considérables ont été réalisés sur l'étude de la génétique de plusieurs espèces. Le principe est basé sur la propagation de génération en génération de facteurs défavorables à la survie de l'espèce. La technique des insectes stériles est basée sur l'induction de la stérilité sexuelle par irradiation ou par utilisation de produits chimiques stérilisants chez les mâles. L'irradiation ou l'utilisation des produits chimiques stérilisants peuvent inhiber complètement la production de gamètes chez les insectes (LaChance, 1967). Cependant en terme de réduction de la population cible, aucun de ces essais n'a été un réel succès et ceci pour de multiples raisons telles que, mauvaises irradiations, perte d'appétit des mâles à copuler après un trop long séjour au laboratoire, non compétitivité dans les conditions naturelles.

5. Les insecticides

De nombreuses molécules sont utilisées pour combattre les vecteurs de maladies et les nuisants mais surtout les ravageurs des cultures. Cette lutte active de l'homme à l'aide d'insecticides a développé chez *An. gambiae* si des mécanismes de résistances aux DDT, pyréthrinoïdes, carbamates et organophosphorés. Ces molécules sont principalement regroupées en 4 grandes familles.

5.1. Les Pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs du chrysanthème. Ces molécules exercent sur les insectes un effet rapide parfois réversible appelé effet « Knock Down » (effet KD). Les pyréthrinoïdes agissent sur le système nerveux central et périphérique en modifiant les caractéristiques électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant CnaVdp. Ces canaux une fois activés (c'est-à-dire en position ouverte), entraînent un flux d'ion sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation de la membrane cellulaire provoque l'activation du CnaVdp situé à proximité et de proche en proche engendrant une vague de dépolarisation assurant la propagation de l'influx nerveux (Chapman, 1969).

5.2. Les organochlorés

Ces insecticides sont issus de l'industrie du chlore. Le vocable organochloré se réfère aux molécules comme le DDT et ses analogues, le lindane et les cyclodiènes, ainsi subdivisés au regard de leur structure chimique et de leur mode d'action. Ces molécules agissent sur le système nerveux central en inhibant les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Le DDT agit à la fois sur le système nerveux périphérique et central en modifiant les caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage dépendant. Il exerce sur les insectes un effet KD comme les pyréthrinoïdes.

5.3. Les carbamates

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'ésérine. Ces molécules sont moins utilisées en santé publique à cause de leur toxicité souvent plus élevée vis-à-vis des mammifères. Il s'agit d'inhibiteurs agissant directement sans oxydation préalable.

5.4. Les organophosphorés

Les organophosphorés sont des dérivés de l'acide phosphorique. La fixation de ces molécules (qui sont actives après oxydation) sur l'acétylcholinestérase entraîne l'accumulation d'acétylcholine dans la jonction synaptique. Lorsque sa concentration devient trop forte, les récepteurs de l'acétylcholine se bloquent en position ouverte, entraînant la paralysie puis la mort de l'insecte.

6. La notion de résistance aux insecticides

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

6.1. La résistance métabolique

Elle correspond à un accroissement des processus de dégradation qui interviennent dans le métabolisme normal des insecticides. Cette résistance est le résultat soit d'une modification de la structure de l'enzyme, ce qui accroît ses capacités catalytiques, soit une augmentation de la quantité d'enzyme produite.

6.2. Les modifications de la cible

Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux, acétylcholinestérase, canal Sodium voltage dépendant, récepteur GABA. Toute modification structurale diminuant leur affinité avec les insecticides peut induire une résistance. Les mutations au niveau de la cible de l'insecte s'accompagnent souvent de phénomène de résistance croisée.

6.3. Les mécanismes secondaires de la résistance

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

6.4. La mutation *kdr*

Les Canaux Sodium Voltage Dépendant (CNaVdp) interviennent dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Ces canaux une fois activés (en position ouverte) entraînent un flux d'ions Sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation provoque l'activation des CNaVdp situés à proximité et de proche en proche engendre une vague de dépolarisation assurant la transmission de l'influx nerveux (Chapman, 1969). Les pyréthrinoides et le DDT agissent en modifiant la cinétique d'inactivation des CNaVdp. Le CNaVdp est une protéine transmembranaire de 1800 acides aminés. Elle comporte 4 domaines homologues répétés, comprenant chacun six segments hydrophobes intramembranaires.

L'exposition d'une souche sensible d'insectes à un pyréthrinoides entraîne une paralysie très rapide (effet knock down). Il agit au niveau des canaux sodium voltage-dépendant de la membrane nerveuse en perturbant le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses. Cependant en Afrique de l'Ouest une mutation *kdr* résulterait d'un remplacement de la Leucine (TTA) par la phénylalanine (TTT) au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant pour le canal sodium-dépendant, qui est un gène de résistance dirigé contre les pyréthrinoides et le DDT (Dong, 1986). Par contre, c'est une autre mutation, la leucine en serine, qui est décrite chez les populations d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Est (Ranson *et al.*, 2000).

6.5. La mutation *ace.1*

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme qui met fin à la transmission synaptique en catalysant l'hydrolyse du neurotransmetteur l'acétylcholine. Les organophosphorés et les carbamates inactivent cette enzyme par phosphorylation de la serine au niveau du site actif. Il a été montré que la mutation *ace.1* résulte d'un remplacement de Glycine (GGC) par une

Sérine (AGC) au niveau de la position 119 du gène codant pour l'acétylcholinestérase et qui serait la cible des insecticides organophosphorés et carbamates (Weill *et al.*, 2003). L'AChE des individus résistants est moins sensible à l'action inhibitrice de ces insecticides que celle des individus sensibles (Hama, 1983 ; Oppenoorth, 1985 ; Soderland et Bloomquist, 1990).

7. Problématique

L'étude de la résistance aux insecticides apporte des informations sur les processus évolutifs qui permettent aux insectes de s'adapter face aux modifications de leur environnement. La connaissance de la distribution des fréquences des gènes qui pourraient être à l'origine de la résistance du vecteur majeur du paludisme, *An. gambiae* si aux insecticides est un préalable indispensable à la mise au point de stratégies de lutte antivectorielle. En effet, les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes ont montré une réduction de la mortalité et de la morbidité liée au paludisme au Kenya aussi bien dans la tranche d'âge de 1-5 ans qui s'est prolongée au-delà de 5 ans sans modification du seuil d'immunité (Eisele *et al.*, 2005). Il a été également montré que l'usage de moustiquaires bi-imprégnées d'insecticides pyréthrinoïdes et organophosphorés, conférait un avantage grâce à l'effet de synergie entre ces deux insecticides (Darriet *et al.*, 2005). Cependant l'émergence de la résistance d'*An. gambiae* aux insecticides pourrait être un facteur limitant à l'utilisation des matériaux imprégnés.

Au Burkina Faso la distribution du gène *kdr*, principal gène de résistance aux pyréthrinoïdes, chevauche parfaitement avec les zones cotonnières (Diabaté *et al.*, 2002). Ce gène est aussi présent en zones urbaines avec l'utilisation des bombes aérosols et des tortillons pour lutter contre la nuisance culicidienne. Ces zones à usage intensif d'insecticides constitueraient une pression de sélection de ce gène dont la fréquence y est très élevée (Diabaté *et al.*, 2002, 2003). Ce gène a été observé chez quelques individus d'*Anopheles arabiensis* en zone cotonnière à l'Ouest du Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2004). Récemment, lors d'une étude dans la zone rizicole de la Vallée du Kou, il a été observé en plus du gène *kdr*, la présence du gène *ace.1* (Dabiré com. pers.), qui pourrait être à l'origine de la résistance aux organophosphorés et carbamates, au sein des populations d'*Anopheles gambiae* ss. Aucune étude n'a jusque là investigué la présence du gène *ace.1* dans la zone cotonnière de l'Ouest du Burkina Faso qui est une zone où les insecticides à usage agricole exercent une forte pression de sélection sur les moustiques.

Le but de notre étude est de faire le point sur l'émergence et la dispersion du gène *ace.1* et la réactualisation de la fréquence du gène *kdr* dans le bassin cotonnier.

