

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO**

INSTITUT DU DEVELOPEMENT RURAL



N° d'ordre.....

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

(DOCTORAT UNIQUE)

*Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques
Spécialité: Entomologie médicale*

Par

MAMAI Wadaka

**Stratégies de survie en saison sèche chez les vecteurs majeurs du paludisme
au Burkina Faso: physiologie, morphologie, comportement et métabolisme**

Soutenue publiquement le 06 Mars 2014 devant le jury composé de:

Président : - Pr. Adrien Marie Gaston BELEM, Professeur Titulaire, UPB

Membres : - Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO, Professeur Titulaire, UPB

- Pr. Roch Kounbobr. DABIRE, Directeur de Recherche, IRSS/CNRST

- Pr. Philippe SOLANO, Directeur de Recherche, IRD/CIRDES

- Dr. Karine MOULINE, Chargée de Recherche, IRD/IRSS

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé grâce au financement ANR «Agence Nationale de la Recherche» N° ANR-08 – MIEN – 006 à Frédéric SIMARD. Il a été réalisé dans un cadre institutionnel, matériel et humain que m'a offert l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à travers la bourse de soutien de thèse BSTD/DSF et le soutien additionnel de l'UMR MIVEGEC, l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)/Centre Muraz de Bobo-Dioulasso et l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB). Ces structures sont regroupées à Bobo-Dioulasso au sein du Laboratoire Mixte International (LAMIVECT).

Je souhaiterais sincèrement remercier toutes les personnes qui m'ont appuyé au cours de ces années et sans lesquelles cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. J'ai eu la grâce et le privilège d'être encadré par un certain nombre de scientifiques sur plusieurs sites, Instituts et Universités, une chance que beaucoup d'étudiants souhaiteraient avoir.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au **Pr. Frédéric Simard** qui a dirigé cette thèse d'une main de maître. Merci pour m'avoir donné l'occasion de faire cette thèse. Plus qu'un simple encadreur, vous avez été un père pour moi, me supportant et me suivant avec attention tout au long de cette thèse (et même avant). Merci pour les conseils méthodologiques, les remarques pertinentes et propositions nouvelles qui ont grandement contribué à ma progression dans la réalisation des expériences mais aussi dans la rédaction de ce rapport. Votre expérience, votre encadrement sans faille, votre disponibilité et votre enthousiasme ont été un moteur essentiel de mon travail ; je vous suis reconnaissant pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces années passées à travailler ensemble. Votre simplicité, votre proximité et votre rigueur scientifique ont fondé des bases solides favorisant toujours le dialogue. Vous resterez à jamais un modèle pour moi. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je remercie très sincèrement le **Pr. Roch Kounbobr Dabiré** pour son intérêt pour ce travail et pour avoir accepté d'en être le co-directeur. Vous avez guidé mes pas depuis mon cycle de Master (MIE). Et malgré vos lourdes et multiples responsabilités, vous avez été toujours

présent et prêt dans les moments difficiles. Merci pour votre compréhension et votre soutien sans faille.

Mes sincères remerciements au **Pr. Georges Anicet Ouedraogo**, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Directeur de cette thèse. Votre écoute, votre compréhension, votre disponibilité et vos qualités humaines ont été d'un apport inestimable. Je vous suis reconnaissant pour l'intérêt que vous avez accordé à ce travail.

Je remercie sincèrement le **Dr. Karine Mouline** pour son encadrement scientifique. Avec enthousiasme, disponibilité, efficacité et sympathie, vous m'avez encadré pendant ces années de recherche. Sur le terrain, sur la paillasse comme dans tous les domaines, vous avez pris une part prépondérante dans ma formation de jeune chercheur et ceci depuis mon cycle de Master (MIE) que vous avez co-encadré. Vous m'avez donné l'envie d'aller plus loin et je vous suis très reconnaissant. Merci de la confiance que vous m'avez accordée.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au **Pr. Jean-Bosco Ouedraogo**, Directeur Régional de l'IRSS pour avoir accepté m'accueillir au sein de cette institution et pour tout le soutien multiforme que vous m'avez apporté à maintes reprises durant tout ce parcours. Merci pour votre confiance.

Je remercie les représentants de l'IRD au Burkina Faso, Jean Pierre Guingant et Jean Marc Leblanc qui m'ont accueilli et soutenu ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements aux **Pr. Antoine Sanon, Pr. Philippe Solano, Dr. Thierry Baldet et Pr. Carlo Constantini** qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Merci pour vos remarques constructives.

J'exprime ma gratitude au président du jury, **Pr. Adrien Marie Gaston Belem**, aux membres du jury, **Pr. Georges Anicet Ouedraogo, Pr. Philippe Solano, Pr. Roch Dabiré et Dr. Karine Mouline**. Je vous remercie d'avoir accepté juger mon travail. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury.

Je remercie le **Pr. Robert T. Guiguemdé**, ex-Chef de l'Unité de Recherche «Paludisme et Maladies Tropicales Négligées» pour les facilités dont j'ai bénéficiées au sein de l'unité. Veuillez accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude. Qu'il me soit permis ici d'adresser ma gratitude aux chercheurs de l'IRSS/Centre Muraz ou en accueil dans cet institut pour les conseils judicieux et les nombreuses discussions scientifiques stimulantes et enrichissantes qui m'ont permis d'avancer. Je pense particulièrement aux Docteurs: **Abdoulaye Diabaté, Léa Paré/Toe, Thierry Lefèvre, Anna Cohuet, Florence Fournet, Serges Yerbanga, Tarnakda Zékiba, Adama Toe, Cyrille Ndo, et Daniel Couret.**

Je remercie tous les autres membres de l'IRSS/Centre Muraz de Bobo-Dioulasso (techniciens, personnel administratif, étudiants, stagiaires) pour ces années passées en votre compagnie. Je me suis senti avec vous comme au sein de ma famille. Pour l'hospitalité, la bonne humeur et le soutien multiforme, je remercie **Nikiéma Aboubakar, Hervé Somda, Pascal Yéyé, Karim Ouédraogo, Séverin Somé Baudoin Dabiré, Souleymane Sanou, Ali Ouari, Hyacinthe Guel, Séni Ilboudo, Raymond Hien, Jean Bazié, Ibrahim Diabaté, Arzouma Diasso, Zoungrana Sougrinoma, Fulgence Da, Abdourasmane Kabré, Ali Ouédraogo, Abdoulaye Ouattara, Bienvenue Yaméogo, François De Salle Hien, Hamidou Maiga, Abdoulaye Niang, Patrick Epopa, Frédéric Da Dari, Ibrahim Sangaré, Ollo Da, Yves Compaoré, Robert Kossivi Ouédraogo, Franck Yao, Fabrice Somé, Nadine Coulibaly, Hyacinthe Kobié Toé, Yacouba Cissao, Séverin Somda, Charles Dakolé, Adélaïde Tiao, Yollande, Mme Kone, les Dr. Simon P. Sawadogo, Moussa Namountougou, Olivier Roux, Amélie Vantau,** sans oublier les secrétaires **Diabaté Maimouna, Mme Ouedraogo, Mme Traoré et Mme Diallo.** Ce souvenir restera gravé dans ma mémoire tout au long de ma vie. Je vous dis: *anitchié!*

Un énorme merci au **Pr. David Renault** pour les deux stages que j'ai effectués dans votre laboratoire et sans quoi cette thèse aurait été beaucoup plus difficile. C'est à vous que je dois mes connaissances en métabolomique. Je garde un excellent souvenir de mes deux voyages à Rennes. Merci pour votre extrême gentillesse et disponibilité de chaque instant. Je n'oublierai pas non plus de remercier tous les membres de "l'équipe PAYSACLIM de l'UMR 6553 ECOBIO", Université de Rennes 1 (deuxième famille d'adoption après «l'équipe BEES»). Les moments partagés resteront parmi les meilleurs passés au laboratoire. Merci à **Vanessa Larvor** pour les analyses de GC-MS, **Dr. Hervé Collinet, Raphael Bical, Jean Frédéric,**

Adrien, Lisa Grégoire, Mathieu Laparie, Xavier Bodi, Hugo, Maxime Dahirel, Sarah Ben, Samirah Kodayarhi pour leur convivialité. Un merci spécial à *Kévin Hidalgo* pour ton amitié, les discussions innombrables en statistiques et pour toutes les manipulations que nous avons faites ensemble. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi.

Je remercie *Dr. Catherine Blais* pour son intérêt à notre travail. Merci pour les discussions, les critiques constructives, les conseils et votre disponibilité.

J'exprime mes plus sincères remerciements au *Pr. Didier Fontenille*, Directeur de l'UMR MIVEGEC, qui a toujours su apporter son soutien au moment indiqué. Merci pour tous vos conseils et vos encouragements. Grand merci à tous ceux qui ont rendu mes deux séjours Montpelliérains agréables et inoubliables. Pour leur accueil, soutien au labo et complicité, je remercie les *Dr. Jean Pierre Dujardin, Sylvie Cornélie, Vincent Robert, Fabrice Chandre et Cécile Brengues, Gilbert Le Goff, Philippe Bousses, Stephane Duchon, Marie Rossignol, Jorian Prud'homme, Majoline Tchioffo, Anne Boissière, Alexandra Marie, Lou Brossette, Valérie Delplanque, Francine Martin.*

Je voudrais remercier ici tous mes enseignants de Biochimie de l'Université de Yaoundé 1 et en particulier le Chef de département le *Pr. Paul F. Moundipa* qui a initié mes premiers pas dans la recherche, m'a toujours fait confiance et soutenu tout ce que j'entreprends.

Un travail de thèse c'est aussi tout ce qui se passe hors de la paillasse et hors du laboratoire. Je remercie les frères et sœurs de l'Eglise de l'Alliance Chrétienne, particulièrement les *Rev. Hema Bammiki et Job Dao*, ainsi que ceux de la mission Evangélique et son illustre pasteur et père *Rev. Gervais Ndzana* et sa famille. Merci pour le soutien moral et spirituel que vous m'avez apporté. Je tiens à remercier très chaleureusement, *Martial Nitcheu* (mon confident et frère) et *Charlotte Somé*. Vous avez été plus qu'une famille pour moi. Dans les bons comme dans les moments difficiles et de doute, vous avez toujours été présents pour me soutenir. Pour tous les très bons moments passés, autour d'un café, ou autres riz gras, bissap, veillées nocturnes, je remercie mes amis *Zida Adama, Salou Ernest, Idrissa*. Je doute qu'un travail de thèse puisse se dérouler dans une ambiance plus sympathique que celle que vous avez su créer.

Pour leur soutien et support inconditionnels, je remercie toute ma famille, en particulier mes parents pour leur amour et parce que ce n'est pas facile d'expliquer à ses parents à quoi ça sert d'étudier des moustiques. A mon grand frère **Kouli** pour m'avoir tout donné et supporté pendant toutes ces années d'études et permis d'arriver jusqu'en thèse. Je souhaite être capable de donner la même chose aux autres pour en faire des esprits libres. Merci pour tes sacrifices et ta confiance en moi.

Un merci spécial à mon épouse, **Thérèse Ngah** pour son amour formidable et sa patience infinie. Tu as supporté mon absence et tout ce que l'éloignement entraîne pour une famille. Tu n'as jamais douté et m'a encouragé à aller jusqu'au bout. Merci pour tout.

Je remercie tous mes amis du Cameroun qui m'ont soutenu de loin, et qui demandent sans cesse : «quand reviendras-tu ?» A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ce travail et dont les noms ne figurent pas ici, soyez rassurés de ma profonde gratitude.

**A l'Eternel Dieu, le Père Tout Puissant, pour ta grâce et ta miséricorde infinies,
Tu m'a accordé la vie et de voir la manifestation de la force de ton Bras.
En toi j'ai mis ma confiance, je serai toujours dans la gloire de ton Nom**

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	i
Tables des matières.....	1
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des annexes.....	8
Abréviations.....	9
Publications, posters et communications orales.....	10
Résumé.....	12
Abstract.....	13
INTRODUCTION GENERALE.....	14
Introduction.....	15
Objectifs.....	16
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
1.1) Paludisme et bioécologie d'<i>Anopheles gambiae</i> s.l.	20
1.1.1) Bref aperçu sur le paludisme et le cycle du parasite.....	21
1.1.2) La lutte contre le paludisme.....	22
1.1.3) Les anophèles	23
1.1.4) Le complexe <i>An. gambiae</i> s.l.....	25
1.2) Facteurs de stress et adaptation des insectes à leur milieu.....	28
1.2.1) La diapause.....	29
1.2.2) La quiescence.....	31
1.2.3) Migration	31
1.2.4) Réponses phénotypiques apportées par les insectes aux contraintes..... environnementales.....	32
1.2.5) Survie des anophèles pendant la saison sèche	34

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES	35
1) Cadre de l'étude	36
1.1) Le Burkina Faso	37
1.2) Sites d'étude	37
2) Méthodologie	38
2.1) Approche de terrain: étude en conditions naturelles	38
2.1.1) Collecte des moustiques sur le terrain	39
2.1.2) Mesure des paramètres environnementaux	41
2.1.3) Détermination des stades de développement ovarien et présence/absence de graisse sous-cuticulaire chez les femelles	41
2.1.4) Détermination du statut d'insémination des femelles	43
2.1.5) Identification moléculaire des espèces	43
2.1.6) Dissection des ailes et morphométrie géométrique	43
2.1.7) Dosage des réserves nutritionnelles	44
2.2) Approche expérimentale: étude en conditions contrôlées à partir de colonies d'insectarium	46
2.2.1) Protocole expérimental	46
2.2.2) Analyse métabolomique	48
2.2.3) Analyse des hormones ecdystéroïdes	49
2.2.4) Analyse morphologique des spiracles par microscopie électronique à balayage (MEB)	50
2.3) Approche en conditions semi-naturelles: études <i>in situ</i> de la dynamique des populations d'anophèles dans une serre grillagée	51
2.3.1) Construction et aménagement de la serre	51
2.3.2) Suivi actif des populations d'anopheles	52
2.4) Analyses statistiques des données	53
2.5) Synthèse des activités réalisées au cours de cette thèse	53

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS..... 55

PARTIE 1: Physiologie et traits morphométriques chez les populations naturelles d'*An. gambiae* s.l. au début de la saison sèche..... 56

1.1) Introduction	56
1.2) Résultats	57
1.2.1) Paramètres climatiques	57
1.2.2) Recherche des symptômes de stratégies de survie dans les populations naturelles adultes.....	57
1.2.3) Effectifs et composition spécifique des populations naturelles.....	59
1.2.4) Effet des saisons sur le développement ovarien et l'accumulation des graisses sous-cuticulaires	60
1.2.5) Morphométrie géométrique des ailes.....	64
1.2.6) Variations des réserves énergétiques accumulées à l'émergence.....	67
1.3) Discussion	69
1.4) Conclusion partielle.....	73

PARTIE 2: Métabolomique et variations du taux d'hormones ecdystéroïdes chez *An. gambiae* s.l. exposés aux conditions stressantes de la saison sèche 74

2.1) Introduction.....	74
2.2) Résultats.....	75
2.2.1) Analyse des métabolites par GC-MS chez les mâles et les femelles d' <i>An. gambiae</i> s.l.	75
2.2.2) Analyse des ecdystéroïdes.....	78
2.3) Discussion	79
2.4) Conclusion partielle.....	84

PARTIE 3: Variations morphologiques des spiracles mésothoraciques d'*An.gambiae* s.l. exposés aux conditions stressantes de la saison sèche..... 85

3.1) Introduction	85
3.2) Résultats	86
3.3) Discussion	87
3.4) Conclusion partielle.....	89

PARTIE 4: Variation temporelle et persistance en saison sèche des populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. dans une serre grillagée, la malariasphère	90
4.1) Introduction.....	90
4.2) Résultats	90
4.2.1) Paramètres environnementaux, effectifs et réalisation du cycle de développement des anophèles dans la serre grillagée	90
4.2.2) Suivi temporel des populations adultes	92
4.2.3) Variation des fréquences relatives et présence des populations pré-imaginale à l'intérieur de la malariasphère.....	93
4.3) Discussion	94
4.4) Conclusion partielle.....	96
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	98
Conclusion générale	100
Perspectives.....	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
Annexes.....	121

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle de développement du Plasmodium (Mouchet et al. 2004).....	21
Figure 2: Cycle biologique de l’anophèle.....	23
Figure 3: Le moustique anophèle mâle et femelle	27
Figure 4: Distribution géographique en Afrique d’ <i>An. gambiae</i> , <i>An. coluzzii</i> et <i>An. arabiensis</i> et illustration de leurs gîtes larvaires préférentiels.....	27
Figure 5: Localisation géographique des sites d’étude.....	38
Figure 6: Collecte des larves d’ <i>An. gambiae</i> s.l. dans les gîtes larvaires (A) et transplantation dans un gîte naturel encore en eau (B).....	40
Figure 7: Stades de Christophers des ovocytes. Les chiffres indiquent les différents stades de développement (Detinova, 1962).....	42
Figure 8: Phénotypes d’accumulation de graisse sous-cuticulaire chez <i>An. gambiae</i> s.l. présence (A), absence (B) et gouttelettes lipidiques (C).....	42
Figure 9: Aile d’ <i>An. gambiae</i> s.l et position des points repères ou «landmarks» sélectionnés.....	44
Figure 10: Enceinte climatique permettant l’élevage des moustiques en conditions contrôlées.....	47
Figure 11: Conditions environnementales de température (rouge), d’humidité relative (vert) et de luminosité reproduites dans les chambres climatiques et mimant les conditions de saison des pluies (SP) et de saison sèche (SS) à Bama.....	48
Figure 12: Photographies du système semi-naturel (malariasphere): structure externe (A), case en banco (B), gîte larvaire (C), gîtes de repos (C,D,H), végétation (de B à I), abri pour le veau et marqueurs d’essaimage (G), station météorologique et dispositif d’élevage (I).....	51
Figure 13: Evolution des paramètres environnementaux enregistrés sur le terrain au cours des années 2009, 2010, 2011(A= température, B= humidité relative) dans la localité de Bama.....	59
Figure 14: Evolution de stade de maturation des oocystes des femelles d’ <i>An. gambiae</i> s.l. élevées dans les conditions de début de la saison sèche montrant des différences de niveau de discordance gonotrophique entre <i>An. coluzzii</i> , <i>An. gambiae</i> et <i>An. arabiensis</i>	61
Figure 15: Stockage des graisses chez les femelles d’ <i>An. gambiae</i> s.l. élevées dans les conditions de début de la saison sèche mettant en évidence des différences d’allocation des ressources nutritives entre <i>An. coluzzii</i> , <i>An. gambiae</i> et <i>An. arabiensis</i>	63

- Figure 16:** Variation des tailles centroïdes des ailes (exprimées en pixels) d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G) et *An. arabiensis* (Ar) collectés en saison des pluies (SP) et début de saison sèche (SS). Médiane et dispersion de la variable de taille «tailles centroïdes».....66
- Figure 17:** Superposition de la forme des ailes en SS et SP chez les différentes espèces étudiées: *An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G) et *An. arabiensis* (Ar).....67
- Figure 18:** Teneurs en réserves énergétiques chez les femelles d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* collectées à l'émergence en début (juin) et milieu (août) de saison des pluies et au début de la saison sèche (novembre).....69
- Figure 19:** Analyses Factorielles Discriminantes (gauche) et cercles de corrélation des métabolites (droite) chez les femelles d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G), et d'*An. arabiensis* (Ar) collectées 1h (1) et 24h (24) après émergence et exposées aux conditions de saison sèche (SS, en rouge) et de saison des pluies (SP, en bleu). $N = 10$ replicats dans chaque cas.....77
- Figure 20:** Analyses Factorielles Discriminantes (gauche) et cercles de corrélation des métabolites (droite) chez les mâles d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G), et d'*An. arabiensis* (Ar) collectés 1h (1) et 24h (24) après émergence et exposés aux conditions de saison sèche (SS, en rouge) et de saison des pluies (SP, en bleu). $N = 10$ replicats de 5 à 6 moustiques dans chaque cas.....78
- Figure 21:** Teneur en ecdystéroïdes (20E) chez les femelles (A) et mâles (B et C) d'*An. gambiae* s.l élevés en conditions SS et SP et collectés 1h et 24h après émergence. La présence de deux lettres différentes au dessus des barres indique une différence statistiquement significative (ANOVA suivie du test *post-hoc* de Tukey, $p < 0.05$).....79
- Figure 22:** Vue au microscope électronique à balayage (MEB) des spiracles chez les femelles d'*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* élevées dans les conditions de saison des pluies (à gauche) et de saison sèche (à droite).....87
- Figure 23:** Micrographes des trichomes aux abords des spiracles (grossissement x500 et x1000) d'*An. gambiae* s.l.....87
- Figure 24:** Evolution des moyennes mensuelles de température (A) et d'humidité relative (B) à l'extérieur de la serre (bleu), à l'intérieur de la serre (violet) et à l'intérieur de la case en banco (rouge). Les barres verticales représentent la distribution pluviométrie extérieure.....92
- Figure 25:** Variation saisonnière des populations adultes d'*An. gambiae* s.l dans les gîtes de repos dans la serre grillagée. Les rectangles noirs correspondent aux périodes de présence des moustiques adultes à l'intérieur de la serre tandis que le rectangle bleu, l'intervalle de temps des lâcher des moustiques dans la serre.....93
- Figure 26:** Présence des larves d'*An.gambiae* s.l. dans la serre grillagée et composition spécifique. Les rectangles gris correspondent aux périodes de présence des larves dans les gîtes larvaires et le rectangle bleu, l'intervalle de temps des lâchers des moustiques dans la serre.....94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Comparaison entre diapause et quiescence (d'après Hahn and Denlinger 2007).....	31
Tableau II: Synthèse des différentes activités et techniques en fonction des approches.....	53
Tableau III: Fréquences relatives (%) et effectifs des femelles d' <i>An. gambiae</i> s.l. dans les deux sites d'étude (2010-2012).....	60
Tableau IV: Probabilités associées au <i>prop.test</i> , comparant les effets de saison, localité et d'espèce sur le développement ovarien d' <i>An. coluzzii</i> (C), <i>An. gambiae</i> (G) et <i>An. arabiensis</i> (Ar); SS = saison sèche, SP = saison des pluies, * test significatif au seuil $p < 0,05$	62
Tableau V: Probabilités associées au <i>prop.test</i> , comparant les effets de la saison, de la localité et de l'espèce sur l'hypertrophie du corps gras (accumulation de graisse sous-cuticulaire) d' <i>An. coluzzii</i> (C), <i>An. gambiae</i> (G) et <i>An. arabiensis</i> (Ar); SS = saison sèche, SP = saison des pluies, * test significatif au seuil $p < 0,05$	64
Tableau VI: Probabilités comparant l'effet des saisons sur la taille des femelles d' <i>An. coluzzii</i> (C), <i>An. gambiae</i> (G) et <i>An. arabiensis</i> (Ar). SS = saison sèche, SP = saison des pluies, * = test significatif au seuil de $p < 0,05$	66
Tableau VIII: Métabolites identifiés par GC-MS chez <i>An. gambiae</i> s.l.....	75
Tableau VIII: Résultats de l'analyse de variance (MANOVA) réalisée chez les mâles et femelles des trois colonies d' <i>An. gambiae</i> s.l.....	76
Tableau IX: Effectifs des populations adultes des trois espèces introduites dans la serre.....	91

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Concentrations des métabolites chez les mâles et femelles d' <i>An. gambiae</i> , <i>An. coluzzii</i> et <i>An. arabiensis</i> collectés 1h et 24h après émergence et exposés aux conditions de saison sèche (rouge, SS) et de saison des pluies (bleu, SP).....	122
Annexe 2: Protocole de PCR SINE200 pour détecter les différentes espèces du complexe <i>An. gambiae</i> s.l. d'après Santolamazza et al. 2008.....	125
Annexe 3: Articles.....	127

ABBREVIATIONS

AFD = Analyse Factorielle Discriminante

ANR = Agence Nationale de Recherche

BSA = Bovin Sérum Albumine

CLIC = Collecting Landmarks for Identification and Characterization

COO = Collection of cOOrdinates

DO = Densité Optique

EIA = Enzyme Immuno Assay

GC-MS = Gaz Chromatography-Mass Spectrometry

HSP = Heat Shock Proteins

IRD = Institut de Recherche pour le Développement

IRSS = Institut de Recherche en Sciences de la Santé

LEA = Late Embryogenesis Abundant

MEB = Microscopie Electronique à Balayage

MOG = MORphometrica Geometrica

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

PCR = Polymerase Chain Reaction

SP = Saison des Pluies

SS = Saison Sèche

TCA = Tricarboxylique acide

PUBLICATIONS, POSTERS ET COMMUNICATIONS ORALES

Publications

Mouline K., **Mamai W.**, Agnew P., Tchonfienet M., Brengues C., Dabire KR., Robert V., Simard F. (2012) Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med. Vet. Entomol* 26: 447–454.