Les objectifs spécifiques sont :

- Réactualiser la fréquence du gène *kdr* dans le bassin cotonnier.
- Investiguer la présence et la dispersion du gène *ace.1* dans le bassin cotonnier.

B. METHODOLOGIE

1. Site de l'étude

Le Burkina Faso, avec une superficie de 274000 Km² est marqué par l'alternance d'une saison sèche de 6 à 8 mois et d'une saison humide de 4 à 6 mois (Laclavère *et al.*, 1993). Le pays se divise en trois régions climatiques :

- La zone soudanienne à l'Ouest
- la zone soudano-sahélienne au centre.
- la zone sahélienne à l'Est

La collecte des moustiques s'est effectuée dans la région de l'Ouest du pays durant trois mois (Août à Octobre). Nous avons échantillonné dans 13 sites repartis comme suit (Figure 2) :

- au Sud-Ouest : Niangoloko, Banfora, Orodara, Vallée du Kou, Soumousso, Diébougou, Gaoua, Batié.
- au Nord-Ouest : Dédougou, Nouna.
- au Centre-Ouest : Boromo, Houndé.

Nous avons échantillonné dans une seule localité du centre notamment à Nanoro (site témoin).

La typologie définie par la nouvelle nomenclature de la SOFITEX est la suivante :

- Nouvelle zone cotonnière : Niangoloko, Boromo, Diébougou, Gaoua, Batié.
- Ancienne zone cotonnière : Banfora, Orodara, Houndé, Dédougou, Nouna.

2. Echantillonnage

Dans chaque site de l'étude cinq maisons ont été sélectionnées de façon aléatoire le matin entre 7h et 10h. Des draps de couleurs blanches ont été étalés à l'intérieur de chaque maison. Après avoir fermé toutes les ouvertures, nous avons effectué une pulvérisation à l'intérieur des maisons avec un insecticide aérosol (Kaltox®), et nous avons observé 5 à 10 minutes avant de collecter les moustiques. Les moustiques ont été ramassés à l'aide de pinces

et déposés dans des boîtes de pétri. Les moustiques du genre *Anopheles* ont été triés après identification morphologique (Gillies et De Meillon., 1968) et stockés dans des microtubes contenant du silicagel qui permet la conservation des moustiques.

Sites d'échantillonnage

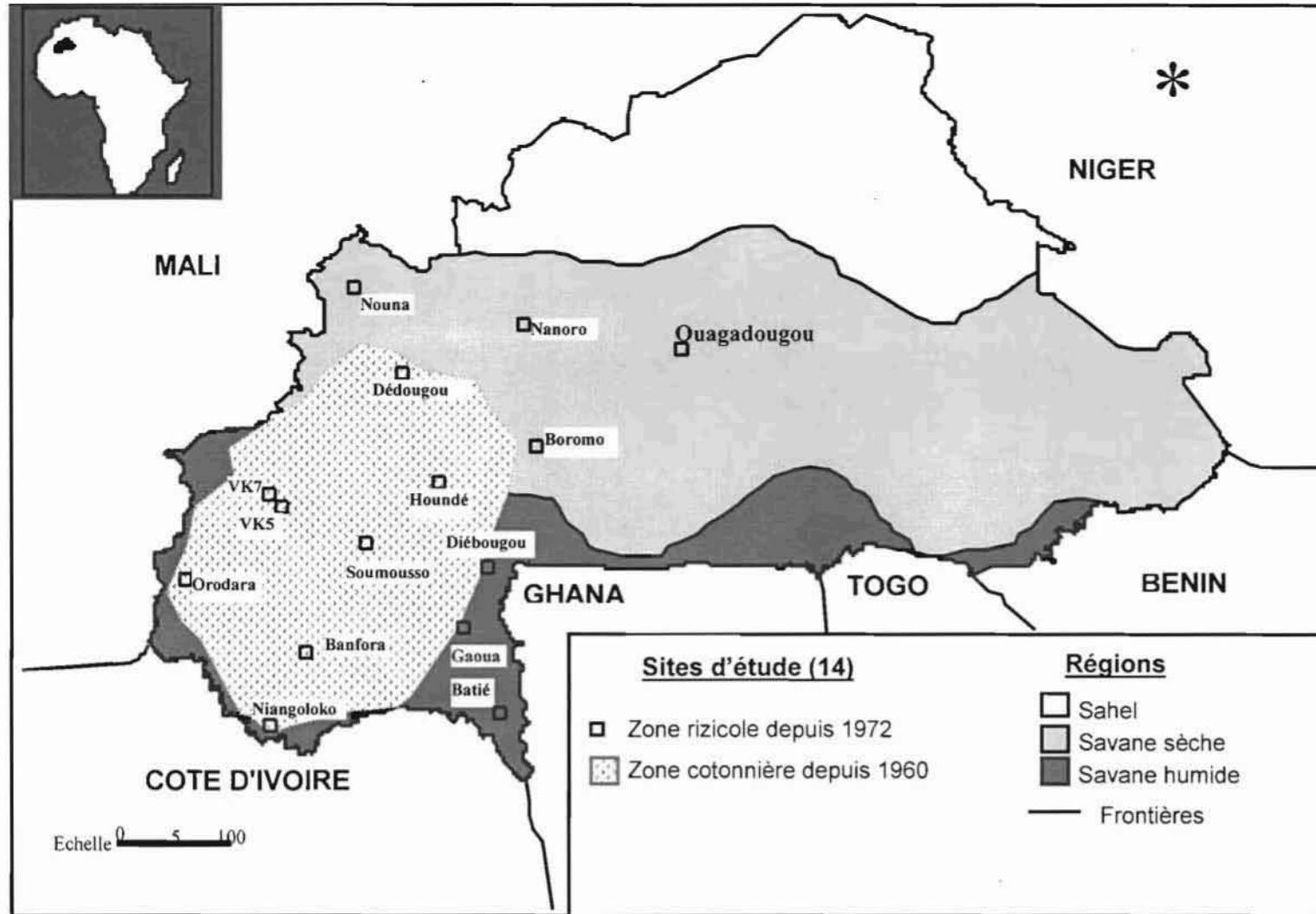


Figure 2: Sites d'échantillonnage (selon l'ancienne nomenclature)

3. Analyses au laboratoire

A l'issue de l'identification, les moustiques du complexe *An. gambiae* sl sont triés au hasard, et un minimum 30 moustiques par site sont transférés dans des tubes Eppendorf stériles. Ensuite les moustiques sont broyés et l'ADN est extrait à partir de ce broyat suivant un protocole d'extraction d'ADN. Les réactions d'amplification sont par la suite opérées à partir de cet ADN pour identifier les espèces (Scott *et al.*, 1993), déterminer les formes moléculaires M et S (Favia *et al.*, 2001), rechercher la présence des mutations *kdr* (Martinez-Torrez *et al.*, 1998) et *ace.1* (Weill *et al.*, 2004).

3.1. PCR diagnostic *An. gambiae* sl

Au cours de la réaction PCR pour la détermination des espèces du complexe *An. gambiae* (Scott *et al.*, 1993) (Annexe 1), nous avons utilisés trois amorces qui sont les suivants :

UN : GTGTGCCGTTCCCTCGATGT

AG : CTGGTTTGGTCGGCACGTTT

AA : AAGTGTCCCTTCTCCATCCTA

3.2. Formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*

Nous avons utilisé quatre amorces au cours de la réaction PCR pour la détermination des formes moléculaires M et S (Favia *et al.*, 2001) (Annexe 2).