Gimonneau G., Brossette L., **Mamaï W.**, Dabiré KR., Simard F. (2014) Larval competition between *An. coluzzii* and *An. gambiae* in insectary and semi-field conditions in Burkina Faso. *Acta Tropica* 130: 155 - 161.

Mamai W., Mouline K., Blais C., Larvor V., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Simard F., Renault D. (2014) Metabolomic and ecdysteroid variation in *Anopheles gambiae* s.l mosquitoes exposed to the stressful conditions of the dry season in Burkina Faso, West Africa. *Physiological and Biochemical Zoology* (PBZ) (Accepté).

Mamai W., Mouline K., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Renault D., Simard F. (2014) Mesothoracic spiracles morphology in *Anopheles gambiae* s.l (Diptera) with particular reference to responses to dry season conditions in Burkina Faso (West Africa). *Parasites and Vectors* (en revision).

Hidalgo K*, Mouline K*, **Mamai W.**, Foucreau N., Renault H., Simard F., Renault D. Novel insights into the metabolic and biochemical underpinnings assisting dry season survival strategies of females of the *Anopheles gambiae* complex. *Journal of Insect Physiology* (soumis).

Mamai W., Mouline K., Couret D., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Lehmann T., Renault D., Simard F. Monitoring dry season persistence of *Anopheles gambiae* s.l. populations in a new contained semi-field system in Southwestern Burkina Faso, West Africa (à soumettre).

Communications orales

Mamai W. Mouline K. Larvor V. Dabiré KR, Renault D. Simard F. (2011). Dry season survival strategies in malaria vectors of Africa: approach, preliminary results and perspectives. 4th International Symposium on Environmental Physiology of Ectotherms and Plants, 18 – 22 Juillet 2011, Rennes, France.

Mamai W., Mouline K., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Blais C., Renault D., Simard F. (2013). Morphological, physiological and hormonal variations in *An. gambiae* s.l exposed to the stressful conditions of the dry season in Burkina Faso, West Africa. 6th International Congress of Society for Vector Ecology (SOVE), 22 – 27 Septembre 2013, La Quinta (Palm Springs), CA, USA.

Posters

Mamai W, Mouline K. Dabiré KR, Renault D. Simard F. (2011). Phenotypic responses to the stressful conditions of the dry season in *Anopheles gambiae s.l.* 2^e Assemblée Générale du MIVEGEC, 28, 29 Juillet 2011, Montpellier, France.

Mamai W, Mouline K. Dabiré KR, Renault D. Simard F. (2012). Morphological, physiological and hormonal variation in *An. gambiae s.l.* exposed to the stressful conditions of the dry season in Burkina Faso. 3^e Assemblée Générale du MIVEGEC, 27 Juillet 2012, Montpellier, France.

Mamai W., Mouline K., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Blais C., Renault D., Simard F. (2013). Morphological, physiological and hormonal variations in *An. gambiae s.l.* exposed to the stressful conditions of the dry season in Burkina Faso, West Africa. 6^e conférence pan-africaine sur le paludisme (MIM Malaria Conference), 06 – 11 Octobre 2013, Durban, Afrique du Sud.

Résumé

Dans les zones de savane soumises à l'alternance saison des pluies/saison sèche, comme au Burkina Faso, la transmission du paludisme est saisonnière et a lieu majoritairement pendant la saison des pluies. Trois espèces du complexe *An. gambiae* s.l. sont impliquées: *An. gambiae*, *An. coluzzii*, et *An. arabiensis*. La dynamique des populations adultes de ces vecteurs est fortement corrélée à la disponibilité de leurs gîtes de développement larvaire: abondantes en saison des pluies, les populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* disparaissent virtuellement peu de temps après l'assèchement de leurs gîtes de prédilection (gîtes temporaires). Elles réapparaissent ensuite en grand nombre dès le début de la saison des pluies suivante. Les populations d'*An. coluzzii*, qui colonisent des gîtes permanents d'origine anthropique (rizières notamment), se maintiennent en revanche tout au long de l'année à des densités fluctuantes au cours des saisons. Aujourd'hui encore, les stratégies développées par ces 3 espèces de moustiques pour survivre aux conditions arides de la saison sèche demeurent inconnues. Ainsi, nous avons adopté une approche comparative et transdisciplinaire à la recherche de «symptômes» physiologiques, morphologiques, comportementaux et métaboliques potentiellement indicateurs de la mise en place de mécanismes de survie chez des moustiques exposés aux conditions stressantes de la saison sèche sahélienne. Nos études ont été conduites en parallèle sur *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis*. Les moustiques ont été étudiés (i) dans leur environnement naturel, sur le terrain au Burkina Faso, (ii) dans une serre grillagée aménagée et exposée aux conditions climatiques locales, et (iii) de manière expérimentale au laboratoire. Sur le terrain, les adultes d'*An. coluzzii* nourris de sang et de sucre montrent, à la dissection, une augmentation significative du nombre de spécimens qui ne développent plus leurs ovaires. Ces individus en dissociation gonotrophique, accumulent en parallèle de grandes quantités de lipides. Par ailleurs, l'étude comparative des composés énergétiques disponibles chez les jeunes femelles adultes à l'émergence a démontré que les larves d'*An. coluzzii* accumulaient des réserves (protéiques et lipidiques notamment) pouvant être mobilisables pour la survie des adultes, par ailleurs de plus grande taille. L'analyse du métabolome des insectes élevés en conditions contrôlées dans des chambres climatiques où nous avons mimé les conditions environnementales de la saison des pluies et de la saison sèche a mis en lumière des ajustements métaboliques d'envergure. En particulier, on retrouve, chez les femelles seulement, une réduction de la teneur en métabolites intermédiaires du cycle de Krebs et de l'isoleucine, indicateurs d'une dépression métabolique mais aussi d'une dépression de la reproduction chez les 3 espèces en saison sèche. Les dosages des hormones ecdystéroïdes ne nous ont pas permis de mettre en évidence de rôle pour ces hormones dans la régulation des phénomènes observés chez les femelles. Cependant, nous avons détecté d'importantes quantités d'ecdystéroïdes chez les mâles, avec des variations en fonction des conditions environnementales chez *An. coluzzii*, qui pourraient suggérer un rôle régulateur indirect sur la fécondité des femelles, qui fluctue au cours des saisons. Une analyse par microscopie électronique à balayage de la cuticule des insectes âgés de 10 jours a permis de mettre en évidence l'existence de différences morphologiques, observables notamment au niveau des spiracles qui apparaissent clos et obstrués par de nombreux trichomes hypertrophiés chez *An. coluzzii* et *An. arabiensis* élevés dans les conditions de saison sèche. Chez *An. gambiae* par contre, les spiracles ne sont pas obstrués, même en conditions de faible hygrométrie. Dans la serre grillagée, en conditions semi-naturelles, nous avons pu obtenir que les populations d'anophèles introduites se maintiennent pendant la saison des pluies. Le suivi réalisé à un pas de temps fin nous a permis de mettre en évidence la disparition des différentes espèces d'anophèles, en accord avec les observations de terrain. *An. arabiensis* et *An. coluzzii* seules ont pu être retrouvées dans la serre, après la saison sèche, ce qui démontre leur capacité à survivre à cette saison. Bien que préliminaires, ces résultats corroborent ceux de la littérature et encouragent fortement la poursuite de telles approches.

Des différences importantes dans les stratégies et cinétiques d'acquisition, de stockage et d'utilisation des ressources ont été mises en évidence, aussi bien entre les 3 espèces jumelles que nous avons étudiées, qu'au sein de chaque espèce, en fonction des conditions environnementales. Ces résultats sont autant de pistes utilisables dans le but ultime d'améliorer le contrôle des populations de vecteurs en les rendant inaptes à survivre pendant la saison sèche.

Mots clés: Paludisme, Burkina Faso, vecteurs, *Anopheles gambiae* s.l., survie, saison sèche, physiologie, comportement, morphologie, métabolisme.

Abstract

In savannahs areas characterized by the occurrence of two contrasting environmental seasons (rainy and dry), as in Burkina Faso, malaria transmission is seasonal and occurs mainly during the rainy season. Three species of the *An. gambiae* s.l. complex are mainly involved: *An. gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis*. Adult mosquito population dynamics of these vectors follow the availability of water collections: being abundant during the rainy season, the populations of *An. gambiae* and *An. arabiensis* virtually disappear shortly after the drying up of their typical breeding sites (temporary water collections) to reappear in large numbers at the onset of the next rainy season. However, populations of *An. coluzzii*, which colonize anthropogenic permanent water bodies (like rice fields), remain throughout the year with densities fluctuating across the seasons. To date, it is not known how these three major malaria vectors survive the harsh dry-season conditions. We therefore used a comparative and transdisciplinary approach across the three species to explore physiological, morphological, behavioral and metabolic "symptoms", being potential indicators of survival mechanisms that are put in place in order to survive the stressful conditions of the Sahelian dry season. Mosquitoes were studied (i) in their natural environment, in the field in Burkina Faso, (ii) in a screened greenhouse exposed to local climatic conditions, and (iii) under controlled experimental laboratory conditions. In the field, after multiple blood meals and sugar feeding, females of *An. coluzzii*, showed significant increase in the number of specimens which do not develop their ovaries. In parallel, these individuals showing gonotrophic dissociation accumulate large amounts of lipids. Moreover, the comparative study of the energetic compounds available in adult females at emergence showed that larvae of *An. coluzzii* accumulated metabolic reserves, including proteins and lipids that can be mobilized for survival of adult mosquito, which we found to display larger body size. Metabolome analysis of insects reared in controlled climatic chambers reflecting environmental conditions recorded in the field during the rainy season and the dry season highlighted major metabolic adjustments. In particular, lower concentration of the Krebs cycle intermediates and isoleucine characterised older females of the three species reared under dry season conditions suggesting metabolic and reproductive depression. The ecdysteroids analysis did not allow us to demonstrate a role of these hormones in the regulation of the observed phenomena in females. However, higher amounts of ecdysteroids were detected in males, with seasonal variations in *An. coluzzii*, suggesting an indirect regulatory role on female fecundity, which fluctuates with the seasons. Scanning electron microscopy analysis of insect cuticle of 10 days old females highlighted the existence of morphological differences, particularly of the spiracles, that appear sealed by enlarged trichomes in *An. coluzzii* and *An. arabiensis* reared in the dry season conditions. In *An. gambiae* however, spiracles are not sealed, even under low humidity conditions. In the semi-field (greenhouse) conditions, we showed that the *Anopheles* mosquito populations introduced are maintained during the rainy season. Regular survey of larval and adult populations provided evidence of the disappearance of the different *Anopheles* species, in agreement with field observations. *An. arabiensis* and *An. coluzzii* only have been found in the greenhouse after the dry season, demonstrating their ability to survive through this season. Although preliminary, these results are consistent with the literature and strongly encourage the continuation of such approaches.

Hence, significant differences in strategies and kinetics of resources acquisition, allocation and use have been identified, both between the three sibling species studied, and within each species, depending on environmental conditions. These results represent potential targets that can be used for the ultimate goal of improving mosquito population's control, making the vectors unfit for survival during the dry season.

Key words: Malaria, Burkina Faso, vectors, *Anopheles gambiae* s.l., survival, dry season, physiology, behavior, morphology, métabolism.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Bien que le nombre de cas et de décès déclarés dus au paludisme est en baisse, le paludisme demeure le problème de Santé Publique majeur en Afrique sub-saharienne, qui concentre plus de 90% des cas d'infection par *Plasmodium falciparum*, provoquant plus de six cent vingt sept mille (627 000) décès par an (WHO 2013). La morbidité et la mortalité occasionnées grèvent la santé socio-économique des pays les plus touchés. Le paludisme est ainsi souvent considéré à la fois comme une cause et comme une conséquence de la pauvreté et du sous-développement.

Une telle prévalence de la maladie en Afrique et les difficultés rencontrées pour endiguer ce fléau sur le continent s'expliquent en partie par l'extraordinaire efficacité du système vectoriel responsable de la transmission du parasite à l'homme (Fontenille et Simard 2004). Les moustiques appartenant au complexe *Anopheles gambiae* s.l., et notamment *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont les vecteurs majeurs à l'échelle du continent: très anthropophiles, ces moustiques sont capables de coloniser une large gamme d'environnements, suivant l'homme des zones arides en bordure du Sahara jusqu'au cœur de la forêt équatoriale (Simard et al. 2009). Dans les zones de savane d'Afrique de l'Ouest, *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* existent en sympatrie et assurent une transmission intense du paludisme pendant la saison des pluies. Dans ces régions, *An. coluzzii* et *An. gambiae*, dénommées autrefois formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*, sont aujourd'hui considérées comme de véritables espèces à part entière (Coetzee et al. 2013), à la fois génétiquement et écologiquement différenciées (della Torre et al. 2002, Lehmann and Diabaté 2008, White et al. 2010, White et al. 2011). *Anopheles gambiae*, supposée ancestrale, est répandue dans toute l'Afrique sub-Saharienne et se développe dans les petites collections d'eau temporaires dépendantes des précipitations (flaques, ornières, empreintes, etc...) où ses larves sont fréquemment retrouvées avec celles d'*An. arabiensis*. Ces deux espèces disparaissent en saison sèche, et réapparaissent en grand nombre dès les premières pluies de la saison suivante. Rien n'est connu sur les mécanismes qui permettent à ces populations de vecteurs de recoloniser de manière si soudaine et si efficace leur environnement dès que les conditions climatiques redeviennent favorables. En dépit de ces fluctuations extrêmes sur le plan démographique, la structure génétique de ces populations reste stable dans le temps (Simard et al. 2000). S'il est établi que les œufs des anophèles résistent mal à la dessiccation (Beier et al. 1990), certaines données anciennes suggèrent l'existence d'une «dormance» à

l'état adulte qui pourrait permettre le maintien, localement, de ces populations d'anophèles (Holstein 1954, Omer et Cloudsley-Thompson 1970). Ces données ont récemment été réactualisées par des expériences de marquage-lâcher-recapture réalisées au Mali, où une femelle anophèle d'*An. coluzzii* (forme moléculaire M) marquée en fin de saison des pluies a pu être capturée au début de la saison des pluies suivante, soit après une période d'estivation de 7 mois (Lehmann et al. 2010). Les mêmes auteurs ont également mesuré, pendant la saison des pluies, les densités anophéliennes dans des villages traités ou non aux pyréthrinoides pendant la saison sèche précédente. Seules les densités d'*An. coluzzii* sont affectées par ces traitements. Il existe ainsi un polymorphisme dans les stratégies de survie adoptées par les espèces du complexe *An. gambiae* s.l. pendant la saison sèche, avec les moustiques de l'espèce *An. coluzzii* qui persisteraient sur le terrain dans un état de vie ralentie appelée diapause (estivation), quand ceux d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* opteraient pour une migration/recolonisation en début de saison des pluies à partir des zones voisines plus favorables (Adamou et al. 2011). Dans ce contexte, une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques et comportementaux mis en jeu à l'approche de la saison sèche et des facteurs intrinsèques (régulation hormonale, métabolisme) et extrinsèques (stimuli environnementaux) qui en gouvernent l'expression permettra de mieux comprendre comment ces vecteurs se sont adaptés, et comment ils pourront continuer à s'adapter aux fluctuations de leur environnement. De telles données fourniront en outre la base scientifique innovante d'un contrôle des vecteurs d'autant plus efficace qu'il interviendrait à un moment où les populations de vecteurs sont les plus faibles et dans des conditions environnementales qui leur sont particulièrement défavorables.

Objectifs

Objectif général

L'**objectif général** de cette thèse est d'étudier par une approche comparative et transdisciplinaire les réponses comportementales, physiologiques, morphologiques et métaboliques chez 3 espèces de moustiques appartenant au complexe *An. gambiae* s.l. (*An. arabiensis*, *An. coluzzii*, *An. gambiae*) soumises aux conditions stressantes de la saison sèche sahélienne (fortes températures et faible hygrométrie).

Les **hypothèses de travail** sont les suivantes : *i)* les moustiques du complexe *An. gambiae* ont élaboré des stratégies évolutives leur permettant de survivre en condition sub-optimales de température et d'hygrométrie, *ii)* ces stratégies se manifestent par des particularités

physiologiques (ajustements métaboliques ou protéiques, allocation et utilisation des ressources, en particulier lipidiques, dépression de la reproduction), morphologiques (modifications de la structure des spiracles), ou comportementales (agrégation, utilisation de micro-habitats) qu'il est possible de mettre en évidence et *iii*) il existe des différences entre les espèces *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* dans les stratégies sélectionnées (quiescence, diapause, migration à longue distance, résistance à la dessiccation...).

Objectifs spécifiques

L'objectif général de notre étude sera atteint par la réalisation de trois objectifs spécifiques:

- 1) Comparer, entre espèces et d'une saison à l'autre, les paramètres physiologiques (teneurs en glycogène, sucres, lipides, protéines et métabolites) chez des moustiques prélevés sur le terrain et/ou élevés en conditions contrôlées (enceintes climatiques au laboratoire);
- 2) Mettre en évidence l'existence de symptômes physiologiques révélateurs de la mise en place de stratégies de survie chez *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* à l'approche de la saison sèche dans les savanes de l'Ouest du Burkina Faso (observation du statut gonotrophique et de la structure du corps gras des femelles);
- 3) Déterminer les rôles relatifs de facteurs exogènes (température, humidité relative, effet «crowding» *i.e* entassement des larves du à la diminution de l'eau dans les gîtes) et intrinsèques (régulation hormonale) dans l'expression de ces phénotypes en combinant des approches en conditions semi-naturelles (serre sur le terrain) et contrôlées (enceintes climatiques au laboratoire).

Cette thèse intègre 3 démarches méthodologiques principales. Les phénotypes sont recherchés et étudiés grâce à une combinaison d'approches descriptives, qualitatives et quantitatives conduites sur des moustiques prélevés sur le **terrain** et/ou élevés en conditions **semi-naturelles** (malariasphère) et au **laboratoire**, dans des enceintes climatiques. Les méthodes analytiques modernes de haute technologie maintenant disponibles, telles que la **métabolomique** par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la **microscopie électronique à balayage** (MEB), les **dosages immunoenzymatiques** (EIA), la **morphométrie géométrique** sont utilisées pendant cette étude. Ces différentes approches permettent d'appréhender de façon globale les ajustements physiologiques, morphologiques, comportementaux et biochimiques associés à la mise en place d'une stratégie d'adaptation aux conditions stressantes de la saison sèche.

Ce mémoire est constitué d'une introduction générale, suivie de trois chapitres et enfin une conclusion générale. La partie «**introduction**» et le premier chapitre «**revue bibliographique**», posent les bases de la réflexion, indispensable à la compréhension du problème étudié. Elle permet une analyse du problème et des concepts, présente les objectifs et insère l'étude dans une discipline scientifique. Elle contient une présentation du paludisme, des anophèles vecteurs et des stratégies d'adaptation chez les insectes. Le deuxième chapitre, «**matériel et méthodes**» situe le cadre de l'étude, présente la démarche méthodologique, les techniques et les outils de collecte des données. Le troisième chapitre présente les **résultats du travail** et les discute. Ce chapitre est structuré en 4 parties:

PARTIE 1: Physiologie et traits morphométriques chez les populations naturelles d'*An.gambiae* s.l. au début de la saison sèche.

PARTIE 2: Métabolomique et variations des concentrations d'hormones ecdystéroïdes chez *An.gambiae* s.l. exposés aux conditions stressantes de la saison sèche.

PARTIE 3: Variations morphologiques des spiracles mésothoraciques d'*An.gambiae* s.l. exposés aux conditions stressantes de la saison sèche.

PARTIE 4: Variation temporelle et persistance en saison sèche des populations d'*An.gambiae* s.l. dans une serre grillagée, la malariasphère.

Une conclusion générale et les perspectives boucleront ce travail.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1) Paludisme et bioécologie d'*Anopheles gambiae* s.l.

1.1.1) Bref aperçu sur le paludisme et le cycle du parasite

Le Paludisme (ou *malaria*) est une maladie endémique qui sévit de façon continue dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique, de l'Asie du sud et du sud-est et de l'Amérique du sud. Il constitue à l'échelon mondial une préoccupation majeure de Santé Publique: 102 pays y sont exposés et plus de 40% de la population mondiale, soit plus de deux milliards de personnes, vivent dans des régions à risque. L'Afrique est le continent qui paye le plus lourd tribut. Cliniquement, l'affection est caractérisée par des accès fébriles intermittents, par différents signes d'accompagnement non spécifiques, et par le risque de complications dont certaines sont mortelles. Cette parasitose implique trois acteurs: le parasite, le vecteur et l'homme qui sont en fait liés par le cycle de développement du parasite (Figure 1). Ce cycle comporte une phase chez le moustique et une autre chez l'homme.

Le parasite est un sporozoaire hématozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces animales mais seulement quatre de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (Rozendaal 1999). Une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi*, connue antérieurement chez le singe a été découverte récemment chez l'homme en Malaisie (Singh et al. 2004, Collins 2012). *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus répandue et est à l'origine des infections les plus graves (Breman et al. 2007).

L'homme, hôte intermédiaire est le réservoir du parasite.

Le vecteur est un moustique du genre *Anopheles*, seul capable de pouvoir transmettre les quatre espèces de *Plasmodium* responsables des paludismes humains. Lors de son repas sanguin, l'anophèle ingère les formes sexuées qui libèrent des gamètes mâles et femelles. Ces derniers se conjuguent, forment un ookinète qui se transforme dans la paroi de l'estomac en oocyste puis sporocyste. Le sporocyste éclate, libérant des milliers de sporozoïtes qui migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique anophèle femelle et seront injectés à un nouvel individu lors de la prochaine piqûre.

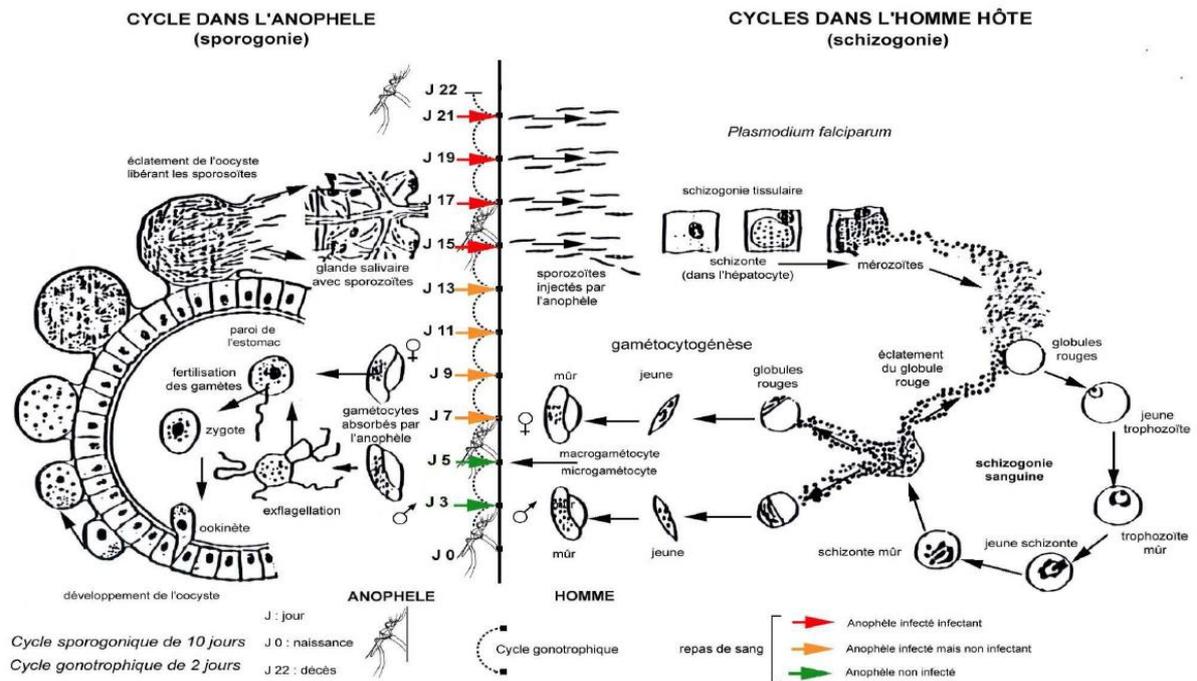


Figure 1: Cycle de développement du Plasmodium (Mouchet et al. 2004)

1.1.2) La lutte contre le paludisme

La lutte antipaludique a été définie comme l'ensemble des mesures destinées à supprimer, ou tout au moins à réduire la mortalité et la morbidité dues au paludisme (OMS 1974). Elle s'articule autour de trois volets: la lutte contre le parasite, la lutte antivectorielle et le développement de stratégies vaccinales. La lutte antiparasitaire repose sur la chimiothérapie antiplasmodique des malades et la chimioprophylaxie pour les groupes à risques (femme enceinte, enfant de moins de 5 ans et les personnes provenant de zones non impaludées). Quant à la lutte antivectorielle, elle vise à supprimer ou limiter le contact homme-vecteur pour prévenir l'infection par les plasmodiums. Elle repose actuellement sur les moustiquaires imprégnées d'insecticide, l'aspersion intradomiciliaire d'insecticides rémanents et, dans une moindre mesure, sur la lutte antilarvaire. En matière vaccinale, malgré des avancées significatives ces dernières années, il n'existe toujours pas de vaccin opérationnel contre le paludisme et la prophylaxie reste souvent coûteuse et inaccessible aux plus nécessiteux. Ces moyens de lutte sont mis en péril par des problèmes de résistances, d'une part chez les pathogènes vis-à-vis des médicaments habituels (Robert et al. 2011), et d'autre part chez les insectes vecteurs vis-à-vis des insecticides disponibles (Diabaté et al. 2004, Dabire et al. 2009, Namountougou et al. 2012). Toutefois, une lutte antivectorielle efficace et ciblée ne peut se

mettre en place sans la caractérisation préalable, précise et intégrée, de l'écologie et la physiologie du vecteur (Fontenille and Simard 2004).

1.1.3) Les anophèles

1.1.3.1) Position taxonomique et bioécologie

Les anophèles sont des Arthropodes appartenant à la classe des Insectes, à l'ordre des Diptères, du sous-ordre des Nématocères et à la grande famille des *Culicidae*. La famille des *Culicidae* est subdivisée en trois sous-familles: les *Anophelinae*, les *Culicinae* et les *Toxorhynchitinae*. Sur plus de 500 espèces d'anophèles connues dans le monde (Harbach 2004), 70 seulement sont capables de transmettre les quatre agents de paludisme. Parmi les 70 espèces d'anophèles, 41 sont considérées comme des vecteurs ayant un impact majeur en santé publique. Leur développement passe par une phase larvaire aquatique avant le stade adulte aérien entrecoupé d'une courte phase nymphale (Figure 2). Les œufs du genre *Anopheles* sont pondus individuellement à la surface de l'eau par les femelles fécondées. Cependant chaque espèce anophélienne de rôle vecteur majeur comme *An. gambiae* et *An. funestus* ou de rôle vecteur accessoire tel *An. nili* a des préférences écologiques particulières (Hamon 1963).

Après l'éclosion des œufs, la phase larvaire se divise en quatre stades distincts séparés par trois mues successives (insectes holométaboles). Les larves de moustiques sont généralement considérées comme détritivores bien qu'elles se nourrissent aussi de micro-organismes vivants tels que les bactéries et les algues (Clements 1992). Les anophèles ont tendance à rester en surface et à filtrer les fines particules à l'interface air/eau (« filtreurs de surface»). Après les quatre stades larvaires, s'ensuit le stade nymphal ou pupal au cours duquel de profonds changements permettent à l'insecte de passer de l'état aquatique à l'état aérien. Au cours de ce stade qui dure en moyenne 1 à 3 jours, l'insecte ne se nourrit pas.

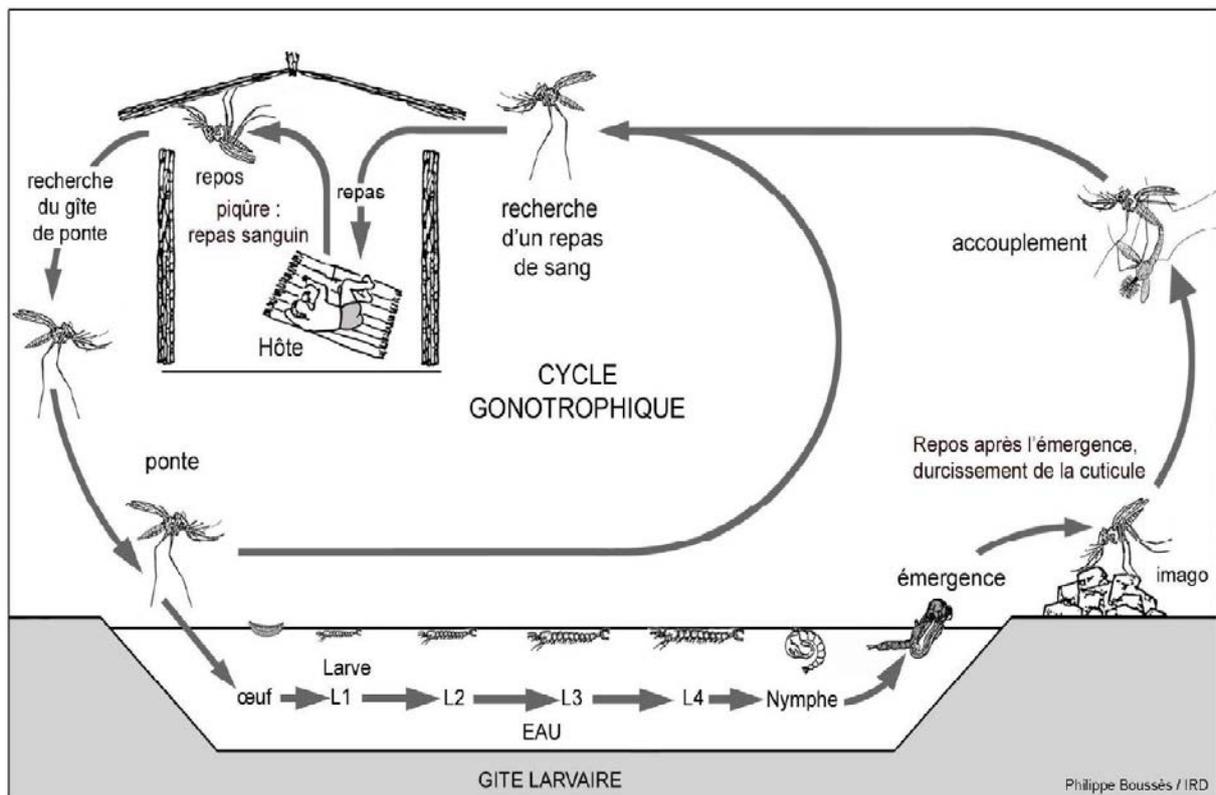


Figure 2: Cycle biologique de l'anophèle

1.1.3.2) Comportement des anophèles et cycle gonotrophique

Pendant la vie imaginale, les femelles d'anophèles montrent une succession de comportements, sans que la succession dans le temps soit précisément déterminée: elles recherchent une source de sucre, s'accouplent, recherchent un hôte pour leur repas sanguin, un site de repos, et enfin, un lieu de ponte. Les réserves accumulées pendant la vie pré-imaginale étant très faibles chez l'anophèle (Fernandes et Briegel 2005), le jus sucré, recherché préférentiellement dès l'émergence (Foster et Takken 2004) est supposé apporter les ressources énergétiques nécessaires à la femelle jusqu'à ce qu'elle trouve son repas sanguin, et notamment pour accomplir l'acte d'accouplement, supposé survenir avant la recherche de l'hôte (Foster 1995). Seules les femelles sont hématophages. Les mâles dont les seules activités sont la reproduction de l'espèce et voler de-ci de-là pour se nourrir de jus de plantes et de nectar ne transmettent pas la maladie. Chez les espèces d'*An. gambiae* s.l. jusqu'ici étudiées, les mâles forment un essaim de taille variable, qui attire les femelles. L'accouplement se passe au crépuscule ou à l'aube et a lieu à l'intérieur de ces essaims (Charlwood et al. 2002). En général les femelles ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur

vie. Après copulation, la femelle conserve les spermatozoïdes dans un réceptacle, la spermathèque, de façon à ce que lors de toutes les pontes qu'elle effectuera, les œufs puissent être fécondés lors de leur passage dans l'oviducte. Les spermatozoïdes conservent leur pouvoir fécondant durant toute la vie du moustique (Bruce-Chwatt et De Zulueta 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. 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 36 à 48 heures après le repas de sang (Clements 1999). Elle va alors à la recherche d'un site favorable à la ponte. Après la ponte, la femelle part à la recherche d'un autre repas de sang pour le cycle suivant. La séquence repas sanguin, maturation ovarienne et ponte est répétée plusieurs fois au cours de sa vie et est appelée cycle trophogonique ou cycle gonotrophique. Par définition, la durée du cycle gonotrophique est égale au temps séparant deux pontes successives. Ce cycle est d'environ quarante huit (48) heures chez les anophèles à une température de 23 à 25°C (Bruce-Chwatt et De Zulueta 1985). La vie de l'imago dure une vingtaine de jours en moyenne et elle ne dépasserait pas un mois dans les conditions naturelles (Gillies et Meillon 1968, Lehmann et Diabaté 2008).

Les femelles anophèles sont anautogènes, c'est-à-dire qu'à l'émergence, la femelle a besoin d'un repas sanguin de manière à initier le processus de maturation des ovaires (Sawabe et Moribayashi 2000). Ainsi, le développement des oocystes s'arrête au stade prévitellogénique et ne reprendra qu'après la prise d'un repas sanguin. Le développement des follicules au stade prévitellogénique est sous le contrôle des hormones, 20-hydroxyecdysone et de l'hormone juvénile (Hagedorn 1994, Klowden 1997, Hernandez-Martinez et al. 2007). Le sang est une source protéique nécessaire à la vitellogénèse. Le développement des follicules ovariens chez les moustiques non capables d'autogénie consiste en deux phases: 1) développement jusqu'au stade de repos; 2) développement pour former l'œuf mature (Clements 1999). Chez les anophèles, Christopher a divisé le développement ovarien en 5 principaux stades encore appelés stades de Christopher, identifiables en fonction des critères comprenant la taille du follicule, la visibilité du noyau dans le follicule, et la quantité de vitellus qui y est déposée au cours du développement. Le dernier stade (V) est identifiable grâce à l'apparition de flotteurs sur l'œuf mature.

1.1.4) Le complexe *An. gambiae* s.l

La plupart des vecteurs du paludisme appartiennent à des complexes d'espèces. Un complexe d'espèces est un ensemble d'espèces jumelles toutes semblables et donc indiscernables par des seuls critères morphologiques (Coluzzi et al. 2002, Carnevale et al. 2009). L'identification demande l'utilisation de critères bioécologiques, cytogénétiques, biochimiques ou moléculaires (Coluzzi et al. 1979, Scott et al. 1993, Favia et al. 2001, Coluzzi et al. 2002, Fanello et al. 2002, Santolamazza et al. 2008). Ces espèces jumelles diffèrent par des comportements, une écologie et des compétences vectorielles spécifiques (Mouchet et al. 2004). En Afrique sub-saharienne, où plus de 80% des cas surviennent, le paludisme est surtout transmis par les espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l. (Figure 3). Ce complexe est formé par huit espèces jumelles dont les caractéristiques bio-écologiques sont différentes. On distingue:

- *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson sp.n (anciennement *An. gambiae* forme moléculaire M) (Coetzee et al. 2013)
- *An. gambiae* Gilles (anciennement *An. gambiae* forme moléculaire S) (Coetzee et al. 2013)
- *An. arabiensis* Patton, 1904.
- *An. bwambae* White, 1985.
- *An. quadriannulatus* Theobald, 1911.
- *An. amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee sp.n (Coetzee et al. 2013)
- *An. melas* Theobald, 1903
- *An. merus* Dönitz, 1902

Parmi ces huit espèces, *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont globalement responsables de 90% de la transmission du paludisme dans la zone intertropicale africaine et ont une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent africain (Coetzee et al. 2000, Fontenille et al. 2003). En zone de savane, on les retrouve souvent en sympatrie et très bien adaptés à l'homme et à son environnement. *Anopheles coluzzii* et *An. gambiae* sont hautement anthropophiles, s'alimentant préférentiellement sur des humains (Coluzzi et al. 1979). Cependant, *An. arabiensis* a un comportement beaucoup plus flexible, moins endophile et moins anthropophile en présence d'hôtes alternatifs (Gillies et Coetzee 1987, Tirados et al. 2006) et se rencontre dans les savanes soudaniennes et la zone sahélienne où elle est adaptée aux environnements plus secs (Coetzee et al. 2000). *Anopheles arabiensis* est capable de se développer dans des zones totalement sauvages, adoptant alors un comportement exclusivement zoophile. Bien que ces trois espèces partagent souvent les mêmes gîtes

larvaires (Servive 1970, Edillo et al. 2002, Simard et al. 2009), dans les savanes d'Afrique de l'Ouest, elles tendent à occuper des gîtes spécifiques. En général, les gîtes de prédilection de ces trois espèces sont des collections d'eaux douces stagnantes ensoleillées et peu chargées de matières organiques. Cependant des études récentes menées au Burkina Faso montrent que des larves d'*An. arabiensis* et d'*An. coluzzii* ont été retrouvées dans des collections d'eau polluées jusqu'ici inexploitées par ces espèces (Fournet et al. 2010). *Anopheles coluzzii* se reproduit préférentiellement dans des gîtes à caractère permanent d'origine anthropique tels que les zones de rizicultures irriguées (Figure 4) où elle est présente toute l'année (Baldet et al. 2003, Gimonneau et al. 2012). La reproduction dans les gîtes temporaires représente pour cette espèce seulement un deuxième choix, tandis qu'*An. arabiensis* et *An. gambiae* sont plus adaptées à se reproduire dans les gîtes temporaires mis en eau par les précipitations tels que les carrières de briques ou les ornières creusées par le passage des véhicules (Costantini et al. 2009) (Figure 4). Des récentes études ont mis en évidence que dans ces habitats temporaires, l'espèce *An. gambiae* est plus compétitive qu'*An. coluzzii* en diminuant son temps de développement larvaire en présence de compétiteur (*An. coluzzii*). Toutefois dans les conditions de l'insectarium, en absence de pression de sélection, *An. coluzzii* émerge plus rapidement avec une taille plus grande qu'*An. gambiae* (Gimonneau et al. 2014). En outre l'étude de la pression de sélection due à la prédation montre qu'*An. coluzzii* et *An. gambiae* modifient leur comportement en présence d'un prédateur. *Anopheles. coluzzii* réduit son activité en présence d'un prédateur favorisant ainsi son succès (Gimonneau et al. 2010, Gimonneau et al. 2012).



Figure 3: Le moustique anophèle mâle ♂ et femelle ♀ (Photo Nil Rahola)

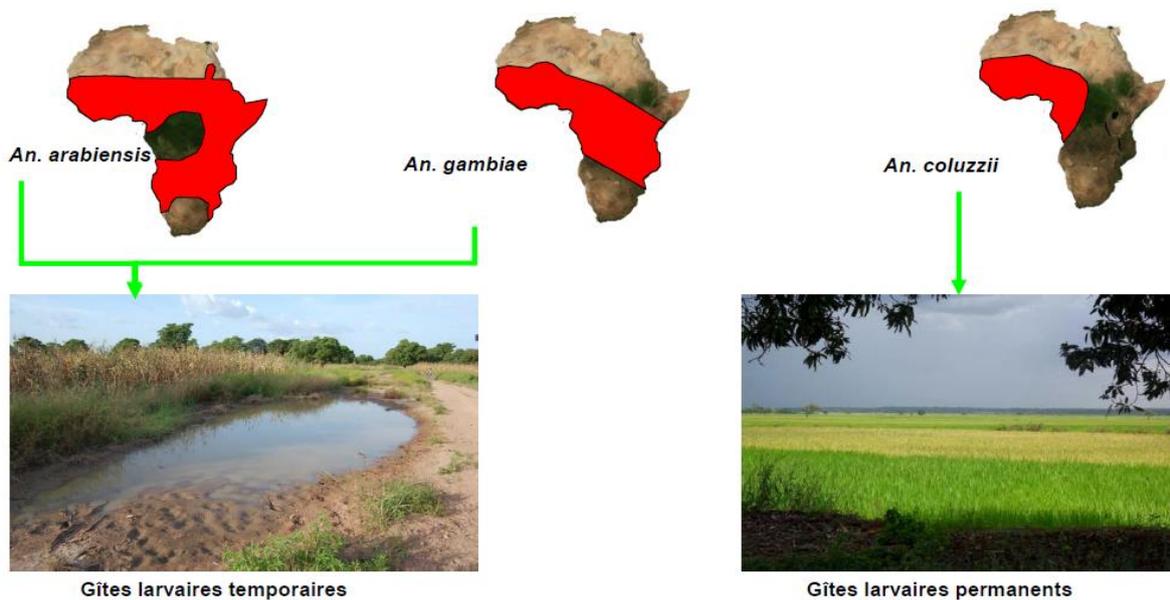


Figure 4: Distribution géographique en Afrique d'*An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* et illustrations de leurs gîtes larvaires préférés (Source: Frédéric Simard).