R3 : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R5 : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B / S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

3.3. Mutation *kdr* chez *An. gambiae* sl

La réaction PCR pour la mise en évidence de la mutation *kdr* utilise quatre amorces dont les séquences sont les suivants (Martinez-Torrez *et al.*, 1998) (Annexe 3) :

D1. ATAGATTCCCCGACCATG

D2. AGACAAGGATGATGAACC

D3. AATTTGCATTACTTACGACA

D4. CTGTAGTGATAGGAAATTA

3.4. Mutation *ace.1* chez *An. gambiae* sl

Cette réaction PCR utilise deux amorces spécifiques dont les séquences des bases sont les suivants (Weill *et al.*, 2003) (Annexe 4) :

Ex3AGdir GATCGTGGACACCGTGTTTCG

Ex3AGrev AGGATGGCCCCGCTGGAACAG

4. Gestion et analyse des données

Les données ont été saisies et validées sur ordinateur à l'aide du logiciel Excel 2000 et analysées par le même logiciel. En plus, il a été utilisé pour les représentations graphiques.

Le test statistique utilisé est le test de Fisher, analyse de la variance ANOVA. Ce test est choisi lorsque l'on désire comparer des moyennes observées sur plusieurs échantillons. La valeur de $P < 0.05$ a été retenue comme seuil de significativité.

C. RESULTATS

1. Répartition du complexe *An. gambiae* dans la zone de l'Ouest

An. gambiae sl est représentée dans l'ensemble de la zone de l'Ouest. Toutefois, on a observé une prédominance d'*An. gambiae* ss dans cette zone. *An. arabiensis* a été observée seulement dans deux sites à de faibles proportions respectivement 7 % et 16,6 % à Dédougou et à Diébougou (Tableau 1).

Dans la zone soudanienne, la répartition des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* ss varie d'un site à un autre. La forme moléculaire S a été exclusivement rencontrée dans les sites de Orodara, Niangoloko et Batié tandis que dans les autres sites à l'exception de la zone rizicole et à Diébougou, les deux formes moléculaires étaient réparties en des proportions qui ne varient pas significativement. Cependant dans les zones rizicoles de la Vallée du Kou, la forme moléculaire M est la seule rencontrée à VK5 et prédomine à VK7 à une fréquence de 55 % vs 45 % pour la forme S. Dans le site de Diébougou, la forme moléculaire M n'a pas été rencontrée et seule la forme S a été identifiée à une fréquence élevée atteignant 83,3 % vivant en sympatrie avec *An. arabiensis* (16,6 %). Au Nord Ouest de la zone cotonnière localisée dans la zone climatique soudano sahélienne, la répartition des deux formes a été dominée par la forme moléculaire M à Dédougou tandis que la forme S était plus représentée à Nouna et à Boromo. Dans le site de Nanoro qui est au contraire une zone vivrière située au centre du pays, les deux formes moléculaires vivent en sympatrie avec *An. arabiensis* qui représente l'espèce la plus fréquente (42,9 %) (Tableau 1).

2. Distribution de la fréquence du gène *kdr*

Cette étude a été conduite avec pour ultime objectif de réactualiser le niveau de distribution et de diffusion du gène *kdr* depuis les derniers travaux réalisés par l'équipe du Centre Muraz/IRSS datant déjà de sept ans dans un contexte de vulgarisation de la culture du coton impliquant nécessairement des traitements phytosanitaires.

A l'instar des travaux réalisés il y a sept ans par Diabaté *et al.* (2002, 2003), la mutation *kdr* est présente dans toute la zone cotonnière et est entièrement distribuée au sein d'*An. gambiae* ss à une fréquence largement au dessus de 50 % (Tableau 1). Par contre, cette mutation n'a pas été observée au sein des populations d'*An. arabiensis* telle qu'elle avait été

reportée en 2002 (Diabaté *et al.*, 2004a). Quoique la distribution du gène *kdr* ait été observée en nette progression au sein de la forme moléculaire M, elle est significativement plus répandue au sein de la forme moléculaire S à des fréquences atteignant 80 % ; à Orodara (97 %), Banfora (85 %) Niangoloko (84 %) et Gaoua (87 %). La fréquence de ce gène a dépassé le seuil de 60 % dans les autres localités et ne différait pas significativement d'un site à un autre ($p>0,05$). Le fait le plus marquant a été la progression du gène *kdr* au sein des populations de la forme moléculaire M. En effet en 2000, la mutation *kdr* chez la forme M n'avait été reportée que dans la seule zone rizicole de VK7 à une fréquence faible atteignant à peine 3 % (Diabaté *et al.*, 2003). Les quelques individus qui portaient cette mutation étaient tous hétérozygotes RS. Nos résultats ont montré que la fréquence *kdr* a été observée au sein des populations de M dans la quasi-totalité des localités échantillonnées atteignant par moment des proportions similaires à celles de la forme moléculaire S notamment à Boromo (60 %), Gaoua (50 %), Dédougou (43 %) et Nouna (33 %) où elle n'avait jamais été observée auparavant. L'analyse du génotype des spécimens portant la mutation montre que le taux d'homozygote RR est très élevé (71 %) (Tableau 1).

Globalement si notre étude a montré que la distribution du gène *kdr* était en nette progression comparée au niveau de 2000, elle a été quasi inexistante dans la zone de culture vivrière notamment à Nanoro au centre du pays. En comparant la fréquence allélique au sein des populations de la formes S entre ancienne et nouvelle zones cotonnières selon la nomenclature de la SOFITEX, il ressort que celle-ci ne diffère pas significativement entre ces deux zones ($P>0,05$). Cependant, elle est significativement plus faible dans les zones vivrière et rizicole (Figure 3). Cette différence serait plus marquée si la fréquence allélique n'était pas particulièrement élevée à VK7, rehaussant le niveau de ce gène en zone rizicole.

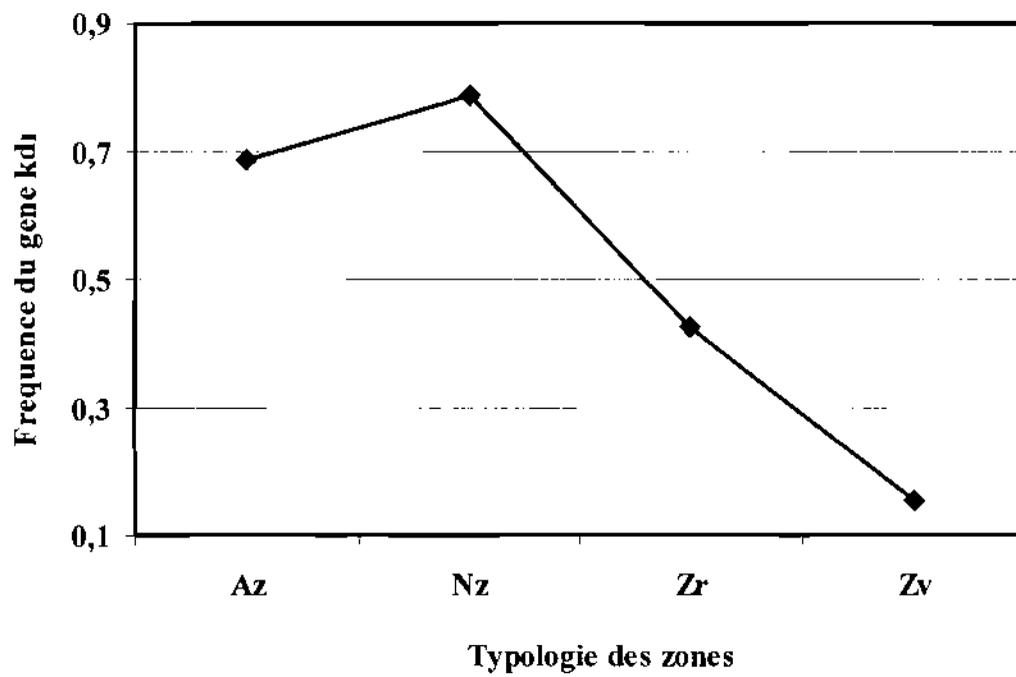
Au sein des populations de la forme M, la fréquence allélique du gène *kdr* a été plus élevée dans la nouvelle zone cotonnière même si celle-ci ne différait pas significativement. Celle des zones vivrière et rizicole était significativement plus petite qu'en zone cotonnière ($P<0,05$) (Figure 3).