1.2) Facteurs de stress et adaptation des insectes à leur milieu

Dans l'environnement naturel, tout organisme fait face aux fluctuations des facteurs environnementaux biotiques et/ou abiotiques. Les facteurs abiotiques représentent l'ensemble des facteurs climatiques et physico-chimiques environnementaux tels que la température, l'humidité, le rayonnement solaire ou des concentrations variables de gaz carbonique dans l'air (Korsloot et al. 2004, Gillott 2005). Dans la nature, contraintes thermiques et hydriques sont souvent liées. Quant aux facteurs biotiques, ils représentent les variations de l'abondance de nourriture/proies, de prédateurs ou de parasites et tout paramètre lié directement aux interactions avec une ou plusieurs autres entités biologiques (Korsloot et al. 2004, Gillott 2005). Lorsque l'amplitude des fluctuations naturelles de ces paramètres est suffisamment forte, ils peuvent devenir des contraintes pour les insectes (Denlinger et Armbruster 2014). La conséquence de cette/ces contrainte(s) est appelée stress. Si l'insecte n'est pas capable de contourner la condition de stress, sa croissance, son développement, sa fécondité et sa survie peuvent être affectés négativement. On considère généralement que la réponse à un stress possède deux modalités que sont l'**évitement** et la **tolérance**. L'évitement consiste à se soustraire à la contrainte: le système biologique s'isole de l'agent stressant. On qualifie un insecte de **tolérant** en ce qui a trait à une variable environnementale particulière s'il supporte des variations de son milieu interne liées à certains changements de l'environnement externe: le système biologique maintient son fonctionnement malgré la contrainte. Tout changement, même mineur, dans l'environnement nécessite une certaine réponse afin que le milieu intérieur puisse être maintenu constant (Schmalhausen II 1949). En dépit de leurs nombreuses adaptations homéostatiques, les insectes sont occasionnellement obligés de faire face à des situations qui les poussent aux limites de leur capacité à équilibrer leurs allocations. Par exemple, pendant certaines saisons de l'année (ou certains moments de la journée), la température peut atteindre des extrêmes de chaleur ou de froid, ou encore une baisse d'hygrométrie. Une adaptation qui permet d'économiser de l'énergie tout en évitant des circonstances difficiles et dangereuses consiste à entrer dans un état de torpeur: c'est la **dormance**, un état physiologique caractérisé par une activité réduite au minimum et une diminution du métabolisme (Denlinger 1986, Kostal 2006). Plusieurs types de dormances peuvent être distingués, en particulier la **diapause** et la **quiescence** (Tableau I).

1.2.1) La diapause

La diapause est une véritable adaptation écophysiological des animaux aux conditions défavorables du milieu. Elle est très répandue chez les insectes et autres invertébrés (Andrewartha 1952, Kostál 2006, MacRae 2010) leur permettant de résister et de survivre aux variations saisonnières de l'habitat telles que les basses températures hivernales, les fortes chaleurs estivales, les périodes de sécheresse ou encore d'absence de nourriture. Elle permet également de synchroniser les différents stades du cycle de vie avec celui des saisons. Elle est caractérisée par un état d'arrêt de développement induit par des facteurs génétiques endogènes (effet maternel, expression des gènes) et intervient selon les espèces à un stade précis de développement. On parle de diapause embryonnaire, larvaire, nymphale ou imaginale (Denlinger et al. 1972). A l'état de diapause, les insectes ont une physiologie particulière qui les met à l'abri de difficiles conditions environnementales. Ils peuvent donc, sous cette forme survivre pendant la mauvaise saison. Les traits caractéristiques sont le ralentissement métabolique, l'inactivité, l'augmentation des réserves énergétiques, et habituellement une résistance accrue à la perte d'eau et la protection contre les températures extrêmes. La diapause est généralement initiée avant l'installation des conditions défavorables (Podrabsky et Hand 1999).

L'hibernation et l'estivation sont les deux termes couramment utilisés pour désigner la diapause. L'**hibernation** est une adaptation au froid hivernal et à la rareté des aliments pendant cette saison, tandis que l'**estivation** est un état de torpeur estivale à une période où la température est élevée et l'eau rare (Secor et Lignot 2010). C'est une forme de dormance pendant les saisons sèches tropicales, qui peut être une diapause ou une quiescence (Denlinger et Armbruster 2014). Les économies d'énergie résultant d'un ralentissement du métabolisme et d'une baisse de la production thermique sont énormes. Les insectes qui hibernent ou estivent sont donc en mesure de survivre pendant très longtemps sur des réserves limitées d'énergie, emmagasinées dans les tissus de leur corps ou sous forme de réserves. C'est le cas dans les zones tempérées des moustiques *Aedes albopictus*, *Aedes triseriatus*, *Aedes siriensis* et *Culex pipiens* qui entrent en diapause pendant l'hiver ((Denlinger et Armbruster 2014). Chez les *Culex pipiens*, seules les femelles entrent en diapause à l'état adulte. Quant aux espèces d'*Aedes*, elles peuvent subir des diapauses embryonnaire et larvaire.

L'hibernation ou l'estivation sont déclenchées par des stimuli environnementaux tels que les changements saisonniers dans la durée du jour appelée photopériode (Tauber et al. 1986, Danks 1987), la température ou l'hygrométrie. Il a été établi que l'apparition à l'automne,

dans les populations anophéliennes des régions tempérées froides, de femelles en diapause est induite par l'action sur les gîtes larvaires des changements dans l'amplitude et le rythme des variations journalières de l'éclairement, de la température et de l'état physico-chimique de l'eau (Adam et al. 1964).

La diapause est un processus dynamique et non statique qui comprend trois phases (Andrewartha 1952, Denlinger 2002, Kostál 2006):

- La pré-diapause: c'est l'**induction** par des facteurs internes et/ou externes agissant sur un stade sensible de développement et la **préparation** à la diapause. Durant cette phase, les insectes accumulent des réserves pour satisfaire leur demande métabolique durant la diapause (Hahn et Denlinger 2007). Cette phase se caractérise par une accumulation de lipides (Adedokun et Denlinger. 1985, Sim et Denlinger 2008) et des protéines de stockage (Denlinger 2002).
- La diapause proprement dite comprend l'**initiation**, la **maintenance** et la **terminaison**. Elle se caractérise par une progression des changements moléculaires et physiologiques. Le développement est arrêté ou grandement retardé et l'insecte devient insensible à tout signal de développement. La dépression métabolique, la diminution des réserves énergétiques, l'augmentation de la tolérance à la dessiccation sont des caractéristiques essentielles de cette phase (Hahn et Denlinger 2011, Denlinger et Armbruster 2014).
- La post-diapause. Bien que la fitness soit diminuée due aux multiples coûts de la diapause, l'insecte est pleinement capable de répondre aux signaux environnementaux qui initient le développement.

Des mécanismes hormonaux sont généralement impliqués dans le contrôle de la diapause et les hormones qui interviennent dans cette régulation dépendent des espèces et du stade diapausant (Denlinger et al. 2012). Les diapauses larvaire et nymphale résultent d'un déficit en hormones de mue (ecdystéroïdes) qui est à l'origine de l'arrêt du développement (Denlinger 2002). La diapause observée chez les adultes (diapause de reproduction) est liée à un arrêt de la production d'hormone juvénile (Denlinger 1986) qui est le principal facteur stimulateur de la gamétogenèse. Dans certains cas, la mère dicte à sa progéniture le destin de la diapause: c'est l'*effet maternel* qui passe probablement par un message hormonal (Danks 1987, Mousseau et Dingle 1991).

1.2.2) La quiescence

La quiescence est un état de vie ralentie déclenché directement lorsque les conditions ambiantes, comme la température, l'humidité ou la nourriture deviennent défavorables (Tauber et al. 1986, Bemis et al. 1987, Podrabsky et Hand 1999, Kostál 2006, Hahn et Denlinger 2007). A la différence de la diapause (voir tableau I), qui est un état programmé de développement ralenti, la quiescence est une réponse immédiate à une dégradation soudaine de la qualité de l'environnement. Réversible, cet état n'est que momentané et cesse dès que l'environnement redevient favorable.

Tableau I: comparaison entre diapause et quiescence (d'après Hahn and Denlinger 2007)

Quiescence	Diapause
Réponse immédiate	Réponse programmée et se produit à un stade précis de développement
Les facteurs environnemenataux affectent directement le développement	Les facteurs environnementaux modifient indirectement les voies de developpement
Arrêt concomittant de développement avec l'arrivée des conditions adverses	L'arrêt de développement dure plus longtemps que les conditions environnementales défavorables

1.2.3) Migration

La migration est l'évitement complet des conditions environnementales défavorables en quittant l'espace géographique. Elle est généralement considérée comme une stratégie alternative à la diapause (Danks 1987, Melody et al. 2008). Dans certaines zones d'Afrique par exemple, la rythmicité influence les déplacements des espèces animales entre les saisons sèches et les saisons des pluies. Sous les climats plus tempérés, la cyclicité des périodes froides en hiver et des périodes plus chaudes en été est également à la base de nombreux phénomènes migratoires dont le but est de répondre aux effets combinés de la diminution des ressources et des températures contraignantes. Plusieurs facteurs ou stimuli environnementaux tels que la photopériode, la température ou l'hygrométrie ou des phénomènes et horloges biologiques sont impliqués dans le déclenchement des phénomènes de migration chez les insectes. Avant ou pendant la migration, la physiologie des insectes peut être modifiée. Les insectes peuvent accumuler des réserves d'énergie avant la migration et développer leurs fonctions locomotrices (Dingle 1974). Les insectes qui migrent accumulent des réserves

énergétiques en particulier des lipides pour le vol et maintiennent généralement stable leur métabolisme aérobie.

1.2.4) Réponses phénotypiques apportées par les insectes aux contraintes environnementales

D'un point de vue fonctionnel, l'adaptation est l'ensemble des mécanismes phénologiques, physiologiques, morphologiques et comportementaux que l'organisme met en place pour se maintenir dans un statut biologique optimal, réduire les pertes en eau tout en lui conférant une performance accrue en terme de survie. Malgré les contraintes environnementales qui peuvent être sévères, le maintien des populations lors de conditions défavorables est possible grâce aux réponses mises en place, au niveau comportemental, biochimique et physiologique. (Cloudsley-Thompson 1975, Issartel 2007).

a) Réponses comportementales

Des changements de comportement sont fréquemment associés à la diapause ou lorsque le milieu ne présente temporairement plus les conditions optimales. Comme l'a souligné Slobodkin (1968), «chez les animaux, la réponse initiale à toute perturbation est comportementale». Si cette réponse élimine la perturbation, alors il n'y a pas de modification à un autre niveau. Face à la dessiccation, en conditions extrêmes de températures et d'humidité, beaucoup d'ectothermes maintiennent une température corporelle stable et constante grâce à des comportements simples: i) la migration à longue distance vers des zones géographiques où règne un climat plus propice (Denlinger 1986); ii) la recherche de microenvironnements plus favorables au niveau local est certainement la réponse la plus commune (Bale, 2002); iii) l'agrégation de plusieurs individus (Giokas et al. 2005) permet également d'augmenter l'humidité locale et de réduire ainsi les pertes en eau au niveau individuel. Elle est associée à la dormance chez plusieurs espèces. C'est le cas des adultes de *Stenotarsus rotundus* (insecte Coléoptère tropical) qui forment des agrégations de plus de 70.000 individus. iv) Certaines espèces d'insectes comme les femelles du moustique *Culex pipiens* se nourrissent exclusivement de sucre en phase de préparation à la diapause (Bowen 1992).

b) Réponses physiologiques

Chaque organisme possède une quantité limitée d'énergie qu'il peut dépenser pour se nourrir, échapper à ses prédateurs, réagir aux fluctuations de son milieu (homéostasie), croître et se reproduire. C'est ce qu'on appelle l'allocation énergétique. Avant le début de la diapause, il

est démontré que plusieurs insectes accumulent des réserves nutritives telles que les lipides (Reynolds et al. 2012), les sucres et le glycogène (Arrese et Soulages 2010) pour soutenir leur métabolisme de base pendant la période défavorable. Cependant, la plupart des ajustements physiologiques mis en place se traduisent souvent par des changements au niveau de l'expression protéique ou bien par la synthèse et l'accumulation de solutés compatibles. On y trouve des protéines de réserve telles que les hexamérines dont la plupart, mais pas toutes, ont une teneur élevée en acides aminés aromatiques et sont donc classés comme arylphorines (Tang et al. 2010). Le stress amène les organismes à produire ou accumuler des molécules ayant un rôle de protection. Ainsi, la synthèse de composés solubles de faible poids moléculaire appelés *solutés compatibles* constitue une réponse physiologique commune à de nombreuses contraintes (Yancey 2005, Clark et al. 2009). Ces composés sont osmotiquement actifs et ils peuvent s'accumuler à de très hautes concentrations dans le cytosol sans pour autant interférer avec le métabolisme cellulaire. Parmi ces substances, on retrouve notamment des polyols (glycérol, sorbitol *myo*-inositol notamment), des sucres (tel que le tréhalose) mais aussi certains acides aminés (proline ou alanine en particulier). En outre la synthèse des protéines de stress (LEA, HSP) et des antioxydants (Feder et Hofmann 1999, Hoffmann et al. 2003) est très fréquemment surexprimée chez les insectes exposés aux fortes températures. Les réponses biochimiques peuvent quant à elles se traduire par des ajustements de la composition des lipides membranaires, afin de maintenir la fluidité nécessaire au bon fonctionnement des cellules.

c) Réponses morphologiques

Il existe de nombreuses adaptations morphologiques aux milieux arides. D'abord il y a les adaptations qui se traduisent par une réduction des pertes d'eau par respiration (Cloudsley-Thompson 1975), mais aussi par transpiration. Par exemple, il est connu que les spiracles de certains insectes et tiques vivant en milieux arides ont tendance à être petits et souvent submergés ou cachés. C'est ainsi que les spiracles des coléoptères xérophiles sont recouverts d'excroissances qui sont censées empêcher la diffusion des molécules d'eau, de l'oxygène ou du dioxyde de carbone (Hadley 1972). Le temps de développement larvaire est généralement long chez les espèces qui entrent en diapause leur permettant d'accumuler plus de réserves et atteindre de tailles plus grandes (Denlinger et Armbruster 2014). C'est le cas observé chez *Culex pipiens* (Zhang et Denlinger 2011).

1.2.5) Survie des anophèles pendant la saison sèche

Dans les zones de savane tropicale, la dynamique de la transmission du paludisme est largement fonction de la dynamique des populations des vecteurs qui elle-même, suit les variations saisonnières. En effet, la distribution spatiale et temporelle des anophèles dépend de la disponibilité des gîtes larvaires (Delmont 1982) dont la plupart disparaît en saison sèche. Dans les zones où les gîtes larvaires sont pérennes telles les zones de cultures irriguées, *An. coluzzii* se maintient durant la saison sèche et assure la transmission du paludisme (Baldet et al. 2003, Gimonneau et al. 2010), alors que les populations d'*An. arabiensis* et d'*An. gambiae* demeurent en dessous du seuil de détection des méthodes et techniques classiques d'échantillonnage jusque là utilisées. Pourtant dès que les gîtes larvaires sont en eau, peu de temps après les premières pluies, leurs populations augmentent de manière explosive (Diagne et al. 1994, Simard et al. 2000, Koenraadt et al. 2003). Cette brusque augmentation des populations d'anophèles suppose que certains individus subsisteraient pendant la saison sèche (Simard et al. 2000, Minakawa et al. 2001). Il est clairement établi que les stades pré-imaginaux (œufs, larves ou pupes) survivent seulement quelques jours en conditions sèches (Beier et al. 1990, Koenraadt et al. 2003). Par conséquent ils ne peuvent traverser la longue saison sèche sahélienne caractérisée par une faible hygrométrie et une température élevée. Une autre hypothèse est que ces espèces se réfugieraient dans des habitats favorables qui ont jusqu'ici échappé à l'échantillonnage pourtant intensif mené par certains auteurs dans les zones concernées (Charlwood et al. 2000). Certaines données anciennes et controversées, suggèrent l'existence d'une «dormance» à l'état adulte qui pourrait permettre le maintien, localement, de ces populations d'anophèles (Holstein 1954, Omer et Cloudsley-Thompson 1970). Ces études ont montré que les mâles ne sont pas rencontrés durant cette période et que seules les femelles pouvaient être échantillonnées. Ces dernières réduiraient au strict minimum leurs activités et développeraient leurs ovaires de manière très ralentie. Dès le retour des conditions favorables, elles seraient capables de pondre les œufs ainsi développés d'une saison à l'autre, assurant le maintien de l'espèce dans une zone pourtant hostile à sa survie une grande partie de l'année (Pages et al. 2007). Il existe ainsi très peu d'études consacrées à l'écologie des anophèles pendant la période défavorable de la saison sèche (Jawara et al. 2008, Denlinger et Armbruster 2014). Des études récentes ont démontré qu'*An. coluzzii* était capable de survivre pendant toute la saison sèche dans la zone sahélienne du Mali (Lehmann et al. 2010). En effet, après marquage-lâcher-recapture, une femelle d'*An. coluzzii* marquée en fin de saison des pluies a pu être capturée au début de la saison des pluies

suivante, soit après une période d'estivation de 7 mois alors que la longévité des adultes ne dépasse généralement pas quelques semaines (Gillies et De Meillon 1968, Lehmann et Diabaté 2008). Par ailleurs, par des expériences de traitement des villages par des pyréthrinoïdes, ces mêmes auteurs ont montré que seules les densités d'*An. coluzzii* étaient affectées par ces traitements. D'autre part, le taux métabolique d'*An. coluzzii* était très faible pendant la saison sèche (Huestis et al. 2011, Huestis et al. 2012). Dans leur ensemble, ces travaux confortent l'hypothèse qu'*An. coluzzii* persisteraient sur le terrain dans un état de vie ralentie appelée diapause (estivation), quand ceux d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* opteraient pour une migration/recolonisation en début de saison des pluies à partir des zones voisines plus favorables (Adamou et al. 2011). Cependant très peu des données existent sur les mécanismes physiologiques, métaboliques, morphologiques et comportementaux sous-jacents ces stratégies de survie. Ces manques se doivent de retenir davantage l'attention, d'autant plus que les échecs enregistrés lors des campagnes de lutte contre les vecteurs du paludisme sont le plus souvent liés à des connaissances trop limitées de la bioécologie des anophèles. Ainsi, au regard des objectifs fixés, une démarche méthodologique combinant un ensemble d'approches, de techniques et de méthodes doit être mise en œuvre.

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

1) Cadre de l'étude

1.1) Le Burkina Faso

Le Burkina Faso est un pays sahélien situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest entre 5°30' de longitude ouest et 2°40' de longitude est et entre 9°30' et 15°15' de latitude nord. Sa superficie est de 274 000 km². Il est encadré, au nord et à l'ouest par le Mali; à l'est par le Niger; au sud, ses frontières longent le Bénin, le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire.

Le climat du pays est tropical de type soudano-sahélien. Par-delà la grande irrégularité des précipitations, aussi bien d'un lieu à l'autre (350 mm au nord contre 1000 mm au sud-ouest) qu'en années successives, la violence du contraste saisonnier est saisissante. Trois, quatre ou, plus rarement, six mois de pluies, centrés sur le plein été, apportent une lame d'eau. Le reste de l'année constitue une très longue saison sèche, où il peut ne pas tomber une seule goutte d'eau. Du fait de l'absence de couverture nuageuse et de l'intensité du rayonnement terrestre de grande longueur d'onde, les nuits sont froides, notamment de décembre à février-mars. En revanche, durant l'après-midi, tout spécialement entre mars et mai, la température grimpe couramment à 35, voire 40°C sous abri, faisant redouter des manifestations d'hyperthermie et de déshydratation, surtout à l'effort et lorsque l'air ambiant est pauvre en vapeur d'eau.

1.2) Sites d'étude

L'ensemble de nos travaux se déroule en utilisant des populations de moustiques provenant d'une zone éco-climatique où des études pionnières concernant les stratégies développées par *An. gambiae* s.l. en saison sèche ont été menées dans les années 50 (Holstein 1954), à savoir la zone de savane située autour de Bobo-Dioulasso, dans le Sud Ouest du Burkina Faso. La pluviométrie annuelle varie de 1000 à 1200 mm et se concentre sur les mois de mai à octobre. Nous avons principalement focalisé nos études sur deux zones contrastées (Figure 5) pour la dynamique de leurs populations anophéliennes:

- 1) la région de Bama (11°24' N ; 04°24' W), village situé à une trentaine de kilomètres au Nord Ouest de Bobo-Dioulasso, caractérisé par la présence d'un large complexe rizicole établi à la fin des années 1970 et où se pratique l'agriculture irriguée sur plus de 1200 ha. *Anopheles coluzzii* est largement majoritaire dans ce biotope et est présente toute l'année (Baldet et al. 2003, Gimonneau et al. 2012).
- 2) le village de Soumousso (11°00' N, 4°02' W) situé à une trentaine de kilomètres à l'Est de Bobo-Dioulasso, où *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont abondants en saison des pluies, et introuvables ou très rares en saison sèche (Robert et al. 1987, Diabaté et al. 2002, Diabaté

et al. 2004, Dabiré et al. 2009). *Anopheles coluzzii* est également présent et adopte une dynamique saisonnière dans cette localité également.

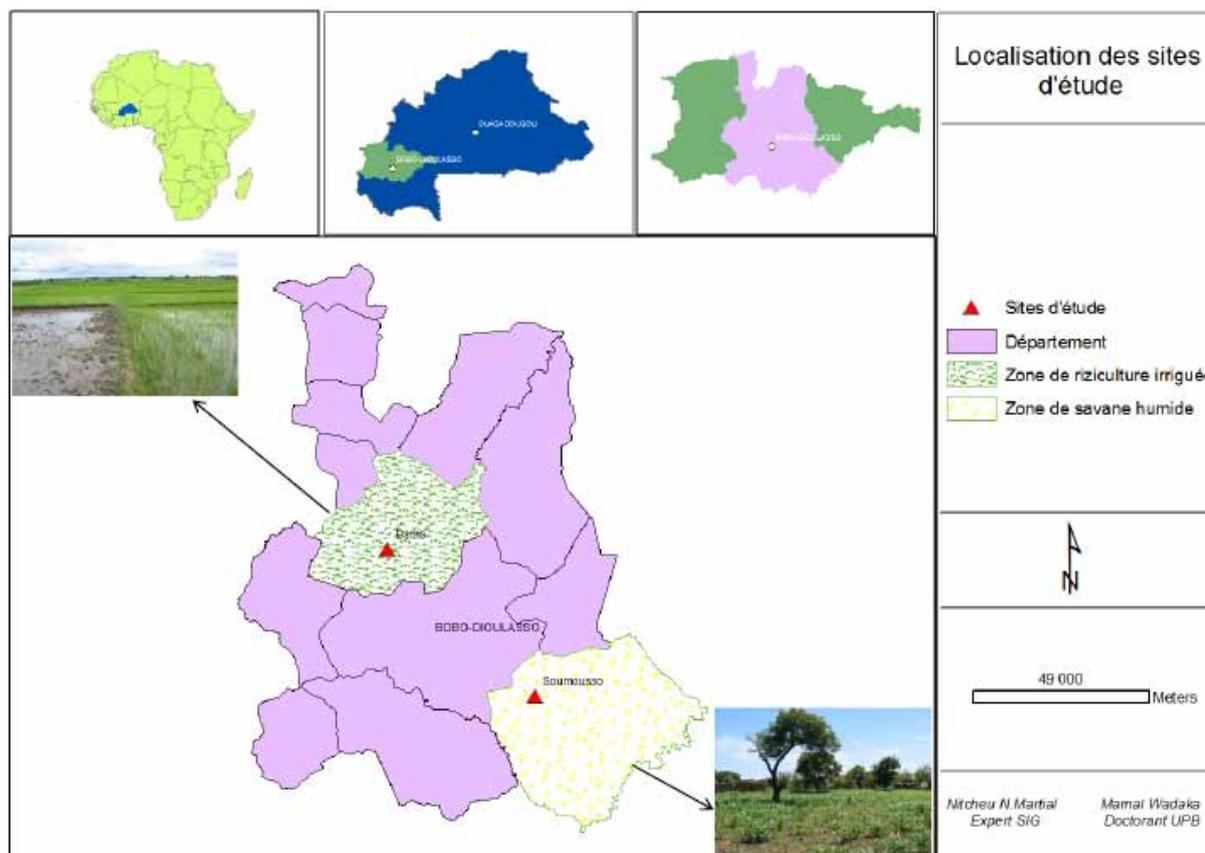


Figure 5: Localisation géographique des sites d'étude

2) Méthodologie

2.1) Approche de terrain: étude en conditions naturelles

Pour cette approche, nous sommes partis des postulats suivants, émis à la lecture de nombreux articles documentant la mise en place de stratégies de survie chez les invertébrés (Denlinger 1986): i) la mise en place de stratégies de survie par les populations naturelles de moustiques s'accompagne nécessairement d'un «trade-off» entre longévité et reproduction (phénotype de dissociation ou discordance gonotrophique) et requiert l'accumulation de réserves nutritionnelles ii) l'intégration du stimulus ou des stimuli induisant la mise place de ces stratégies particulières se fait dès les premiers stades larvaires, voir même par effet maternel,

et iii) on attend des différences de phénotypes entre sites «permanents» et «temporaires» et entre espèces du complexe *An. gambiae* s.l.