Tableau 1 : Distribution de la fréquence du gène *kdr* dans le bassin cotonnier

Sites d'étude	<i>An. gambiae</i> sl			<i>An. gambiae</i> ss						<i>An. arabiensis</i>					
				<i>An. gambiae</i> ss			Forme S			Forme M					
	N	F(<i>kdr</i>)		N	%	F(<i>kdr</i>)	N	%	F(<i>kdr</i>)	N	%	F(<i>kdr</i>)	N	%	F(<i>kdr</i>)
Orodara	15	0,97		15	100	0,97	15	100	0,97	0	0		0	0	
Soumouosso	29	0,67		29	100	0,67	27	93,1	0,7	2	6,9	0,25	0	0	
Houndé	26	0,67		28	100	0,74	18	88	0,82	10	12	0,16	0	0	
Dédougou	27	0,48		25	83	0,52	10	40	0,66	15	60	0,43	2	7	0
Nouna	27	0,53		27	100	0,53	17	59	0,68	12	41	0,33	0	0	
Niangoloko	19	0,84		19	100	0,84	19	100	0,84	0	0		0	0	
Banfora	30	0,5		30	100	0,78	25	83	0,85	5	17	0,1	0	0	
Boromo	28	0,7		26	100	0,7	18	64	0,75	10	36	0,6	0	0	
Diébougou	25	0,32		25	83,3	0,38	25	100	0,38	0	0		5	16,6	0
Gaoua	21	0,83		21	100	0,83	19	90	0,87	2	10	0,5	0	0	
Batié	27	0,31		27	100	0,31	27	100	0,31	0	0		0	0	
VK5	46	0,28		46	100	0,28	0	0		46	100	0,28	0	0	
VK7	58	0,57		58	100	0,57	26	45	0,92	32	55	0,06	0	0	
Nanoro	28	0		16	57,1	0	6	37,5	0	10	62,5	0	12	42,8	0

$F(kdr) = (2RR + RS)/2N$: Fréquence allélique de la mutation *kdr* au sein de l'échantillon $(RR + RS) / (RR + RS + SS)$.

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



**Figure 3 : Fréquence du gène *kdr* chez *An. gambiae* ss (Az : Ancienne zone cotonnière
 Nz : Nouvelle zone cotonnière, Zr : Zone rizicole, Zv : Zone vivrière)**

3. Distribution de la fréquence du gène *ace.1*

A l'exception de deux sites (VK5 et Nanoro) la mutation *ace.1* a été observée dans toutes les localités échantillonnées à des fréquences variables. Elle a été reportée au sein des populations des formes moléculaires S et M d'*An. gambiae* ss avec une nette prédominance dans la forme S. En effet dans la forme moléculaire S, le gène *ace.1* est distribué à des fréquences relativement élevées atteignant en moyenne 30 %. L'analyse du génotype des spécimens portant la mutation montre que le taux d'hétérozygotes est très élevé (84 %) (Tableau 2).

Il est observé chez la forme moléculaire M seulement dans cinq localités une fréquence moyenne significativement plus faible atteignant 8 % ($p < 0.05$). Mais la valeur de cette fréquence variait d'un site à un autre. Ainsi elle a été observée à une fréquence comparable à celle trouvée dans la forme S à Banfora (2 %), Houndé (15 %), Boromo (66 %) et à des fréquences plus faibles à Dédougou et VK5 respectivement 1 et 3 %. Les analyses montrent également un taux élevé d'hétérozygotes chez la forme M (78 %) (Tableau 2).

Le gène *ace.1* a été aussi trouvé dans les populations d'*An. arabiensis* dans une seule localité, Diébougou à une fréquence très importante de 28 %. Les individus de cette espèce portant cette mutation le sont à l'état hétérozygote.

En comparant la fréquence de ce gène dans la forme moléculaire S en fonction du découpage en ancienne et nouvelle zones cotonnières, il n'est ressorti aucune différence significative dans la distribution à travers ces zones. Par contre, la fréquence du gène a été plus élevée ($P < 0,05$) dans les zones cotonnières (ancienne comme nouvelle) que celle observée dans les zones dites vivrières où peu ou pas de coton est cultivé (Figure 4). C'est notamment les zones de Batié au Sud-Ouest et Nanoro au Centre du pays où cette mutation n'a pas été détectée. Au contraire dans la forme moléculaire M, le gène *ace.1* a été distribué à une fréquence plus élevée dans l'ancienne zone cotonnière que dans les autres zones où sa fréquence par ailleurs ne différerait pas significativement ($P > 0,05$) (Figure 4).

Tableau 2: Distribution de la fréquence du gène *ace.1* dans le bassin cotonnier

Sites d'étude	<i>An. gambiae s.l.</i>					<i>An. gambiae s.s.</i>						<i>An. arabiensis</i>		
			<i>An. gambiae s.s.</i>			Forme S			Forme M					
	N	F(<i>ace.1</i>)	N	%	F(<i>ace.1</i>)	N	%	F(<i>ace.1</i>)	N	%	F(<i>ace.1</i>)	N	%	F(<i>ace.1</i>)
Orodara	15	0,4	15	100	0,4	15	100	0,4	0	0		0	0	
Soumouso	29	0,41	29	100	0,41	27	93,1	0,42	2	6,9	0	0	0	
Houndé	26	0,46	28	100	0,46	18	88	0,43	10	12	0,66	0	0	
Dédougou	27	0,19	25	83	0,2	10	60	0,35	15	40	0,1	2	7	0
Nouna	27	0,17	27	100	0,17	17	59	0,29	12	41	0	0	0	
Niangoloko	19	0,35	19	100	0,35	19	100	0,35	0	0		0	0	
Banfora	30	0,33	30	100	0,33	25	83	0,38	5	17	0,2	0	0	
Boromo	28	0,3	26	100	0,3	23	64	0,39	3	34	0,15	0	0	
Diébougou	30	0,38	13	72	0,46	25	100	0,46	0	0		5	0,17	0,3
Gaoua	21	0,21	21	100	0,21	19	90	0,24	2	10	0	0	0	
Batié	27	0,39	27	100	0,39	27	100	0,39	0	0		0	0	
VK5	46	0	46	100	0	0	0		46	100	0	0	0	
VK7	58	0,18	58	100	0,18	26	45	0,37	32	55	0,031	0	0	
Nanoro	28	0	16	57,1	0	6	37,5	0	10	62,5	0	12	42,8	0

$F(ace.1) = (2RR + RS)/2N$: Fréquence allélique de la mutation *ace.1* au sein de l'échantillon $(RR + RS) / (RR + RS + SS)$.

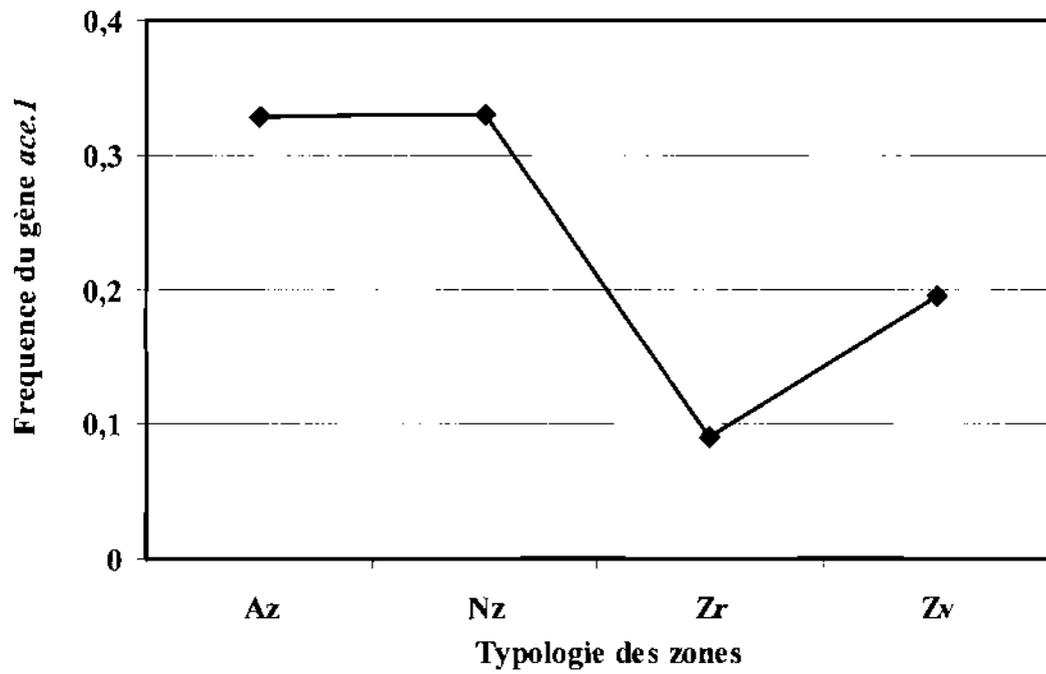


Figure 4 : Distribution de la fréquence de *ace.1* chez *An. gambiae* ss (Az : Ancienne zone cotonnière, Nz : Nouvelle zone cotonnière, Zr : Zone rizicole, Zv : Zone vivrière)