2.1.1) Collecte des moustiques sur le terrain

i) Collecte des larves

Des collectes de larves aux stades tardifs de développement (stade 3, stade 4 et pupes) ont été effectuées à Bama et Soumousso au cours des années 2010 et 2011. Ces stades de développement du moustique sont supposés avoir déjà reçu et intégré le ou les stimuli qui conduisent l'adulte à initier une stratégie de survie. Les collectes sont effectuées avec un pas de temps de 15 jours à partir de la période transitoire entre la saison des pluies et la saison sèche (novembre – décembre), période au cours de laquelle les stimuli (hausse de la température, baisse de l'hygrométrie, diminution de la durée du jour, élévation de densité larvaire dans les gîtes dus à leur rapide réduction de taille en conditions arides) susceptibles de déclencher l'initiation des stratégies de survie chez les moustiques sont présents. Les larves et pupes sont prélevées à l'aide de louches dans des collections d'eau présentant de fortes densités larvaires. Ces gîtes de développement larvaire, de diverse nature, étaient entre autres des ornières remplies d'eau de pluies au bord des pistes, des empreintes de sabot de bétail, des trous à banco, des flaques d'eau stagnante au niveau des ponts ou des bas-fonds des rivières. Les larves et pupes ainsi collectées (Figure 6A) sont transférées le jour même dans des cages de transplantation (Figure 6B) installées au niveau d'un gîte larvaire encore en eau à Bama (Figure 6B). La trace de la localité de prélèvement des larves est préservée. Des collectes en périodes favorables, servant de contrôle sont également effectuées en saison des pluies (septembre). Les adultes émergents (entre 1 à 4 jours après la transplantation des larves) sont collectés aux premières heures du jour à l'aide de tubes à hémolyse et identifiés comme faisant partie du complexe *Anopheles gambiae* s.l. à l'aide de clefs d'identification morphologiques. Mâles et femelles ayant émergé le même jour sont alors transférés dans des cages d'insectarium classiques disposées dans la serre grillagée de Bama (voir paragraphe 2.3 ci-dessous), où les conditions environnementales se rapprochent de celles perçues par les insectes sauvages. Les moustiques sont nourris *ad libitum* de glucose 5%. Les repas sanguins sont offerts aux moustiques sur des lapins entravés, aux 2^e, 4^e, 6^e, 8^e et 10^e jours après émergence. Les moustiques morts et les femelles n'ayant pas pris de repas de sang sont retirés chaque jour dans chaque cage et pour chaque localité. Deux jours après le dernier repas sanguin (*i.e.* au quatorzième jour après émergence) chaque cage est ramenée du terrain au

laboratoire (Centre Muraz/IRSS, Bobo Dioulasso). Les femelles sont alors prélevées puis tuées au froid (-20°C) avant d'être conditionnées et conservées dans le congélateur à -80°C pour les analyses ultérieures (détermination de l'espèce et/ou forme moléculaire, dissections pour examen du statut gonotrophique et observation du corps gras, analyses morphométriques).



Figure 6: Collecte des larves d'*An. gambiae* s.l. dans les gîtes larvaires (A) et transplantation dans un gîte naturel encore en eau (B) (Photo Karine Mouline)

ii) Collecte des adultes émergents pour dosages métaboliques

Afin de suivre la dynamique d'allocation des réserves énergétiques accumulées pendant la vie larvaire, les adultes sont collectés au début, pendant et en fin de saison des pluies pendant la première heure de leur vie adulte, après émergence: ainsi, les pupes sont collectées sur le terrain et placées dans des bassines contenant l'eau des gîtes larvaires correspondants à des densités moyennes de 100 pupes par bassine, afin d'éviter l'effet d'élévation de densité larvaire dans les gîtes dus à leur rapide réduction de taille en conditions arides ou «crowding». Les bassines sont alors placées à l'intérieur de cages à émergence couvertes de tulle moustiquaire et contrôlées régulièrement jusqu'à l'apparition des premiers émergents. Dès cet instant, les cages sont vérifiées toutes les heures et les imagos émergés sont prélevés à l'aide des tubes et immédiatement stokés dans l'azote liquide. De retour au laboratoire, les tubes contenant les moustiques sont conservés à -80°C pour analyse ultérieure. Les collectes ont été effectuées en 2011 en début de saison des pluies (mai), milieu de saison des pluies (août) et en fin de saison des pluies (novembre). Seules les femelles ont fait l'objet d'analyses.

2.1.2) Mesure des paramètres environnementaux

Parallèlement à la collecte des données entomologiques et du matériel biologique sur le terrain, les paramètres environnementaux sont suivis en continu dans nos sites. Une station météorologique de type Davis® Vantage Pro2 (Davis Instruments, Hayward, CA, U.S.A) est installée dans chaque localité de collecte. Ainsi, les variables climatiques incluant la température (°C), l'humidité relative (%), la pluviométrie (mm), la pression atmosphérique (mmHg), la vitesse (m/s) et la direction du vent (°), sont mesurées en continu et enregistrées heure par heure pendant toute la durée de l'étude.

2.1.3) Détermination des stades de développement ovarien et présence/absence de graisse sous-cuticulaire chez les femelles

Les femelles collectées au 14^e jour après quatre repas de sang sont déposées dans une goutte de liquide physiologique et leur abdomen disséqué afin d'en extraire les ovaires. Les stades de développement des follicules ovariens sont déterminés suivant la classification de Christopher (Figure 7) décrite par Detinova (1962). Les stades IV et V sont déterminés directement sous la loupe binoculaire (grossissement $\times 40$). Les stades I à III sont déterminés par observation sous microscope (grossissement $\times 100$ et $\times 200$). La présence ou non d'une masse de graisse sous la cuticule (hypertrophie du corps gras) et de gouttelettes lipidiques est également observée directement sous la loupe binoculaire (Figure 8).

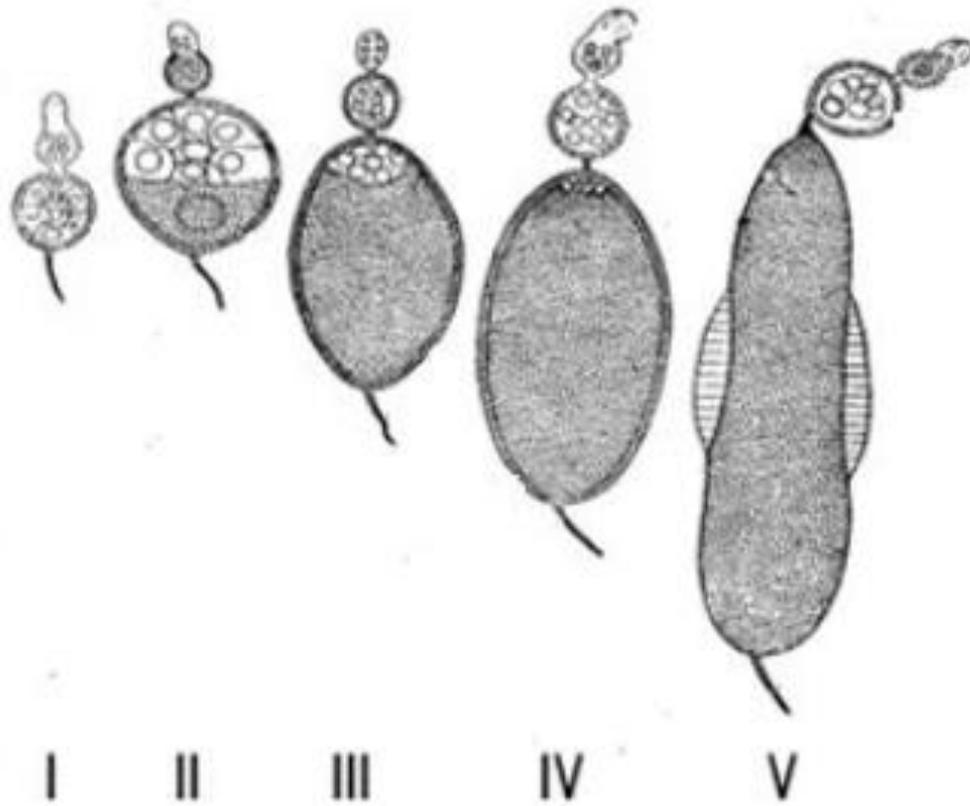


Figure 7: Stades de Christophers des ovocytes. Les chiffres indiquent les différents stades de développement (Detinova 1962)

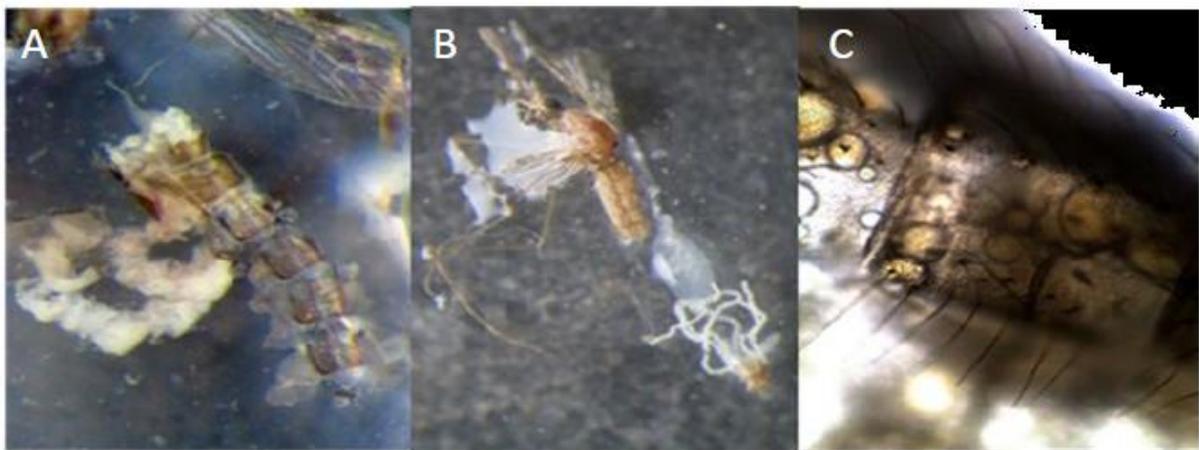


Figure 8: Phénotypes d'accumulation de graisse sous-cuticulaire chez *An. gambiae* s.l.: présence (A), absence (B) et gouttelettes lipidiques (C) (Photo Karine Mouline)

2.1.4) Détermination du statut d'insémination des femelles

Le statut d'insémination des femelles est déterminé selon la méthode de Tripet et al. (2001). Le dernier segment de l'abdomen est prélevé et immergé dans l'éthanol à 70% pendant 5 jours. La spermathèque est alors extraite du segment abdominal et ouverte afin d'observer la présence ou non d'une boule de sperme (formée au contact de l'éthanol).

2.1.5) Identification moléculaire des espèces

Pour chaque femelle disséquée ou utilisée pour des dosages, les pattes sont prélevées afin de déterminer le statut d'espèce et la forme moléculaire à l'aide de la technique d'amplification en chaîne par polymérisation (PCR) décrite par Santolamazza et al. (2008) (voir protocole en annexe 2).

2.1.6) Dissection des ailes et morphométrie géométrique

Les deux variables métriques utilisées pour caractériser la morphologie des ailes et les interactions possibles avec l'environnement sont la taille et la forme. Les ailes utilisées ici sont celles des moustiques collectés sur le terrain à Bama et Soumousso en 2011 et élevées *in situ* pour l'observation des phénotypes de développement ovarien et d'accumulation de graisse sous-cuticulaires (paragraphe ci-dessus). Ainsi, les ailes de chaque femelle disséquée sont prélevées (détachées du thorax) à l'aide d'aiguilles de dissection, sous la loupe binoculaire, et placées (scellées) entre lame et lamelle. Ces ailes sont photographiées à l'aide d'une camera connectée à la loupe binoculaire (Leica, grossissement X10). Les images sont ensuite analysées grâce au logiciel CLIC «Collecting Landmarks for Identification and Characterization» (disponible sur le site <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/clic/index.html>) qui implémente une méthode de morphométrie géométrique appelée Superposition Procrustes (voir Dujardin et al. 2010). Douze points repères ou «landmarks» sont définis pour tous les individus (Figure 9). Chaque aile est ensuite digitalisée en utilisant le module COO «Collection of cOOrdinates» du logiciel. La conformation de ces points repères, caractérisée par les coordonnées (x,y) de chacun des points, est supposée contenir la plus grande part d'information concernant la forme de l'objet initial. A l'aide du module MOG «MORphometrica Geometrica», les coordonnées de ces points sont soumis à la superposition Procuste généralisée: standardisation de l'échelle (mise à l'échelle), superposition de leurs centres de gravités (translation) et une rotation autour de ce centre, permettant d'optimiser la superposition. Les nouvelles coordonnées dites coordonnées Procrustes servent de base pour

les analyses de taille et de forme. La taille des ailes dans son ensemble est évaluée par l'estimateur isométrique appelé taille centroïde («Centroid Size») définie comme la racine carrée de la somme des carrés des distances de chaque point repère au centre de gravité de la configuration (Dryden et Mardia 1998). Chez les moustiques (et *in extenso* chez les Diptères), la taille de l'aile est considérée comme un index de la taille de l'individu (Briegel 1990, Fernandes et Briegel 2005). Les variations dans la forme des ailes sont analysées par superposition des conformations moyennes des ailes et observation des différences dans la position des points repères. L'effet allométrique (relation entre la taille et la forme) a été testé par régression des coordonnées Procrustes et de tailles centroïdes de l'aile (Camara et al. 2006). Les différences entre les espèces et saisons ont été analysées en comparant par un t-test implémenté dans module VAR du logiciel CLIC, les moyennes et les variances des tailles ont été obtenues après correction de Bonferonni.



Figure 9: Aile d'*An. gambiae* s.l et position des points repères ou « landmarks » sélectionnés (Photo Mamaï Wadaka)

2.1.7) Dosage des réserves nutritionnelles

i) Extraction

Les différentes réserves nutritives sont dosées par colorimétrie suivant le protocole décrit par Rivero et al. (2007) et modifié par Mouline et al. (2012). Les moustiques sont enlevés du congélateur et broyés individuellement dans un tube eppendorf contenant 70 μ L de méthanol. On y ajoute 120 μ L de méthanol et on agite au vortex. Le broyat ainsi obtenu est divisé en deux parties de 70 μ L chacune dont l'une est destinée au dosage des protéines. A l'autre partie, on ajoute 680 μ L de mélange méthanol-chloroforme (1:2), puis 100 μ L de sulfate de

sodium. On centrifuge à 13 000tr/min pendant 15 min. Le surnageant est divisé en deux parties égales de 350 μ L qui serviront pour le dosage des lipides et des sucres, respectivement, pendant que le culot est récupéré pour l'analyse du glycogène.

ii) Dosage des protéines

Au tube contenant 70 μ L du broyat initial, 730 μ L de liquide physiologique, puis 200 μ L du réactif de Bradford sont ajoutés successivement. On attend 15 min d'incubation à température ambiante pour permettre le développement de la coloration bleue. L'absorbance (DO) est lue au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 595 nm et la concentration en protéines est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage établie à partir d'une gamme standard d'albumine de serum bovin (BSA) (entre 0 et 17,5 μ g).

iii) Dosage des lipides

Le tube contenant 350 μ L de surnageant (voir ci-dessus) est mis à évaporer jusqu'à dessiccation complète dans les blocs chauffants à 95°C. On y ajoute alors 37,5 μ L d'acide sulfurique à 96% puis le mélange est chauffé dans des blocs chauffants à 95°C pendant cinq minutes. Après refroidissement on ajoute 1000 μ L de Vanilline puis on attend 10 à 15 min pour lire la DO à 525 nm après développement d'une coloration rouge caractéristique. Une courbe d'étalonnage obtenue à partir de l'huile végétale commerciale permet de calculer la concentration en lipides (entre 0 et 17,5 μ g).

iv) Dosage des glucides

Le tube destiné au dosage des sucres est également placé dans les blocs chauffants à 95°C en évitant la dessiccation complète de son contenu (une goutte doit rester au fond du tube). 1000 μ L d'anthrone sont ajoutés et le mélange est chauffé pendant 15 min. Après refroidissement, une coloration rougeâtre se forme et la DO est lue à 625 nm. La concentration en glucides des échantillons est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations standards de glucose (entre 0 et 30 μ g).

v) Dosage du glycogène

Le tube contenant le culot de centrifugation (voir ci-dessus) est renversé sur du papier absorbant pour éliminer le reste de solvant. Le culot est resuspendu directement dans 1000 μ L d'anthrone et le mélange est chauffé pendant 15min à 95°C, puis on laisse refroidir. Une coloration bleu-vert caractéristique se forme dont la DO est lue à 625nm. La concentration en

glycogène est calculée à partir d'une équation de droite d'étalonnage obtenue avec du glucose (entre 0 et 30 µg).

2.2) Approche expérimentale: étude en conditions contrôlées à partir de colonies d'insectarium

Pour cette approche, le postulat est le suivant: (i) les routages métaboliques vers la survie ou la reproduction sont mis en place rapidement après l'émergence (pendant les 24 premières heures) (ii) on attend des signatures physiologiques différentes entre les espèces du complexe *An. gambiae* s.l., entre les mâles et les femelles, et entre des individus élevés en conditions contrôlées mimant la saison des pluies ou le début de la saison sèche.

2.2.1) Protocole expérimental

i) Reproduction des conditions environnementales dans les enceintes climatiques

Deux enceintes climatiques (Sanyo MLR 315H, Sanyo Electric Co., Osaka, Japon) (Figure 10) ont été programmées pour reproduire les conditions climatiques enregistrées en continu sur le terrain à Bama à l'aide d'une station météorologique de type Vantage Pro 2 (Davis Instruments, Hayward, CA, U.S.A.C.I.M.A). Nous avons ainsi mimé les conditions environnementales (température, photopériode et humidité) mesurées sur le terrain pendant la saison des pluies (août-septembre) et pendant le début de la saison sèche (novembre-décembre). Nous avons réalisé les moyennes de température et d'humidité relative par heure pour chacune des saisons (Figure 11) (Mouline et al. 2012).

ii) Elevage des colonies dans les enceintes climatiques

Les colonies d'*An. coluzzi*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* élevées en routine à l'insectarium de l'IRSS de Bobo-Dioulasso (température de 27±1 °C, 80±10% d'humidité relative et alternance jour/nuit de 12h) ont été utilisées pour cette étude. Ces colonies sont établies à partir des femelles gravides collectées sur le terrain.

1. La colonie d'*An. coluzzii*, provient de VK7, zone rizicole de la vallée du Kou (11°23 N, 4°24 O). Cette colonie a été établie en août 2008.

2. La colonie d'*An. gambiae*, provient du village Soumousso (11°1 N; 4°3 O) et a été établie en 2009.

3. La colonie d'*An. arabiensis* a été établie en 2009 à partir d'individus de Dioulassoba, un quartier de Bobo Dioulasso (11°10 N, 4°17 O).

Pour chaque colonie et pour chaque condition expérimentale, des œufs ont été simultanément mis à éclore dans des bacs de plastique translucide (21.5×16×9.5 cm) contenant 1l d'eau de source. Dès l'éclosion des œufs, les larves de stade 1 sont réparties dans de nouveaux bacs à une densité de 150 larves par bac et nourries *ad libitum* avec de la nourriture pour alevins de poissons (Tetramin®).

Les pupes sont collectées et placées dans des gobelets remplis au quart d'eau de source et couverts de tulle moustiquaire. Ils sont alors contrôlés toutes les heures afin de collecter les adultes néonates dans l'heure qui suit ou exactement 24h après leur émergence.



Figure 10: Enceinte climatique permettant l'élevage des moustiques en conditions contrôlées (Photo Mamaï Wadaka)

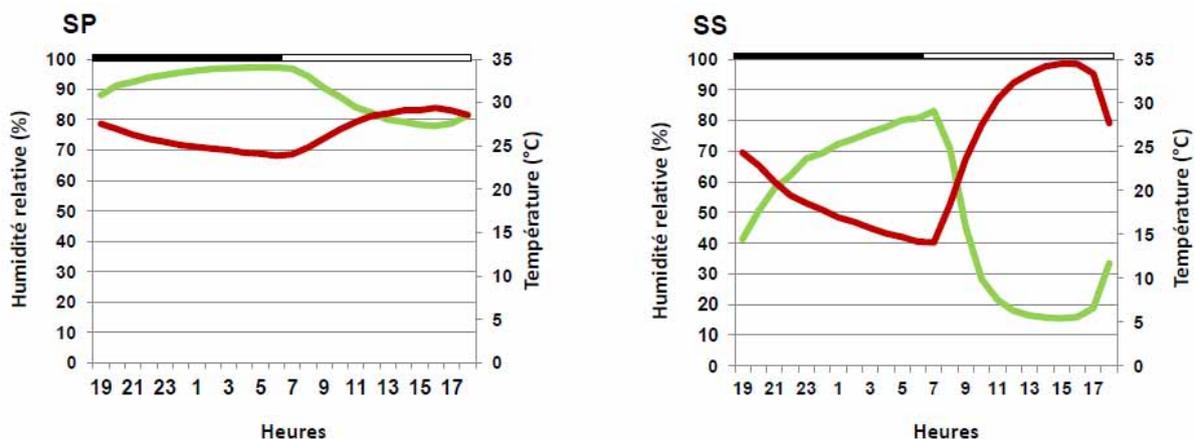


Figure 11: Conditions environnementales de température (rouge), d'humidité relative (vert) et de luminosité reproduites dans les chambres climatiques et mimant les conditions de saison des pluies (SP) et de saison sèche (SS) à Bama

iii) Collecte des individus

Pour chaque condition expérimentale, chaque mâle et chaque femelle collecté à l'émergence est réparti à l'aide d'une table de hasard dans les différentes modalités: «1h» ou «24h» après émergence. Les individus destinés à la modalité «1h après émergence» sont collectés immédiatement. Les individus destinés à la modalité «24h après émergence» sont disposés dans des gobelets fermés avec de la tulle moustiquaire et ont accès à de l'eau uniquement. Ils sont collectés un jour exactement après leur émergence, à l'heure près. Les individus sont tués dans le congélateur (-80°C pendant deux minutes) et stockés dans des tubes référencés gardés à -80°C en attendant les mesures physiologiques ultérieures (voir ci-dessous).

Pour chaque condition expérimentale, des individus de chaque espèce ont été nourris avec du jus sucré jusqu'au dixième jour après émergence pour des observations morphologiques. Les moustiques sont conservés dans de l'éthanol à 70% (vol/vol) jusqu'aux analyses.

2.2.2) Analyse métabolomique

Les métabolites ont été analysés par la technique GC-MS (Gaz Chromatography-Mass Spectrometry), une technique qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreux composés. Ces analyses ont été réalisées à l'université de Rennes 1, UMR CNRS

6553 ECOBIO (Ecosystemes, Biodiversité, Evolution), équipe Paysaclim (Paysages-changements climatiques-biodiversité).

i) Démarche expérimentale

Nous avons au total 24 modalités différentes (3 espèces, 2 conditions expérimentales, 2 sexes, 2 âges). Dix réplicats biologiques (groupes de 5 spécimens) ont été analysés pour chaque modalité, ce qui fait en tout 240 spécimens analysés.

ii) Extraction des métabolites

Avant le processus d'extraction, cinq spécimens (ou six, si poids frais < 1 mg) sont mis dans un tube eppendorf. Les moustiques sont ensuite lyophilisés pendant 72 h (Lyovac™ GT3) et pesés à l'aide d'une micro-balance (Mettler Toledo GmbH©, Greifensee, Switzerland, d= 0,1 µg, max= 2,1). Deux billes de tungstène sont introduites dans chaque tube pour homogénéisation au «bead-beating» (Retsch MM301, Retsch GbmH, Haan, Germany) à une fréquence de 30 agitations par seconde pendant 1,5 min. L'homogénéisation des échantillons s'effectue dans 300 µl de méthanol-chloroforme froid (2:1 vol:vol, à -20°C). Les échantillons homogénéisés sont mis au congélateur à -20°C pendant 10 min. Deux cent microlitres d'eau ultra pure froide (4°C) sont alors ajoutés au broyat. Les tubes sont agités au vortex, puis centrifugés pendant 5 min à 8 000 trs/min à 4°C. On obtient ainsi deux phases distinctes: la phase aqueuse (méthanol-eau) qui contient les composés polaires (sucres, polyols, acides aminés, métabolites intermédiaires) et la phase organique (chloroforme) qui contient les composés non polaires (lipides). Un volume de 150µl du surnageant (phase aqueuse) contenant les métabolites est alors récupéré et stocké à -20°C avant analyse.

iii) Dérivation et identification des composés

Les extraits sont évaporés sous vide (Speed Vac Concentrator, MiVac, Genevac Ltd., Ipswich, England) à température ambiante. Les résidus sont alors repris dans 15µL de méthoxyamine de pyridine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) que l'on laisse à 40°C pendant 1,5 heure et auxquels on ajoute 15µL de MSTFA (bis (triméthylsilyl)trifluoroacétamide, Sigma) à 37°C pendant 30 min. La méthoxyamine de pyridine permet de casser les composés cycliques tandis que le MSTFA (un hydrogène actif est remplacé par un groupe alkylsilyl) rend les composés volatiles. Les solutés sont alors séparés, identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'intégration et la détermination des pics des chromatogrammes sont réalisées sous le logiciel Xcalibur™

v2.0.7 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Les concentrations des métabolites sont déterminées en utilisant les courbes de calibration des composés de référence. L'arabinose est utilisé comme standard interne.

2.2.3) Analyse des hormones ecdystéroïdes

Pour chaque modalité étudiée, deux moustiques ont été regroupés pour constituer un échantillon, et chaque échantillon a été réalisé en deux réplicats. Les échantillons ont été lyophilisés pendant 72 h (Lyovac™ GT3) et pesés à l'aide d'une micro-balance (Mettler Toledo GmbH©, Greinfense, Switzerland, d= 0,1 µg, max= 2,1 g) et broyés dans 250 µl de méthanol froid (-20°C), au «bead-beating» à 25 agitations par seconde pendant 1,5 min. Après centrifugation à 8000 g pendant 5 min à 4°C, 200 µl du surnageant sont prélevés auxquels on ajoute 250µl d'un mélange de méthanol: eau ultrapure (70/30) froid (- 20°C). Les tubes sont vigoureusement agités au vortex et centrifugés à 8000 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et concentré sous vide, puis stocké à -80°C. Les extraits sont alors envoyés dans de la carboglace à l'Université de Paris 6 (collaboration avec Dr. Catherine Blais, UPMC – UMR 1272 PISC, Equipe Physiologie de l'Insecte - Signalisation et communication) pour des dosages immunoenzymatiques (EIA) des hormones ecdystéroïdes.

2.2.4) Analyse morphologique des spiracles par microscopie électronique à balayage (MEB)

Cette étude a été réalisée sur les moustiques élevés dans les enceintes climatiques. Les échantillons (femelles de 10 jours) préservés dans l'éthanol à 70%, sont déshydratés par des bains successifs (environ 30 min chacun) de concentration croissante d'éthanol (80, 90, 95 et 100%), puis à l'acétone (Gothe and Schöl 1992). Ils sont ensuite séchés en appliquant aux échantillons une température et une pression de plus en plus élevées, jusqu'à ce que le liquide contenu dans les moustiques se transforme en gaz sans endommager les tissus. L'intégrité des structures cellulaires est ainsi préservée. Cette étape, appelée déshydratation au point critique, utilise du CO₂ liquide dans un appareil de séchage (Balzers Union FL-9496 Balzers/Furstentum Liechtenstein, Allemagne). Les échantillons sont observés au microscope électronique à balayage (JEOL SJS-6301F, Japan) après une étape de métallisation à l'or-palladium par pulvérisation cathodique au sputter (FINE COAT ion sputter JFC-1100, JEOL, Japon).

2.3) Approche en conditions semi-naturelles: études *in situ* de la dynamique des populations d'anophèles dans une serre grillagée

2.3.1) Construction et aménagement de la serre

La serre grillagée 15 x 8 x 4,5 m (L x l x h) (Figure 12A) a été construite en 2010 en bordure de la zone rizicole de Bama (quartier VK7). L'entrée de la serre est constituée d'un sas de sécurité permettant d'éviter le passage des moustiques. La serre a été aménagée en y reproduisant l'écosystème environnant (Knols et al. 2002). Cinq gîtes larvaires (diamètre: 30 cm, profondeur: 20 cm) ont été construits à l'aide de bâches plastiques enfouies dans le sol afin d'étanchéifier la structure. L'alimentation en eau de ces gîtes se fait à partir de l'eau des pluies recueillies dans des cuves munies d'entonnoir et préalablement filtrée. Elle est arrêtée en fin décembre au moment où les gîtes environnants commencent à s'assécher. Nous avons introduit des espèces de plantes trouvées classiquement dans la zone comme source de repas sucré pour les moustiques (Gouagna et al. 2010): *Alamanda violacea* (Apocynaceae), *Banana musa* (Musaceae), *Bougainvillae glabra 'Variegata'* (Nyctaginaceae), *Carica papay* (Caricaceae), *Cassia sieberiana* DC, *Khaya grandifoliola* (Meliaceae), *Lantana camara* (Verbenaceae), *Mangifera indica* (Anacardiaceae), *Thevetia neriifolia* (Apocynaceae), *Zea maiz*.

Des canaris et des parpaings ont été placés en plusieurs points de la serre pour offrir des gîtes potentiels de repos aux moustiques. Des marqueurs visuels d'essaimage ont aussi été disposés pour la formation des essaims. Une case circulaire y a été construite selon les modèles d'habitation locale (diamètre: 2,45 m, hauteur: 1,8 m). Le mur est en banco avec un toit conique fait de chaumes. Un veau est introduit dans la serre grillagée chaque nuit comme source de repas sanguin pour les femelles. Les conditions climatiques (température, humidité, rayonnement) à l'intérieur de la serre et à l'intérieur de la case en banco sont enregistrées en continu par des stations météorologiques de type Vantage Pro2. Enfin, les moustiques (F0) sont introduits dans la serre pendant la saison des pluies. Ces moustiques sont issus des femelles gravides collectées à l'intérieur des maisons à Bama et à Soumousso. Elles sont mises en pondoir individuel à l'intérieur de la serre. Après la ponte, les femelles sont tuées et identifiées par PCR (Santolamazza et al. 2008) et les œufs ou larves sont regroupés par espèce dans des bassines et élevés selon les procédures d'usage de l'insectarium jusqu'à l'émergence des adultes. Le jour après l'émergence, mâles et femelles sont comptés et lâchés dans la serre à partir du point central.

2.3.2) Suivi actif des populations d'anophèles

Des visites régulières (deux fois par semaine) sont effectuées dans la serre pour suivre la dynamique des populations introduites. Les adultes au repos sont recherchés pendant un temps fixe (20 min) tout au long de l'année à l'intérieur de la serre (gîtes de repos), de l'abri-veau et de la case en banco. La formation des essaims au crépuscule est aussi reportée. Les gîtes larvaires sont inspectés et des prélèvements de larves sont effectués tous les 15 jours. Les spécimens collectés sont identifiés par PCR (Santolamazza et al. 2008).

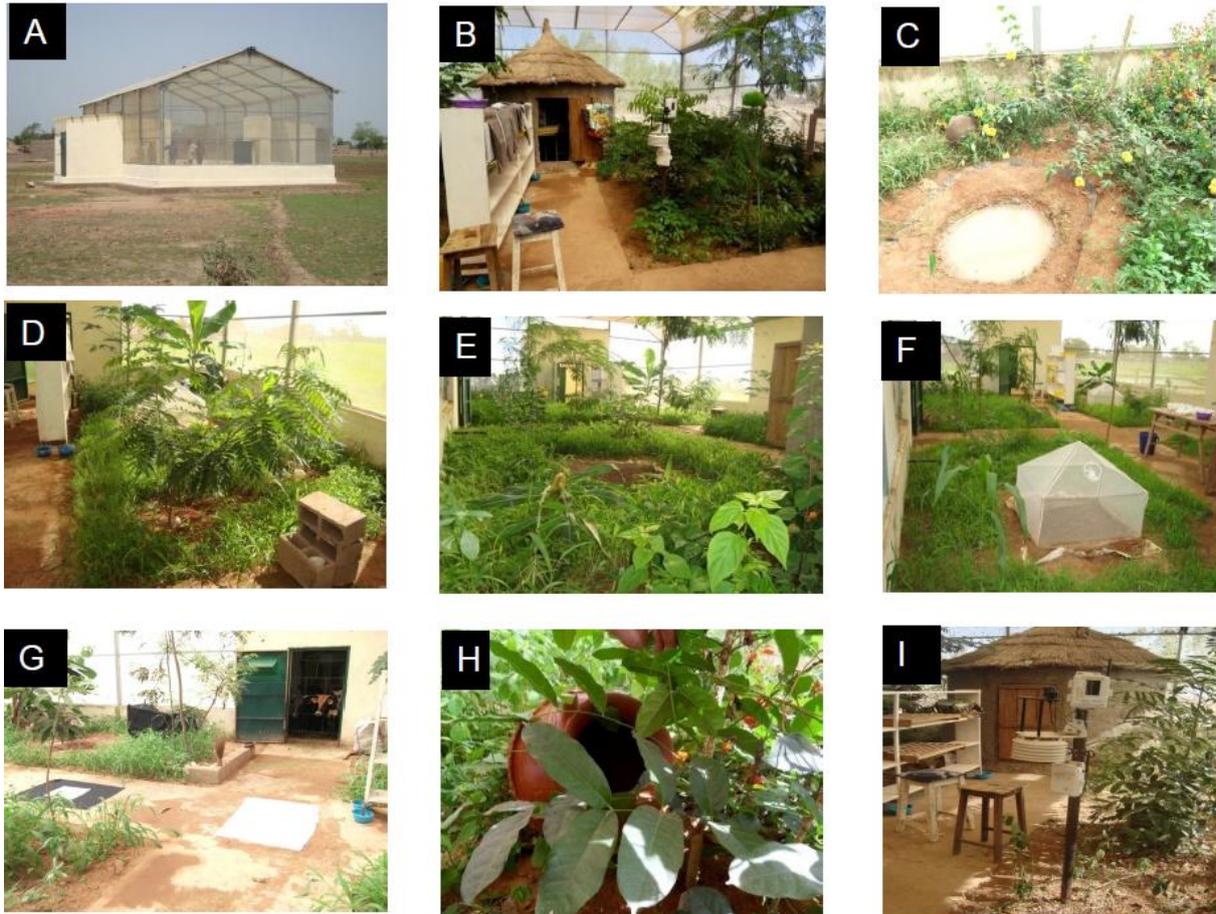


Figure 12: Photographies du système semi-naturel (malariasphere) : structure externe (A), case en banco (B), gîte larvaire (C), gîtes de repos (C, D, H), végétation (de B à I), abri pour le veau et marqueurs d'essaimage (G), station météorologique et dispositif d'élevage (I) (Photo Mamaï Wadaka).

2.4) Analyses statistiques des données

Pour comparer les différences de dissociation gonotrophique ou d'accumulation de graisse sous-cuticulaire, nous avons utilisé le test des proportions *prop.test* du logiciel statistique R 2.13.1. Quant aux analyses morphométriques, le logiciel «CLIC» a été utilisé. Les différences

entre les espèces et saisons ont été analysées en comparant par un t-test implémenté dans module VAR du logiciel CLIC. Les moyennes et les variances des tailles ont été obtenues après correction de Bonferonni.

Afin d'exploiter les données issues des analyses des métabolites en GC-MS, les analyses multivariées ont été réalisées grâce au logiciel R 2.13.1 (R Development Core Team 2008; Thioulouse et al. 1997). Au vu du nombre de composés identifiés par chromatographie à phase gazeuse (35 composés), des analyses multivariées (analyse factorielle discriminante: AFD) ont été nécessaires afin d'étudier la distribution et la structuration des composés. Le but de la méthode est de réduire le nombre de dimensions des données, en recherchant celles suivant lesquelles les classes se séparent le mieux. Une analyse de variance multivariées à plusieurs facteurs, MANOVA, a été utilisée afin de vérifier l'existence de variations significatives du profil métabolique et d'identifier la présence d'interactions entre les différents facteurs.

Quant à l'analyse des ecdystéroïdes et des réserves nutritionnelles, nous avons utilisé le logiciel statistique GraphPad Prism. Une ANOVA suivie d'une procédure *post hoc* de Tukey a été utilisée au seuil $\alpha = 5\%$ pour comparer deux à deux les groupes pour les dosages des ecdystéroïdes, protéines, sucres, glycogènes, lipides. La normalité et l'homoscédasticité des données ont été vérifiées par les tests de Kolmogorov- Smirnov et de Bartlett, respectivement.

2.5) Synthèse des activités réalisées au cours de cette thèse

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont resumés dans le tableau II ci-dessous qui présente les différentes techniques réalisées en fonction des approches.

Tableau II: Synthèse des différentes activités et techniques en fonction des approches

Approches	Moustiques utilisées et collectes	Activités ou techniques menées
Approche en conditions naturelles	i) Collecte sur le terrain des larves (L3 et L4) et pupes) d' <i>An. gambiae</i> s.l., élevage <i>in situ</i> dans les cages de transplantation, suivi de l'élevage des adultes en conditions naturelles. Collecte et conditionnement des femelles au 14 ^{ème} jour après émergence	<ul style="list-style-type: none"> - Dissection des ovaires (développement ovarien) - Dissection pour observation du corps gras - Dissection des pattes (identification par PCR) - Dissection spermathèque (statut d'insémination) - Dissection des ailes (morphométrie géométrique)
	ii) Collecte des adultes émergents à la surface des gîtes	Dosages des réserves nutritives: protéines, lipides, sucres et glycogène
		Mesure des paramètres environnementaux dans les sites d'études
Approche en conditions contrôlées	i) Elevage de moustiques à partir des colonies d' <i>An. gambiae</i> s.l. de laboratoire dans les enceintes climatiques. ii) Collecte des imagos mâles et femelles 1h et 24h après émergence et femelles de 10 jours	<ul style="list-style-type: none"> - Profilage métabolomique par GC-MS - Analyse d'hormones ecdystéroïdes par EIA - Observation des spiracles sous MEB
Approche en conditions semi-naturelles	Les moustiques (F0) issus des femelles gravides collectées à l'intérieur des maisons à Bama et à Soumouso sont introduits dans la serre	<ul style="list-style-type: none"> - Aménagement et ensemencement de la serre - Suivi des populations au cours du temps - Mesure des paramètres environnementaux à l'intérieur de la serre et de la case en banco

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE A: Physiologie et traits morphométriques chez les populations naturelles d'*An. gambiae* s.l. au début de la saison sèche

Les résultats de cette étude sont en liaison avec l'article:

Mouline K., Mamai W., Agnew P., Tchonfienet M., Brengues C., Dabire KR., Robert V., Simard F. (2012) Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med. Vet. Entomol* 26: 447–454.

1.1) Introduction

En Afrique Sub-saharienne, la saison sèche est une période contraignante pour les insectes de tous genres étant donné les conditions drastiques d'humidité (parfois < 10%) et de température (parfois > 35°C) auxquelles ils sont soumis. Pour les anophèles en particulier, se rajoutent à ces stress abiotiques la rareté des ressources nectarifères et surtout l'assèchement des gîtes larvaires de type temporaire. Cette période, qui peut sous certaines latitudes durer jusqu'à 9 mois, impose aux organismes de développer des stratégies de survie adaptées, qu'ils mettent en place à l'approche des conditions défavorables. Ainsi, les insectes destinés à entrer dans un état de diapause ou de migration modifient-ils leur physiologie en amont de la période défavorable, pendant la phase dite préparatoire. Des modifications de la physiologie de la reproduction (dissociation gonotrophique), de la morphologie alaire, et de l'allocation des ressources énergétiques sont parmi les modifications les plus couramment rencontrées chez les insectes (Tauber et al. 1986, Danks 1987, Denlinger et al. 2005).

Les travaux présentés dans ce chapitre visent à décrire les phénotypes physiologiques, morphologiques et biochimiques exprimés par les populations naturelles de moustiques du complexe *Anopheles gambiae* s.l. pendant la période de transition entre la saison des pluies et la saison sèche et de les mettre en lien avec les variations des paramètres environnementaux (température, humidité) mesurées sur le terrain. Notre étude s'est déroulée sur deux années consécutives à Bama (village où les populations d'anophèles sont permanentes) et à Soumouso (où les populations d'anophèles sont temporaires). Sur des moustiques collectés et élevés sur le terrain, nous avons recherché les symptômes physiologiques pouvant indiquer la mise en place de stratégies de survie. Nous avons travaillé sur des moustiques prélevés pendant la saison des pluies, et pendant la phase de transition entre la saison des pluies et la saison sèche, pour laquelle nous faisons l'hypothèse que les différentes reprogrammations physiologiques nécessaires à la survie des organismes à plus ou moins long terme pendant la

saison sèche sont mises en place. Les protocoles de collecte, de dissection et d'analyses morphométriques et biochimiques précédemment décrits dans le chapitre «matériel et méthodes», sont succinctement rappelés au cours de ce chapitre.

1.2) Résultats

1.2.1) Paramètres climatiques

La figure 13 présente l'évolution des paramètres environnementaux (température, humidité relative et pluviométrie) mesurés en continu à Bama pendant toute la période de ma thèse (voir le chapitre Matériel et Méthodes). Comme attendu, la zone est soumise à des régimes fluctuants de température et d'hygrométrie, dans lesquels nous avons défini 3 profils: (i) la saison des pluies, de mi-Juin à mi-October, qui concentre la grande majorité de la pluviométrie annuelle (environ 740 mm) et présente des écarts de températures et d'humidité relative moyennes d'amplitude moyenne (entre 22,03 et 34,81°C pour la température et entre 50 et 97 % pour l'hygrométrie); (ii) la période de transition entre la saison des pluies et la saison sèche (Novembre/Décembre) ou saison sèche froide, où les écarts des paramètres thermohygrométriques (minima et maxima journaliers) sont maximaux atteignant des valeurs extrêmes importantes, pour la température (12,3 - 34,58°C) et pour l'humidité relative (10 - 93 %). La forte amplitude thermique mesurée est due aux températures nocturnes qui sont particulièrement fraîches pendant cette période (jusqu'à 10°C parfois); et (iii) la saison sèche chaude, avec des records de températures (38,43°C), de faibles hygrométries (10%), et une plus faible amplitude thermique que pendant la période de transition (dû notamment à des températures nocturnes qui se réchauffent, (Figure 13). Sur le terrain, c'est pendant la période de transition entre saison des pluies et saison sèche que nous observons la disparition de la majorité des gîtes larvaires dans nos deux sites d'étude (voir Gimonneau et al. 2013, pour Bama, et observations personnelles).