D. DISCUSSION

1. Répartition des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* sl

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides constitue un obstacle majeur à la lutte antivectorielle. La présente étude a permis de réactualiser la fréquence du gène *kdr* et de mettre en évidence la présence du gène *ace.1* chez *An. gambiae* sl dans la région de l'Ouest.

La répartition des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae* est cependant inégale, dans le bassin cotonnier. A l'instar des travaux réalisés par Diabaté *et al* (2002), la distribution géographique d'*An. arabiensis* affiche un gradient croissant du Sud-Ouest vers le Centre-Ouest. Cependant la répartition spatiale de la forme S montre un gradient croissant du Centre-Ouest vers le Sud-Ouest où sa représentation exclusive dans plusieurs sites (Orodara, Niangoloko, et Batié) témoigne son adaptation à cette zone. Cela confirme les résultats obtenus lors des derniers travaux de l'équipe du Centre Muraz/IRSS datant déjà de sept ans (Diabaté *et al.*, 2002). La répartition géographique de la forme M montre un gradient décroissant du Centre-Ouest vers le Sud-Ouest, les mêmes résultats avaient été obtenus par Diabaté *et al* (2002). Les zones rizicoles (VK5, VK7) semblent être des milieux favorables à la forme M. Elle a été la forme majoritaire d'*An. gambiae* rencontrée dans ces milieux. La forme S prédomine dans l'ensemble de la région de l'Ouest, et semble la plus adaptée à cette zone qui est la principale région agricole avec une utilisation massive d'insecticides à usage agricole.

2. Distribution de la fréquence du gène *kdr*

La mutation *kdr* résulte d'un remplacement de la Leucine (TTA) par la phénylalanine (TTT) au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant pour le canal sodium-dépendant, qui est un gène de résistance dirigé contre les pyréthrinoides (Dong, 1986). Du fait de son mode d'action, il exerce aussi une résistance croisée entre le DDT et les pyréthrinoides. Observé pour la première en Côte-d'Ivoire en 1993 (Elissa *et al.*, 1993), il a été ensuite décrit à travers toute l'Afrique de l'Ouest où il serait le principal mécanisme de résistance (Chandre *et al.*, 1999 ; Akogbéto et Yacoubou, 1997 ; Diabaté *et al.*, 2002 ; Yawson *et al.*, 2006). Il a été observé quasi totalement dans les populations de la forme

moléculaire S d'*An. gambiae* ss souvent à des fréquences très élevées (Diabaté *et al.*, 2004) et n'a été trouvé chez la forme M que sur le littoral de certains pays d'Afrique de l'Ouest. Quoique en 2000, il ait été observé dans la forme moléculaire M dans un site rizicole à l'Ouest du Burkina mais à une très faible proportion. Le passage du *kdr* dans cette forme moléculaire serait due à une introgression de la mutation chez la forme S vers la forme M (Weill *et al.*, 2000).

En comparant la fréquence du gène *kdr* décrite chez la forme S d'*An. gambiae* ss par Diabaté en 2000 à l'Ouest du Burkina, nos résultats indiquent que celle-ci n'a pas beaucoup varié, toutefois une augmentation importante a été notée dans trois sites notamment à Orodara (72 % vs 97 %), à Houndé (60 % vs 71 %) et enfin Boromo (20 % vs 75 %). Celle des zones vivrières est restée stationnaire à l'instar de la fréquence allélique rapportée à Batié au Sud-Ouest du pays (33 % vs 31 %).

Quant à la fréquence du *kdr* chez M, nous assistons à une progression géographique de ce gène au Burkina Faso. En effet en 2000 il n'avait été observé que dans un seul site (Vallée du Kou) à une fréquence de 3 % alors que son niveau actuel est de 30 %, ce qui traduit une propagation spatio-temporelle, quasi répandue dans tout l'Ouest du pays où la pression de sélection exercée par l'utilisation des insecticides est accrue comme en témoigne le nombre élevé d'individus homozygotes à cette mutation.

La comparaison de la fréquence *kdr* suivant le découpage de la zone en nouvelle et ancienne zones cotonnières montre que le gène *kdr* est distribué de façon similaire dans ces zones. Ceci s'expliquerait probablement par le fait qu'ancienne et nouvelle zones, se trouvent dans le même espace géographique et d'ailleurs les zones dites nouvellement cotonnières ont eu un passé très récent avec la culture du coton. D'où certainement la même pression de sélection qu'elles exerceraient sur les moustiques. Cependant comparée à celle des zones à cultures vivrières, la fréquence de ce gène est très nettement élevée confirmant l'action de la pression de sélection qu'exerce l'utilisation à usage agricole des insecticides dans les zones cotonnières.

3. Distribution de la fréquence du gène *ace.1*

La mutation *ace.1* résulte d'une substitution de la glycine (GGC) par une serine (AGC) au niveau de la position 119 du gène codant pour l'acétylcholinestérase, qui serait le site de fixation des organophosphorés et des carbamates (Weill *et al.*, 2003). L'étude d'une

implication éventuelle de différents mécanismes dans la résistance a suggéré l'existence d'un allèle *ace.1R* qui pourrait être impliqué dans la résistance de *Culex quinquefasciatus* aux organophosphorés et aux carbamates en Côte d'Ivoire et dans une seule localité du Burkina Faso (Niangoloko) (Chandre, 1998). Il a été observé également une baisse de la sensibilité aux organophosphorés et carbamates chez *An. gambiae* au Nord de la Côte d'Ivoire (N'Guessan *et al.*, 2003). Par ailleurs le dosage de l'acétylcholinestérase est réalisé par des techniques biochimiques qui ne permettent pas d'isoler le gène muté qui pourrait conférer une résistance aux organophosphorés et aux carbamates (Chandre, 1998). Récemment la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) mise au point permet d'isoler le gène *ace.1* qui serait impliqué dans la résistance aux organophosphorés et carbamates chez *An. gambiae* sl (Weill *et al.*, 2004).

Les travaux actuels dans l'Ouest du Burkina sont les premiers en Afrique de l'Ouest à appliquer la réaction PCR afin d'investiguer la présence du gène *ace.1*.

La distribution homogène de la fréquence du gène *ace.1* dans tout l'Ouest du pays témoigne que les organophosphorés et les carbamates qui pourraient être la cause de l'émergence de ce gène au sein des populations d'*An. gambiae* sl ont été utilisés avec les mêmes doses dans toute la zone.

L'analyse du génotype des spécimens montre que le taux d'hétérozygotes est très élevé au sein des formes moléculaires (M comme S) cela témoigne que la distribution de la fréquence du gène *ace.1* est récente chez *An. gambiae* dans l'Ouest du pays.