1.2.2) Recherche des symptômes de stratégies de survie dans les populations naturelles adultes

Nous avons collecté des larves de stade 4 et des nymphes dans les localités de Bama et Soumousso pendant la période de saison des pluies (de fin Aout à mi-October) et pendant la période de transition entre la saison des pluies et la saison sèche (de mi-October à fin Décembre). Bien que la saison des pluies batte son plein dès le mois de juillet, les échantillonnages en Juillet et en Août sont particulièrement difficiles: très faibles densités

dans les gîtes de grande taille et trop nombreux, et accessibilité parfois difficile de certains gîtes. Les larves collectées ont été élevées *in situ* dans des cages de transplantation baignant dans des gîtes naturels. Les adultes émergents sont rassemblés dans des cages, et élevés sur le terrain jusqu'à leur quatorzième jour. Les moustiques reçoivent 5 repas sanguins (à J2, J4, J6, J8 et J10) et ont accès *ad libitum* à une solution de glucose concentrée à 10% (voir le chapitre Matériel et Méthodes pour plus de détails).

Cette approche de terrain longitudinale, prospective et descriptive, a ainsi été menée entre 2010 et 2012. Nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés sur le terrain, avec notamment la perte de tout notre effectif de saison des pluies (en 2010) dû à la mortalité des moustiques nourris sur des lapins venant d'être traités. Nous avons également dû ajuster le choix de nos localités d'échantillonnage entre 2010 et 2011, afin de nous concentrer sur Bama et Soumouso uniquement étant donné la difficulté à mettre en évidence le caractère permanent des populations d'anophèles de certaines localités échantillonnées en 2010 pourtant proches de Bama. Enfin, après une première analyse de nos données présentées ci-après, nous avons réalisé des échantillonnages en 2012-2013 afin de compléter notre jeu de données, dont les dissections sont en cours.

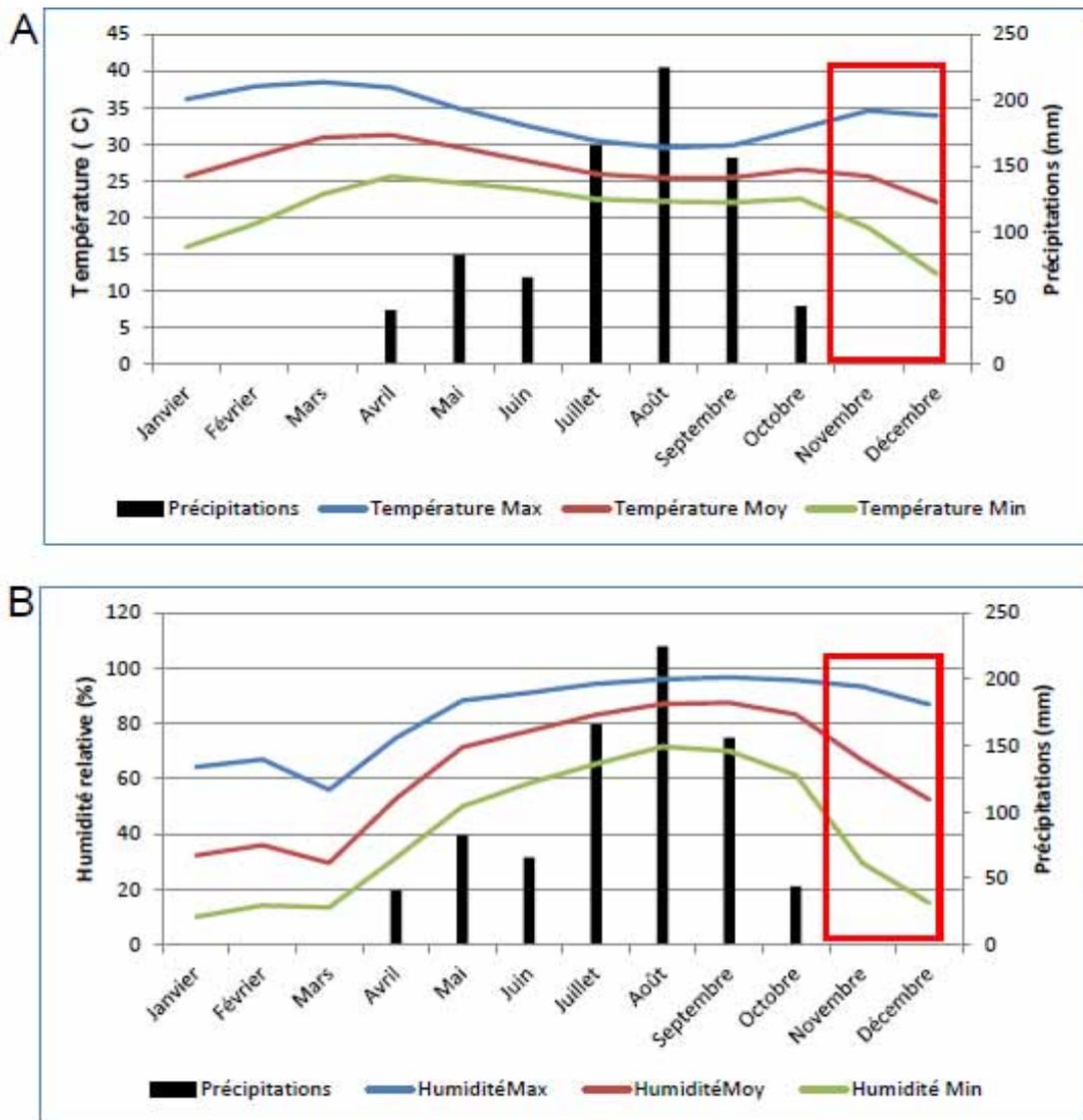


Figure 13: Evolution des paramètres environnementaux enregistrés sur le terrain au cours des années 2009, 2010, 2011 (A= température, B= humidité relative) dans la localité de Bama. L'encadré rouge représente la saison sèche froide, période de transition entre la saison des pluies et la saison sèche chaude.

1.2.3) Effectifs et composition spécifique des populations naturelles

Notre effectif de saison des pluies lors de la première année a été décimé dû à la mortalité des moustiques nourris sur des lapins venant d'être traités. Du huit novembre 2010 au quatre janvier 2011, 35433 larves et pupes ont été collectées dans deux sites (Bama et environs, Soumouso et environs). 1893 femelles adultes collectées au 14^e jour après avoir pris cinq repas de sang ont été identifiées par PCR. Pour la deuxième année consécutive, du premier septembre au 21 décembre 2011, nous nous sommes concentrés cette fois uniquement sur VK7 et Soumouso pour rester sur nos critères de sites à caractère permanent et temporaire.

39016 larves ont été collectées. 1946 femelles de 14 jours ont été collectées et identifiées par PCR. Après dissection de la spermathèque (voir le chapitre Matériel et Méthodes) de plus de 300 femelles prises au hasard dans notre échantillonnage, il s'avère que 98% des femelles identifiées sont inséminées. Les proportions des femelles des différentes espèces disséquées par année et par localité sont reportées dans le tableau III ci-dessous. Comme attendu, *An. coluzzii* prédomine à Bama, tandis qu'*An. gambiae* est majoritaire dans les collectes faites à Soumouso.

Tableau III: Fréquences relatives (%) et effectifs des femelles d'*An. gambiae* s.l. dans les deux sites d'étude (2010-2012)

Période	Espèces	Bama(N=effectif)	Soumouso (N=effectif)	Total
Du 08/11/2010 au 04/01/2011	<i>An. coluzzii</i>	52,56 (N= 472)	18,29 (N=182)	34,55 (N= 654)
	<i>An. gambiae</i>	30,62 (N= 275)	49,15 (N= 489)	40,36 (N= 764)
	<i>An. arabiensis</i>	16,82 (N= 151)	32,56 (N= 324)	25,09 (N= 475)
	Total	100 (N= 898)	100 (N= 995)	100 (N= 1893)
Du 01/09/ au 21/12/2011	<i>An. coluzzii</i>	100 (N=803)	21,87 (N= 250)	33,31 (N= 1053)
	<i>An. gambiae</i>	0	48,47 (N= 554)	41,37 (N= 554)
	<i>An. arabiensis</i>	0	29,66 (N= 339)	25,32 (N= 339)
	Total	100 (N= 803)	100 (N= 1143)	100 (N=1946)

1.2.4) Effet des saisons sur le développement ovarien et l'accumulation des graisses sous-cuticulaires

Les résultats de l'examen de la maturation ovarienne et de l'accumulation des graisses sous-cuticulaires des femelles disséquées sont exprimés graphiquement dans les figures 14 et 15, respectivement. Les analyses statistiques quant à elles ont été faites en utilisant le test des proportions *prop.test* du logiciel statistique R et sont consignées dans les tableaux IV et V. Concentré uniquement à VK7, nous n'avons logiquement pas trouvé les espèces *An. gambiae* et *An. arabiensis* à Bama, ce qui est à l'origine du manque de données pour ces deux espèces en 2011. Toutes localités et saisons confondues, il ressort qu'une proportion importante des femelles (29 à 80 % dans les deux localités étudiées), bien qu'ayant pris plusieurs repas de sang, ne développent pas leurs ovaires au-delà du stade 2 de Christopher (≤ 2) (Figure 14). Ce phénomène est appelé dissociation gonotrophique. L'incidence de ce phénomène est significativement différente entre les spécimens prélevés au niveau du site permanent (Bama) et du site temporaire (Soumouso). En 2010 à Soumouso et ses environs, les proportions de femelles ayant les ovocytes bloqués au stade prégravidé sont significativement supérieures à

celles observées à Bama et ses environs ($p < 0,05$, *prop.test*, tableau IV). De manière générale, *An. coluzzii* est l'espèce qui développe plus efficacement ses ovocytes au-delà du stade 2 comparé à *An. gambiae* et *An. arabiensis* (tableau IV). De manière intéressante, un «effet saison» significatif est observé chez *An. coluzzii* (tableau IV) à Soumousso. Aucun effet saisonnier sur le phénotype de dissociation gonotrophique n'est par contre observé chez *An. gambiae* ou *An. arabiensis* à Soumousso, ou chez *An. coluzzii* de Bama.

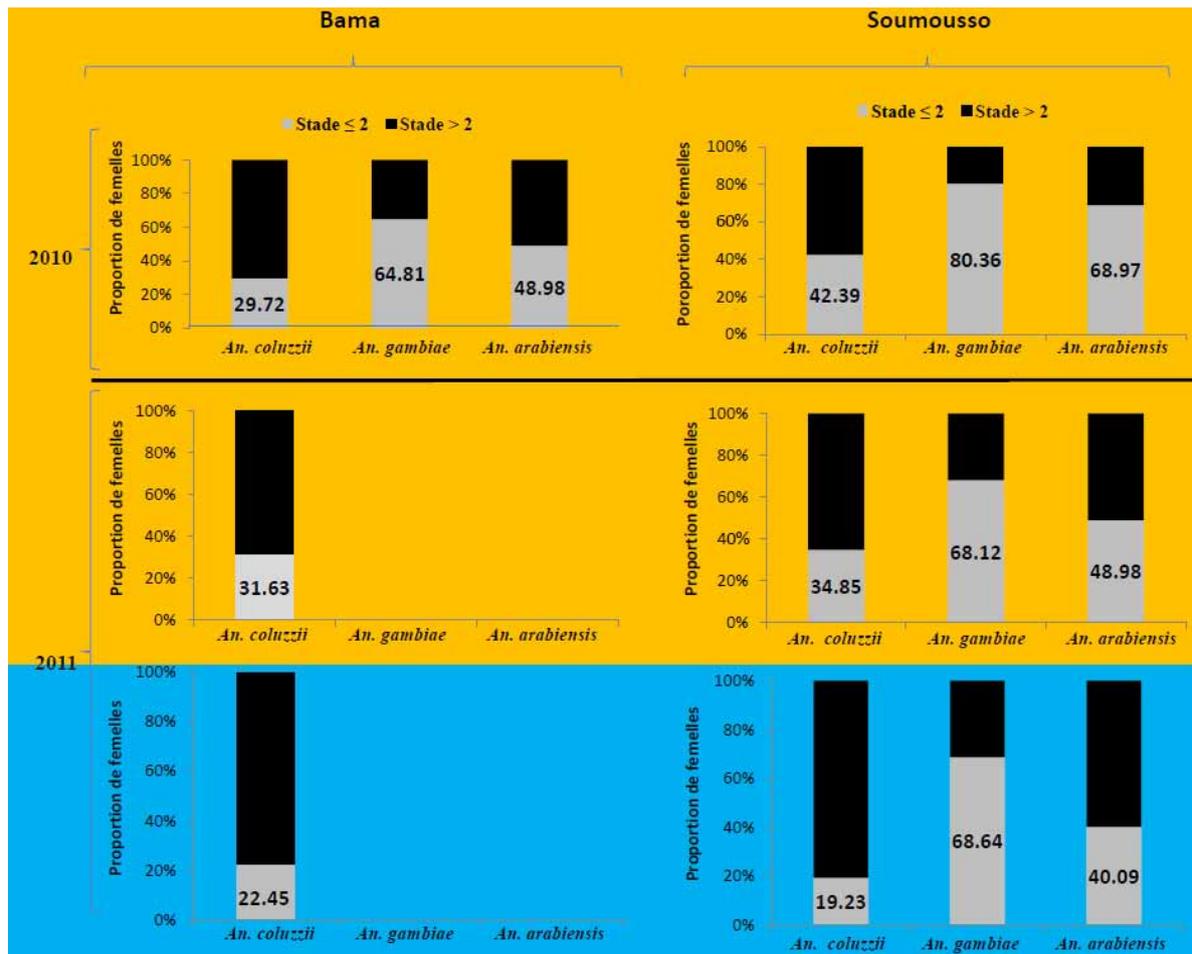


Figure 14: Evolution du stade de maturation des oocystes des femelles d'*An. gambiae* s.l. élevées dans les conditions de début de saison sèche (orange) et saison des pluies (bleu) montrant des différences de niveau de discordance gonotrophique entre *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*.

Tableau IV: Probabilités associées au *prop.test*, comparant les effets de saison, localité et d'espèce sur le développement ovarien d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G) et *An. arabiensis* (Ar); SS = saison sèche, SP = saison des pluies, * test significatif au seuil $p < 0,05$.

<i>Effet testé</i>	<i>Combinaisons</i>	<i>P-value (prop.test)</i>	<i>Lieu et/ou année de collecte</i>
Saison	C. SS / C. SP	0,0877	Bama (2011/2011)
	C. SS / C.SP	0.04679 *	Soumouso (2011)
	G. SS / G. SP	0.9794	Soumouso (2011)
	Ar. SS / Ar. SP	0.1742	Soumouso (2011)
Espèce	C. SS / G. SS	4.156e-11 *	Soumouso (2011)
	C. SS / Ar. SS	0.02684 *	Soumouso (2011)
	G. SS / Ar. SS	0.002012 *	Soumouso (2011)
	C. SP / G. SP	5.071e-11*	Soumouso (2011)
	C. SP / Ar. SP	0.007857 *	Soumouso (2011)
	G. SP / Ar. SP	2.18e-10 *	Soumouso (2011)
	C. SS / G. SS	1.182e-06 *	Bama (2010)
	C. SS / Ar. SS	0.01163 *	Bama (2010)
	G. SS / Ar. SS	0.1547	Bama (2010)
Localité (Bama/Soumouso)	C. (SS)	0.03059 *	2010
	G. (SS)	0.03067 *	2010
	Ar. (SS)	0.03411 *	2010
	C. (SP)	0.7559	2011

Toutes espèces confondues, il est à noter une accumulation significative de lipides (formant une couche sous-cuticulaire = hypertrophie du corps gras) ou sous forme de gouttelettes visibles à la dissection à l'approche de la saison sèche (Figure 15, tableau V), pour les 2 sites. Il est aussi à noter que les mêmes femelles qui ne développent pas leurs ovocytes au-delà du stade 2 de Christopher sont celles qui, en proportion, accumulent le plus de lipides sous forme de couche sous-cuticulaire ou de gouttelettes lipidiques visibles (test de Fisher montrant la corrélation entre dissociation gonotrophique et présence de graisses et gouttelettes lipidiques, $p < 0,05$). Cette tendance est observée chez les 3 espèces et dans les deux localités étudiées, avec *An. gambiae* présentant les plus grandes proportions de ce phénotype.

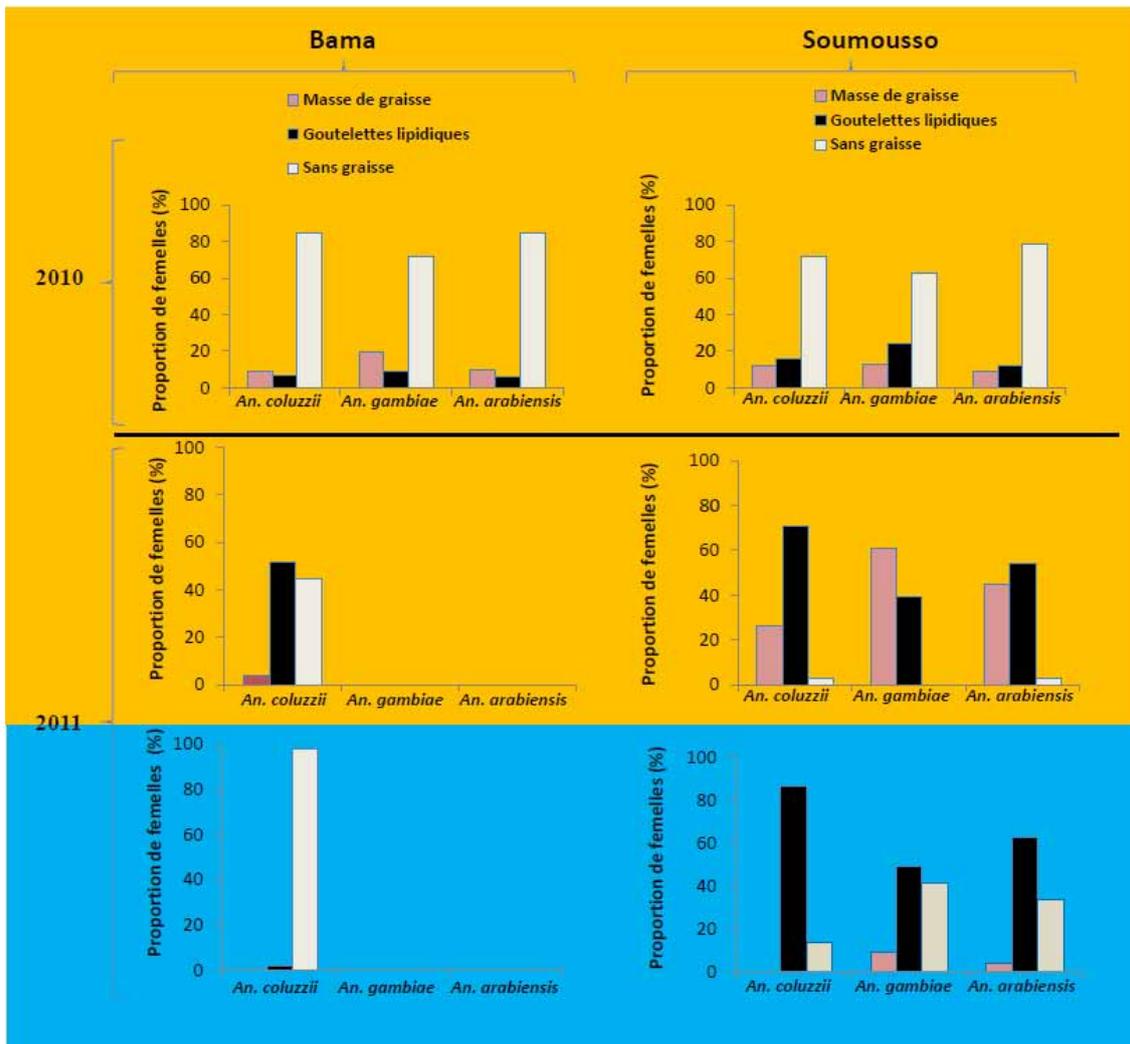


Figure 15: Stockage des graisses chez les femelles d'*An. gambiae* s.l. élevées dans les conditions de début de la saison sèche (orange) et saison des pluies (bleu) mettant en évidence des différences d'allocation des ressources nutritives entre *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*

Tableau V: Probabilités associées au *prop.test*, comparant les effets de saison, localité et d'espèce sur l'hypertrophie du corps gras (accumulation de graisse sous-cuticulaire) d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G) et *An. arabiensis* (Ar); SS = saison sèche, SP = saison des pluies, * test significatif au seuil $p < 0,05$

<i>Effet testé</i>	<i>Combinaisons</i>	<i>P-value (test de Fisher)</i>	<i>Lieu et/ou année de collecte</i>
Saison	C. SS / C. SP	< 2.2e-16 *	Bama (2011/2011)
	C. SS / C.SP	7.084e-05 *	Soumouso (2011)
	G. SS / G. SP	< 2.2e-16 *	Soumouso (2011)
	Ar. SS / Ar. SP	< 2.2e-16 *	Soumouso (2011)
Espèce	C. SS / G. SS	6.149e-12 *	Soumouso (2011)
	C. SS / Ar. SS	0.002194 *	Soumouso (2011)
	G. SS / Ar. SS	0.01245 *	Soumouso (2011)
	C. SP / G. SP	0.01998 *	Soumouso (2011)
	C. SP / Ar. SP	0.2908	Soumouso (2011)
	G. SP / Ar. SP	0.04254 *	Soumouso (2011)
	C. SS / G. SS	0.06136	Bama (2010)
	C. SS / Ar. SS	1	Bama (2010)
	G. SS / Ar. SS	0.1598	Bama (2010)
Localité (Bama/Soumouso)	C. (SS)	0.5833	2010
	G. (SS)	0.06651	2010
	Ar. (SS)	0.1763	2010
	C. (SP)	< 2.2e-16 *	2011

1.2.5) Morphométrie géométrique des ailes

Les individus utilisés ici sont ceux collectés sur le terrain à Soumouso en 2011 et élevés *in situ* pour l'observation des phénotypes de développement ovarien et d'accumulation de graisse sous-cuticulaire (voir chapitre «Matériel et méthodes»). Nous avons classé nos spécimens par phénotypes d'accumulation de lipides sous forme de graisse sous-cuticulaire et de développement ovarien. Pour des problèmes d'effectifs dans les autres phénotypes, nous nous sommes concentrés uniquement sur les spécimens «saison sèche avec développement de graisse et dissociation gonotrophique», car supposés avoir initié des stratégies de survie pour lutter contre la dessiccation et la famine et «saison des pluies sans développement ovarien et sans graisse sous cuticulaire», supposés être dans un régime de reproduction maximal.

i) Taille des ailes

La figure 16 illustre la distribution de la taille des ailes des femelles représentées par les tailles centroïdes (Centroid Size, CS, voir le chapitre Matériel et méthodes) des trois espèces

étudiées: *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, et *An. gambiae*. De manière générale, il ressort que les moustiques soumis aux conditions de saison sèche (SS) ont des ailes plus grandes que ceux élevés en conditions de saison des pluies (SP) (Figure 16, tableau VI). Les écarts interquartiles (90% des effectifs) des groupes en conditions SS (en rouge) sont plus étalés et allongés vers les valeurs élevées de tailles centroïdes. Les spécimens SS ont en commun les phénotypes de discordance gonotrophique (ovocytes ≤ 2 stade de Christopher) et accumulation de graisse sous-cuticulaire dans le corps gras ou sous forme de gouttelettes lipidiques. De manière particulière, la taille des ailes augmente significativement dans ce groupe phénotypique chez *An. coluzzii* seulement (t-test, $p < 0,003$ pour *An. coluzzii*, $p < 0,31$ pour *An. gambiae*, $p < 0,44$ pour *An. arabiensis*). Si l'on compare les trois espèces dans chacune des conditions, les femelles d'*An. arabiensis* sont significativement plus grandes que les femelles d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* en conditions SP. Par contre en conditions SS, les femelles d'*An. gambiae* sont significativement plus petites que les femelles d'*An. arabiensis* et d'*An. coluzzii*. L'ensemble des analyses statistiques sur les différentes comparaisons est consigné dans le tableau VI.