En effet, selon la SOFITEX ces insecticides ont été introduits dans les années 1996 pour être utilisés en association toujours avec un pyréthrianoïde suite à la résistance aux pyréthrianoïdes des ravageurs du coton notamment *Helicoverpa armigera* et *Bemisia tabaci* (mouche blanche). L'évolution rapide de la distribution du gène *ace.1* au sein de la forme M dans tout l'Ouest du pays tient au fait de la forte pression de sélection exercée par des organophosphorés et des carbamates. Cependant l'émergence rapide de la mutation *ace.1* chez *An. arabiensis* bien que cela soit dans un seul site (Diébougou), suggère que sa distribution au sein de cette espèce va rapidement s'étendre dans tout le pays.

Contrairement au gène *kdr* qui a d'abord été observé dans la forme M sur le littoral du Bénin et de la Côte d'Ivoire (Fanello *et al.*, 2000), par la suite à la Vallée du Kou au Burkina Faso, à une très faible fréquence (Diabaté *et al.*, 2003), l'émergence simultanée du gène *ace.1* au sein des formes moléculaires (M comme S), ne nous permet pas d'évoquer une quelconque

introgression de ce gène. Cependant les organophosphorés et les carbamates semblent exercer une plus forte pression de sélection sur les moustiques comparativement aux pyréthriinoïdes.

CONCLUSION / PERSPECTIVES

Cette étude menée dans le bassin cotonnier de l'Ouest du Burkina Faso nous a permis :

- De réactualiser le niveau de la distribution et diffusion du gène *kdr* depuis les derniers travaux réalisés par l'équipe du Centre Muraz/IRSS sur la résistance aux pyréthrinoïdes d'*An.gambiae* sl. En effet le niveau de la fréquence du gène *kdr* n'a pas varié significativement, toutefois on note une augmentation importante par endroits.
- D'investiguer la présence du gène *ace.1* et d'évaluer le niveau de la distribution de sa fréquence dans la zone de l'Ouest. Ce gène est répandu aussi dans toute la zone Ouest certes, mais à des fréquences moins élevées que le *kdr*. L'émergence du gène *ace.1* chez *An. gambiae* pourrait être liée à l'utilisation des organophosphorés et des carbamates à des fins agricoles et domestiques mais ce point mérite d'être éclairci par des bioessais.

Cette étude soulève un certain nombre de questions qui ouvrent des perspectives de recherches nouvelles pour ce qui concerne :

- Couvrir le reste du pays pour établir à l'échelle nationale la distribution de ces deux gènes (*ace.1* et *kdr*) importants de résistance.
- Séquençage des introns chez les deux formes moléculaires M, S et chez *An. arabiensis* pour voir si la présence de ce gène chez M serait due à une introgression ou plutôt à une de novo phénomène (mutation indépendante)
- Faire des bioessais en tube OMS pour tester le niveau de résistance opérationnelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alonzo P. L., Lindsay S. W., Schellenberg A. J. R. M., Conteh M., Hill A. G., David P. H., Fegan G., de Francisco A., Hall A. J., Shenton F. C., Cham K. et Greenwood B. M. (1991). The effect of insecticide-treated bednets on mortality of Gambian children. *The Lancet*, 337: 1499-1502.
2. Alonzo P. L., Lindsay S. W., Schellenberg A. J. R. M., Keita K., Gomez P., Shenton F. C., Hill A. G., David P. H., Fegan G., Cham K. et Greenwood B. M. (1993). A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of Gambia, West Africa. 6. The impact of the interventions on mortality and morbidity from malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, supplement 2, 37-44.
3. Asidi A. N., N'Guessan R., Hutchinson R. A., Lamizana M. T., Carnevale P., Curtis C. F. (2004). Experimental hut comparisons of nets treated with carbamate or pyrethroid insecticides, washed or unwashed, against pyrethroid-resistant mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 18:134-140.
4. Binka F. N., Kubaje A., Adjuik M., Williams L. A., Lengler C., Maude G. H., Arma G. E., Kajihra B., Adiamo J. H. et Smith P. G. (1996). Impact of permethrin treated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Tropical Medicine and International Health*, 1,147-154.
5. Bonnet J., Corbel V., Darriet F., Chandre F. et Hougard J. M. (2004). Topical applications of pyrethroid and organophosphate mixtures revealed positive interactions against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*. *J Am Mosquito Control Ass*, 20 : 438-443.
6. Bruce-Chwatt L. J. et De Zuleta J. (1985). Essential Malariology. 2è edition. Londres: William Hememann. Medical books, 452p.
7. Brun L. O. et Sales S. (1975). Evolution de la resistance à la dieldrine d'une population sauvage d'*An. funestus* Giles en l'absence de traitements sélectifs délibérés. Rap. ronéot. OCCGE-ORSTOM, lab. Entomologie, Bobo-Dioulasso, N° 15/Ent75 du 25.11.1975.

8. Bryan J. H., Petrarca V., Di Deco M. A. et Coluzzi M. (1987). Adult behaviour of members of the *An. gambiae* complex in the Gambiae with references to *An. melas* and its chromosomal variants. *Parasitologia*, 29: 221-249.
9. Chandre F., Manguin S., Brengues C., Dossou Y. J., Darriet F., Diabaté A., Carnevale P. et Guillet P. (1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *An. gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the mopti form. *Parassitologia*. 41: 319-322.
10. Chapman R. F. (1969). *The insects, structure and function*. The English Universities Press Ltd. London, UK: 819p.
11. Christie M. (1959). A critical review of the role of immature stages of anopheline mosquitoes in the regulation of adult numbers with particular reference to *An. gambiae*. *Trop. Dis. Bull*, 56 : 385-399.
12. Coluzzi M. (1984). Heterogeneities of malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 62(Suppl.): 107-113.
13. Coluzzi M. (1992). Malaria vector analysis and control. *Parasitology today*, 8,113-118.
14. Coluzzi M., Petrarca V. et Di Deco M. A. (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles*. *Boll. Zool*, 52 : 45-63.
15. Corbel V., Darriet F., Chandre F. et Hougard J. M. (2002). Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. *Parasite* 9: 255-259.
16. Costantini C., Sagnon N'F., Sanogo E. I., Coluzzi M. et Boccolini D. (1999). Chromosomal and heterogeneities suggest incipient speciation in *An. funestus* from Burkina Faso. *Parasitologia*, 41, 595-611.
17. Craig G. B. Jr. (1963). Prospects for vector control through genetic manipulation of populations. *Bull. WHO*. 29: 89-97.
18. D'Alessandro U., Olaleye B. O., McGuire W., Languerock P., Bennett S., Aikins M. K., Thomson M. C., Cham M. K., Cham B. A. et Greenwood B. M. (1995). Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of a treated bednet programme. *The Lancet*, 345, 479-483.

19. Dabiré R. K., Diabaté A., Baldet T., Toé L. P., Guiguemdé R. T., Ouédraogo J. B. et Skovmand O. (2006). Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *An. gambiae* ss resistance to pyrethroids. *Malaria Journal*, 5:12.
20. Darriet F., Hougard J. M. et Corbel V. (2005). Comportement d'*An. gambiae* *Kdr*+ face à des moustiquaires bi-imprégnées d'insecticides pyrèthrinoides et organophosphorés. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 98, 3, 201-204.
21. Della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou Y. J., Favia G., Petrarca V. et Coluzzi M. (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *An. gambiae* ss in West Africa. *Insect. Mol. Biol.* 10 (1), 9-18.
22. Diabate A., Baldet T., Chandre F., Guiguendé T. R., Guillet P. et al., (2002). First report of the *kdr* mutation in *An. gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parasitologia*, 44(3-4): 157-158.
23. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K. R., Kengne P., Simard F., Guiguemdé T. R., Guillet P., Hemingway J. et Hougard J. M. (2003). *Kdr* mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *An. gambiae* (*Diptera: Culicidae*) in the tropical savannah area of West Africa. *J. Med. Entomol.* 40 (2), 195-198.
24. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K. R., Simard F., Ouédraogo J. B., Guillet P. et Hougard J. M. (2004). The first report of *kdr* mutation in *An. arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. *J. Am. Mosq. Control. Ass.* 20 (2), 195-196.
25. Eisele T. P., Lindblade K. A., Wannemuehler K. A., Gimnig J. E., Odhiambo F., Hawley W. A., Kuile F. O. T., Phillips-Howard P., Rosen D. H., Nahlen B. L., Vulule J. M. et Slutsker L. (2005). Effect of sustained insecticide-treated bed net use on all-cause child mortality in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73 (1):149-56.
26. Fanello C., Akogbeto M. et Della Torre A. (2000). Distribution of the pyrethroid knockdown resistance gene (*kdr*) in *An. gambiae* sl from Benin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 132.
27. Favia G., Della Torre A., Bagayoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N'F., Touré Y. T. et Coluzzi M. (1997). Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *An.*

- gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect. Mol. Biol.* 6 (4): 377-383.
28. Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sidén-Kiamos I. et Louis C. (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *An. gambiae* ss. *Insect. Mol. Biol.* 10 (1), 19-23.
 29. Fontenille D. et Lochouart L. (1999). The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parasitologia.* 41: 267-271.
 30. Gentilini M. (1993). Le paludisme. *Médecine tropicale.* 5è édition. Paris : Flammarion, 91-122.
 31. Gillies M. T. et De Meillon B. (1968). The Anopheline of Africa south of the Sahara. *Inst. Med. Res.* 54: 343p.
 32. Hama H. (1983). Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of AChE. In: G.P. Georgiou and T. Saito, editor, Pest resistance to pesticide: New York: Plenum pp.231-299.
 33. Hamon J., Adam J. P. et Grjebine A. (1956). Observations sur la répartition et le comportement des Anophèles de l'Afrique équatoriale française, du Cameroun et de l'Afrique occidentale. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 15: 549-591.
 34. Hamon J., Sales S. et Coz J. (1968). Données récentes sur la résistance aux insecticides chez les membres du complex *An. gambiae* et chez *An. funestus*. *Rap. final VIII. conférence tehn. OCCGE.*
 35. Holstein M. (1949). Guide pratique de l'anophélisme en A.O.F. 55p.
 36. LaChance L. E., Schmidt C. H. et Bushland R. C. (1967). Stérilité induite par la radiation, P. 147-96. Dans : W.W. Kilgore et R.L. Doutt (eds.), contrôle des parasites : Méthodes chimiques biologiques, physiques et choisies. Édition académique, New York. 477 P.
 37. Laclavère G., Bougnounou O., Compaore G., Izard M. et al., (1993). Atlas du Burkina éd. J. a. 54p.
 38. Lemardeley P., Chambon R. et Latapie E. (1996). Evaluation du coût du paludisme pour les entreprises: enquête à la Cameroon Development Corporation. Rapport final a l'attention de l'entreprise. *Doc Tech N° 947/OCEAC/ORS.* p. 46.

39. Majori G., Sabatinelli G. et Coluzzi M. (1987). Efficacy of permethrin impregnated curtains for malaria vector control. *Medical veterinary Entomology*, 1,185-192.
40. Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M. S., Darriet F., Bergé J. B., Devonshire A. L., Guillet P., Pasteur N. et Pauron D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *An. gambiae* ss. *Insect Molecular Biology*, 7 (2), 179-184.
41. Mouchet J. et Guillet P. (1985). The motivating factors for community participation in vector control. In 4th Conference on Perception and management of pests and pesticides, Westview Press B.U. (ed). Chiang Mai, Thailand: 109-116.
42. Mouchet J., Robert V., Carnevale P., Ravaonjanahary C., Coosemans M., Fontenille D. et Lochouart L. (1991). Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale : place et limite de la lutte antivectorielle. *Cahiers Santé*, 1 : 277-288.
43. Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Fontenille D., Ravaonjanahary C., Richard A. et Robert V. (1993). Typology du paludisme en Afrique. *Cahiers santé* 3 (4) : 220-238.
44. Mouchet J., Elliot R., Gariou J., Voelcked J. et Varrieras J. (1960). La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wied. et les problèmes d'hygiène urbaine au Cameroun. *Méd. Trop.*, 20 :447-456.
45. Mouchet J. et Hamon J. (1963). Les problèmes techniques de l'éradication du paludisme en Afrique. *Cah ORSTOM, Sér Ent Méd*, 33, 39-48.
46. N'guessan R., Darriet F., Guillet P., Carnevale P., Traoré-Lamizana M., Corbel V., Koffi A. A. et Chandre F. (2003). Resistance to carbosulfan in *An. gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 1-7.
47. OMS. (1998). Faire Reculer le Paludisme .[http:// www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int)
48. Oppenoorth F. J. (1985). Biochemistry and physiology of resistance. In: G.A Kerkut et LI Gilbert, editors, Comprehensive Insect Physiology. *Biochemistry and Pharmacology*. vol. 12 Oxford : Pergamon pp. 731-773.
49. Petrarca V., Vercruyssen J. et Coluzzi M. (1987). Observations on the species of the *An. gambiae* complex in the Senegal River Basin. *Med. Veter. Entomol.*, 1: 303-312.

50. Petrarca V., Petrangeli G., Rossi P. et Sabatinelli G. (1996). Antimalarial campaign program in Ouagadougou (Burkina Faso): The *An. gambiae* complex in the city of Ouagadougou and surrounding villages. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita*, 22(1) : 189-191
51. Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J., et Collins F.H. (2000). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *An. gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology* 9 (5) : 491-497.
52. Robert V. (1989). La transmission du paludisme humain: la zone des savanes d'Afrique de l'ouest. Thèse, Université de Paris 6 325p.
53. Rodhain F. et Perez C. (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, éditeur Maloine s. a. Paris, France 458p.
54. Scott J. A., Brogdon W. G., Collins F. H. (1993). Identification of single specimens of *An. gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 520-529.
55. Soderland D. M. et Bloomquist J. R. (1990). Molecular mechanism of insecticide resistance in Arthropods. New York: Chapman and Hall, pp.58-96.
56. Taylor C., Touré Y. T., Carnahan J., Norris D. E., Dolo G., Traoré S. F., Edillo F. E. et Lanzaro G. C. (2001). Gene flow among populations of the malaria vector, *An. gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* 157: 743-759.
57. Touré Y. T., Petrarca V., Traoré S. F., Coulibaly A., Maiga H. M., Sankaré O., Sow M., Di Deco M. A. et Coluzzi M. (1994). Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *An. gambiae* ss. str. In Mali, West Africa. *Genetica*. 94: 213-223.
58. Touré Y. T., Petrarca V., Traoré S. F., Coulibaly A., Maiga H. M., Sankaré O., Sow M., Di Deco M. A., Coluzzi M. (1998). The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *An. gambiae* complex in Mali, west Africa. *Parassitologia*. 40: 477-511.
59. Trigg P. I., Kondrachine A. V. (1998). The current global malaria situation, p. 11-22. In Irwin W. Sherman (ed), *Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. ASM Press, Whanshigton DC.

60. Weill M., Chandre F., Brengues C., Manguin C., Akogbeto M., Pasteur N., Guillet P., Raymond M. (2000). The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *An. gambiae* ss through introgression. *Insect Mol Biol.* 9: 415-455.
61. Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M. et Raymond M. (2004). The unique mutation in *ace.1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol.* 13(1):1-7
62. Weill, M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P. et Raymond M. (2003). Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature (Lond).* 423: 136-137.
63. White G. B. (1985). *An. bwambae* sp. N. A malaria vector in the Semliki Vallez, Uganda and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex (*Diptera: Culicidae*). *System. Entomol*, 10: 501-522.
64. WHO. (1984). Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of vectors. Mimeogr. doc. TDR/BCV/SWG/84.3 33pp.
65. WHO. (1995). Vector control for malaria and other vectors-born diseases. Technical Report Series, 857: 91p.
66. WHO. (1998). Comité d'experts du paludisme. Vingtième rapport. [http:// www. Mosquito. who.int / docs /ecr 20 fr.htm](http://www.Mosquito.who.int/docs/ecr20fr.htm).
67. WHO. (2000). Severe *P. falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene*, 94, suppl 1,90p
68. WHO. (2003). Africa malaria report. [http:// www.who.int/ amd 2003/amr 2003.htm](http://www.who.int/amr2003/amr2003.htm)
69. Zaim M., Aitio A. et Nakashima N. (2000). Safety of pyrethroid treated mosquito nets. *Med. Vet. Entomol*, 2000, 14, 1-5.

ANNEXES

Annexe 1 : PCR diagnostic des espèces d'*An. gambiae* s.l

PCR diagnostique *An. gambiae* s.l.

LIN2003

Polymorphisme dans l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Elle distingue en Afrique de l'Ouest: *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*

Ref: **Scott JA**, Brogdon W & Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1993, 49(4):520-9.

Amorces

UN GTCTGCCGGCTTCCTCGATGT
 AG CTGGTTTGGTCGGGCACGTTT
 AA AAGTGTCCCTCTCCATCCTA
 AM GTGACCAACCCACTCCCTTGA

Conditions PCR

Avec la **Taq Quiagen** (Cat. N 201207), pour un volume final de **25 µl** par réaction

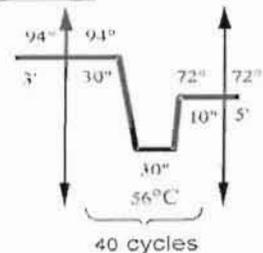
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

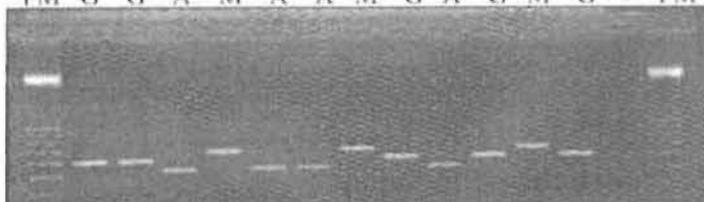
3' [30", 30", 10"]_{anc} 5' [2 56°C

Taille attendue

G : *An. gambiae* : 390 bp,
 A : *An. arabiensis* : 315 bp
 Δ : *An. melas* : 464 bp



PM G G A M A A M G A G M G - PM



Annexe 2 : Diagnostic des formes moléculaires M et S

Formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*

LIN 2003

Polymorphisme d'un segment de l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Réf: Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I & Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 2001, 10(1):19-23.

Amorces

R3 : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R5 : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B/S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
MgCl 25 mM	1 mM	1.0 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer R3 (10 µM)	7.5 pmoles	0.75 µl
Primer R5 (10 µM)	7.5 pmoles	0.75 µl
Primer Mop int (10 µM)	15 pmoles	1.5 µl
Primer B/S int (10 µM)	15 pmoles	1.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		14.45 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

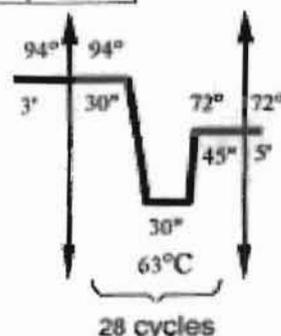
3' [30°, 30°, 45°]₂₈ 5' @ 63°C

Taille attendue

R3/R5 : ~1300 bp

M : 727 bp

S : ~475 bp



Annexe 3 : Diagnostic de la mutation *kdr*

(LIN, 2003)

Polymorphisme dans un gène codant pour un canal à Na, associé à la résistance au DDT et aux pyréthrinoides.

Kdr : phénotype « Knockdown resistance »

Réf: Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N & Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998, 7(2):179-84.

Amorces

D1 ATAGATTCCCCGACCATG
 D2 AGACAAGGATGATGAACC
 D3 AATTTGCATTACTTACGACA
 D4 CTGTAGTGATAGGAAATTTA

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer D1 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D2 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D3 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Primer D4 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		14.75 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

Taille attendue

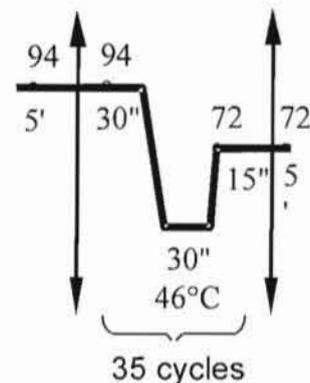
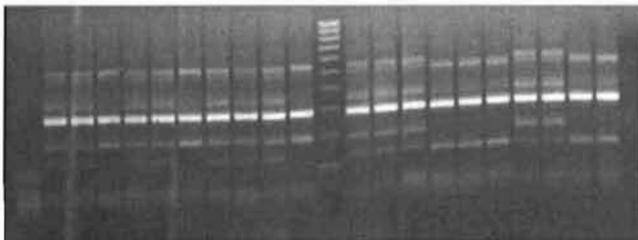
D1/D2 : 293 bp

D1/D3 : 195 bp

D2/D4 : 137 bp

Résistant

Sensible



Annexe 4 : Diagnostic de la mutation *ace.1* chez *Anopheles*

Mutation Ace 1 chez *Anopheles*

Isa et Alphonsine, juin 2003

Polymorphisme dans le gène *ace-1* qui code pour l'acétylcholine estérase Ache1.

La mutation se situe au niveau de l'AA 119, qui est une Gly chez les susceptibles et une Ser chez les résistants.

Réf: Weill, M. et al. (2003) Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423 (6936), 136-137

Amorces
Ex3AGdir GATCGTGGACACCGTGTTCG
Ex3AGrev AGGATGGCCCGCTGGAACAG

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer Ex3AGdir (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Primer Ex3AGrev (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

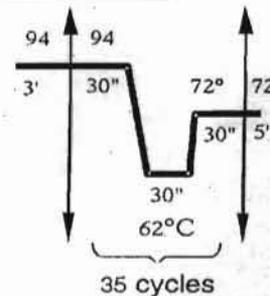
Amplification :

3' [30", 30", 30"]_{35c} 5' @ 62°C

Taille attendue

Ex3AG : 541 bp

Vérifier 5µl de produit de PCR sur gel d'agarose 1.5%



Digestion enzymatique

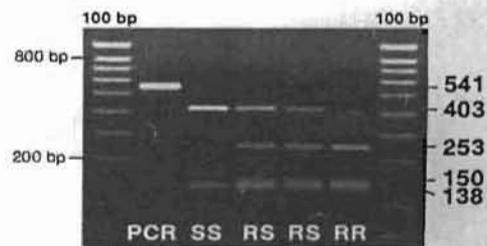
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	1 X	2.5 µl
Alu I (5 U/µl)	2.5 U	0.5 µl
ddH ₂ O		14.0 µl
Produit PCR		8.0 µl

Incuber à 37°C pendant 3 heures, voire toute la nuit.

Vérifier la réaction en faisant migrer 10µl de la digestion sur un gel d'agarose 2%.

Tailles attendues

Génotype	SS	RR
taille	403 bp	253 bp
	138 bp	138 bp



***Kdr* and *ace.1* genes distribution within *Anopheles gambiae* population complex in Western Burkina Faso**

Summary

From August 2006 to January 2007, we have undertaken an entomological survey in 13 villages in the Western Burkina Faso. The objective of this study was to re-evaluate the frequency of *kdr* gene and to investigate the presence of *ace.1* mutation in *Anopheles gambiae* population. The results showed an important increase of *kdr* gene frequency within the molecular M form of *An. gambiae* population. Moreover we have observed a greater geographical dispersion of this molecular form compared to the previous results reported in the same area in 2000. Conversely we had no difference of the *kdr* gene frequency within the molecular S form.

The *ace.1* gene was observed for the first time at relatively high prevalence in the Western part of Burkina Faso. This gene was observed mostly in mosquito of the S molecular form. The *ace.1* gene was observed in only five study sites in the molecular M form. The *ace.1* gene was observed in *An. arabiensis* in one site (Diébougou). Our results suggest that *ace.1* frequency may progress rapidly within *An. gambiae* population following high selective pressure caused by insecticide such as organophosphate and carbamate used for agriculture purpose. This issue can be investigated by the mean of bioassay tests.

Keywords : insecticide resistance genes, *ace.1.*, *kdr*, *Anopheles gambiae*, cotton culture, Burkina Faso