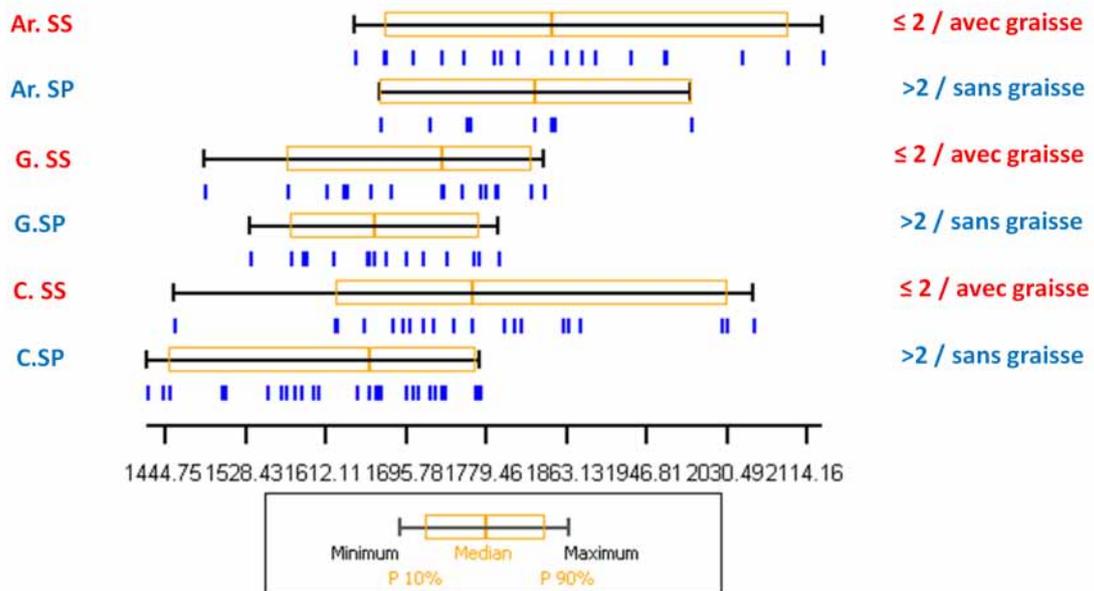


Figure 16: Variation des tailles centroïdes des ailes (exprimées en pixels) d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G) et *An. arabiensis* (Ar) collectés en saison des pluies (SP) et début de saison sèche (SS). Médiane et dispersion de la variable de taille «tailles centroïdes»

Tableau VI: Probabilités comparant l'effet des saisons sur la taille des femelles d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G) et *An. arabiensis* (Ar). SS = saison sèche, SP = saison des pluies, * = test significatif au seuil de $p < 0,05$, t-test.

Eléments de comparaison	Moyennes comparées (valeurs de p associées)
C.SP / C. SS	<0,003*
C.SP / G. SP	0,2162
C.SP / G. SS	0,0280*
C.SP / Ar. SP	0,001*
C.SP / Ar. SS	< 0,003*
C. SS / G. SP	0,017*
C. SS / G. SS	0,092
C. SS / Ar. SP	0,597
C. SS / Ar. SS	0,137
G. SP / G. SS	0,316
G. SP / Ar. SP	0,001*
G. SP / Ar. SS	<0,003*
G. SS / Ar. SP	0,026*
G. SS / Ar. SS	0,001*
Ar. SP / Ar. SS	0,4408

ii) *Forme des ailes*

La conformation des points de repères ou «landmarks», caractérisée par les coordonnées (x,y) de chacun des points, est supposée contenir l'information concernant la forme de l'objet initial. Les conformations des individus du même groupe sont superposées les unes aux autres. Enfin, la superposition des conformations des différents groupes permet de visualiser la localisation de la variation de forme entre ces groupes. La forme des ailes, décrite par conformations moyennes superposées à partir des coordonnées résiduelles est présentée à la figure 18. Il n'y a pas de différence de forme entre les individus SS et SP et ceci quelque soit l'espèce considérée (Figure 17).

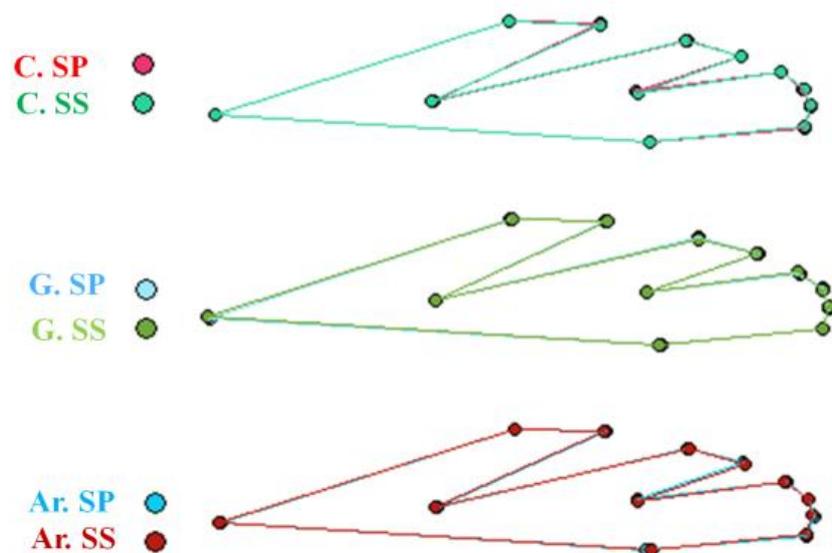


Figure 17: Superposition de la forme des ailes en saison sèche (SS) et saison des pluies (SP) chez les différentes espèces étudiées: *An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G) et *An. arabiensis* (Ar).

1.2.6) Variations des réserves énergétiques accumulées à l'émergence

L'intégration du stimulus ou des stimuli induisant la mise en place de stratégies de survie particulières s'effectue durant les stades de développement antérieurs à celui qui persiste sur le terrain (Denlinger 1986, Danks 1987, Denlinger 2002). Ainsi, étant donné que les anophèles persistent à l'état de femelles adultes (Holstein 1954, Omer et Cloudsley-Thompson 1970, Lehmann et al. 2010), les routages métaboliques doivent être programmés dès les stades aquatiques. Nous avons ainsi voulu savoir si l'allocation des ressources énergétiques était déjà visible à l'émergence, et si elle pouvait être informative par rapport aux stratégies de survie adoptées par les différentes espèces étudiées. Ainsi, comme décrit dans le chapitre «Matériel et méthodes», les moustiques sont collectés pendant la première heure de leur vie adulte, après émergence des gîtes larvaires en début de saison des pluies (juin), milieu de saison des pluies (août) et début de saison sèche (novembre).

Confronté à des problèmes d'effectif (pour deux espèces sur trois dans chacun des deux sites de collecte) après identification PCR, nous avons été conduits à poursuivre notre étude sur les individus d'*An. coluzzii* provenant exclusivement de Bama et *An. gambiae* exclusivement de Soumouso. 30 individus par mois, espèce et par localité ont été utilisés dans cette étude.

Anopheles arabiensis étant sous-représenté dans les deux sites, nous l'avons écarté de l'analyse. Plusieurs résultats se dégagent: chez *An. coluzzii*, les teneurs en protéines, lipides et glucides diminuent significativement en Août par rapport à Juin (figure 18), le glycogène restant stable (Figure 19). En Novembre, la teneur de tous les métabolites augmente de manière significative par rapports aux teneurs observées en Aout (ANOVA, $p < 0,005$). Chez *An. gambiae* les protéines, lipides et glucides restent stables au mois d'Août par rapport au mois de Juin. Au début de la saison sèche, les concentrations en lipides et glycogène demeurent stables, les glucides diminuent et les protéines augmentent significativement (Figure 18). Quand on compare les deux espèces, on observe de façon globale des réserves énergétiques plus importantes chez *An. coluzzii* en Novembre (début de saison sèche) et en Juin (début de saison des pluies).

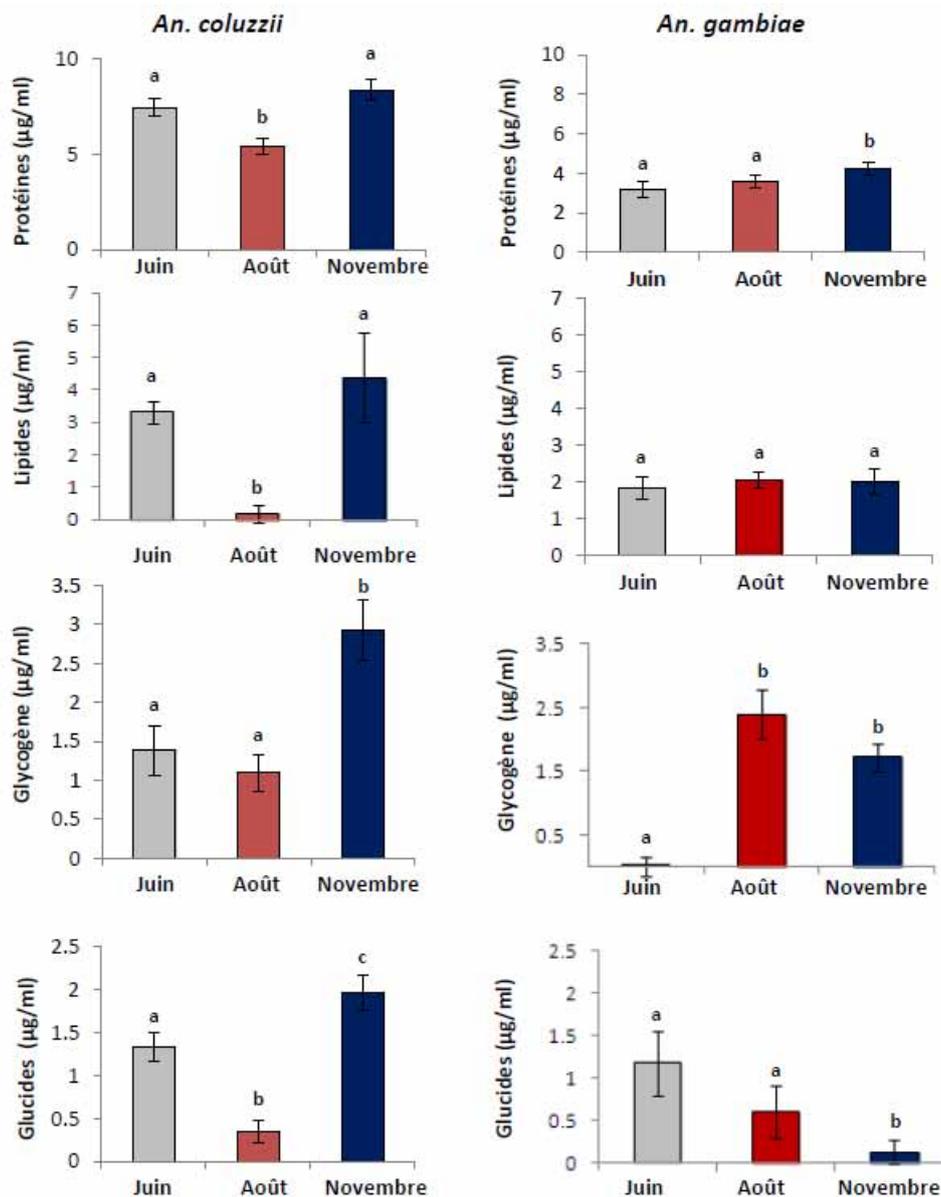


Figure 18: Teneurs en réserves énergétiques chez les femelles d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* collectées à l'émergence en début (Juin) et milieu (Août) de saison des pluies et au début de la saison sèche (Novembre). La présence de deux lettres différentes au-dessus des barres signifie qu'il y a une différence significative.

1.3) Discussion

Nous recherchions dans cette étude les symptômes physiologiques (dissociation gonotrophique et/ou hypertrophie du corps gras et/ou reroutage métabolique) et morphologiques (augmentation de la taille et/ou modification de la forme des ailes) de la mise en place d'une stratégie de survie en saison sèche par les espèces du complexe *An. gambiae*.

Discordance gonotrophique et accumulation des réserves énergétiques

Le cycle gonotrophique est la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez le moustique entre deux repas de sang successifs et incorpore la phase de maturation des ovaires consécutive à l'alimentation sanguine (Carnevale et Robert 2009). La concordance ou harmonie gonotrophique est ainsi la relation entre le repas de sang d'une femelle d'anophèle inséminée et le développement de ses ovaires (Washino 1977). Cette loi stipule que la prise d'un repas complet de sang par une femelle gonoactive est suffisante pour assurer le développement complet des œufs (Adam et al. 1964). Chez les femelles nullipares trouvées sur le terrain, le premier repas permet généralement l'évolution ovarienne jusqu'au stade II (stade prégravidé) alors que le second permet au développement de se poursuivre jusqu'à la maturité complète des œufs. Le terme dissociation gonotrophique désigne chez le moustique femelle, l'activité trophique (ingestion de sang) non accompagnée d'un développement ovarien (Washino 1977, Yaro et al. 2012). Nos résultats ont montré que malgré la prise de cinq repas de sang, des proportions différentes des femelles des trois espèces collectées maintiennent leurs ovaires bloqués au stade prégravidé quelle que soit la saison. De manière intéressante la proportion des dissociations gonotrophiques augmente significativement chez *An. coluzzii* à Soumouso en saison sèche. Une étude récente réalisée sur des moustiques collectés au repos dans les maisons en saison sèche dans une zone aride du Mali a montré qu'*An. coluzzii* montrait ce phénomène de dissociation gonotrophique non seulement en termes de développement des ovaires mais aussi en termes de ponte, les femelles bien qu'ayant développé leurs œufs ne pondaient pas (Yaro et al. 2012). Par ailleurs, des anciennes études ont démontré une dissociation gonotrophique chez les femelles d'*An. earlei* hibernants (Gallaway et Brust 1982) et d'*An. punctipennis* (Magnarelli 1979). Cependant, cette dissociation gonotrophique observée en 2010 chez *An. coluzzii* apparaît différente selon la localité étudiée. A Soumouso et ses environs, le niveau des ovocytes bloqués au stade prégravidé est significativement supérieur à celui observé à Bama et ses environs. Par ailleurs, dans cette même localité, la proportion d'individus d'*An. coluzzii* en dissociation gonotrophique n'augmente pas significativement pendant la saison sèche. Le contraire est observé à Soumouso. Ce village est un cas typique de savane humide; les gîtes larvaires sont uniquement dépendants des précipitations et l'activité de reproduction des vecteurs coïncide essentiellement avec la saison des pluies tandis que Bama est une zone de riziculture irriguée, les gîtes larvaires sont disponibles toute l'année, les moustiques aussi. Cette différence

phénotypique observée chez *An. coluzzii* entre site permanent et site temporaire témoigne de son extraordinaire adaptation à l'environnement humain et suggère sa capacité à s'adapter à différentes niches écologiques. La sélection naturelle, visant à maximiser la 'fitness' des organismes, favorisera la combinaison de traits qui est la mieux adaptée aux conditions écologiques et environnementales ambiantes. Cette particularité à coloniser les gîtes pérennes pourrait lui permettre de poursuivre sa reproduction en saison sèche. Ainsi dans les zones où les gîtes sont présents toute l'année, *An. coluzzii* investirait d'une part pour sa survie en accumulant des réserves nutritives et d'autre part maintiendrait sa reproduction. Par contre, là où les gîtes ne sont pas disponibles, une proportion importante d'individus de cette espèce serait capable de modifier sa physiologie vers un état de discordance gonotrophique qui rappelle l'état de diapause ovarienne. Les femelles d'*An. gambiae* ne semblent pas développer leurs ovaires efficacement quelle que soit la saison. Cet état a déjà été mis en évidence chez cette espèce en conditions d'insectarium comparée à *An. coluzzii* (Mouline et al. 2012). Une autre hypothèse serait que cette espèce, qui émerge avec moins de ressources énergétiques, compenserait ce déficit par une partie du sang ingéré. Enfin, l'hypothèse qu'*An. gambiae* serait plus sensible au stress qu'*An. coluzzii* et *An. arabiensis* n'est pas à exclure étant donné que même le montage des colonies de cette espèce en insectarium est très délicat.

D'un autre côté, en plus du phénomène de discordance gonotrophique, l'augmentation de la synthèse des lipides caractérisée principalement par l'hypertrophie du corps gras (matérialisé par une couche de graisse sous-cuticulaire), et par la présence de gouttelettes lipidiques fut observée chez les femelles des trois espèces avec *An. gambiae* présentant les plus grandes proportions de ce phénotype. Le corps gras chez les insectes holométaboles joue un rôle fondamental dans le stockage des lipides, glycogène et protéines. Un stockage important de lipides conduit à une hypertrophie du corps gras (Arrese et Soulages 2010) et ce mécanisme augmente la survie chez les femelles de *Culex pipiens pipiens* en hibernation (Arrese et Soulages 2010). Les réserves lipidiques constituent les plus importantes réserves utilisées par les insectes pendant la diapause (Hahn et Denlinger 2007) et sont également accumulées en cas de stress nutritif notamment chez la drosophile (Chippindale et al. 1996) mais aussi en cas de dessiccation chez *An. gambiae* (Gray et al. 2009). Dans la littérature, l'accumulation des réserves est décrite comme préalable à l'entrée en diapause chez plusieurs insectes (Danks 2006, Hahn et Denlinger 2007). La survie d'un individu est largement fonction de sa capacité à acquérir de l'énergie *via* la nourriture. Nous avons mis en évidence un métabolisme tourné vers l'accumulation de lipides, sucres, glycogène et protéines chez *An. coluzzii* au début de la

saison sèche, et ce dès l'émergence des adultes. Cet important stockage de réserves ferait écho aux capacités supérieures de cette espèce à résister au stress de la dessiccation (survie supérieure des adultes) comme l'ont montré Lee et al. (2009) et refléterait non seulement sa présence toute l'année sur le terrain à Bama (Baldet et al. 2003, Gimonneau et al. 2012b), mais aussi la préparation à la diapause d'une proportion variable des populations de cette espèce, en majorité dans les sites temporaires, comme le suggèrent nos résultats, et comme l'ont suggéré Lehmann et ses collaborateurs (Lehmann et al. 2010). Quant à *An. gambiae*, cette espèce est majoritaire en saison des pluies à Soumouso et disparaît en saison sèche. Bien qu'une couche importante de graisse sous-cuticulaire soit présente, les reroutages métaboliques ne sont pas tournés vers une augmentation de la synthèse des sucres et des protéines de sorte à supporter une période de jeûne prolongée, ce qui pourrait expliquer sa dynamique observée sur le terrain.

A la vue de nos résultats, nous ne pouvons séparer les hypothèses de diapause et de migration comme stratégies de survie adoptées par les différentes espèces de moustiques étudiées. L'hypertrophie du corps gras et le phénotype de dissociation gonotrophique ne sont pas exclusifs de l'état de diapause, et peuvent être rencontrés chez des individus qui se préparent à une migration à longue distance. Les réserves lipidiques pourraient alors être utilisées pour produire l'énergie nécessaire au vol des adultes, et l'accumulation des graisses sous-cuticulaires chez *An. gambiae*, *An. arabiensis* mais aussi *An. coluzzii* peut ainsi être reliée à une activité des femelles en vue de la migration vers des zones plus favorables. L'analyse des échanges gazeux respiratoires des différentes espèces soumises aux conditions de la saison sèche seront nécessaires pour déterminer quel type de stratégie est adopté par les différentes espèces. En effet, alors que l'activité métabolique est fortement ralentie chez les insectes entrant en diapause, celle-ci reste stable chez les individus se préparant à migrer (Hahn et Denlinger 2007).

Traits morphométriques

L'analyse des variables métriques des ailes est utilisée pour caractériser morphologiquement les individus et les populations au cours du temps. La forme et la taille des ailes d'un individu (phénotype), considérées comme des cibles de la sélection naturelle (Powell 1997), sont le résultat d'une interaction continue entre le génotype et l'environnement. De manière prévisible, il apparaît que la taille des individus collectés au début de la saison sèche augmente, particulièrement chez *An. coluzzii*. En effet, la taille centroïde est considérée

comme un estimateur plus informatif et efficace de la taille du corps comparée à l'étude traditionnelle de la longueur de l'aile (Jirakanjanakit et Dujardin 2005, Jirakanjanakit et al. 2007, Dujardin 2008). Cette augmentation significative de la taille observée chez *An. coluzzii* supporte l'hypothèse générale selon laquelle dans des environnements défavorables, la sélection naturelle favoriserait les phénotypes de grandes tailles, éventuellement à cause d'une capacité supérieure à résister à un déficit des ressources dans le milieu ou à leur capacité à accumuler plus de réserves énergétiques. Une autre hypothèse que l'on peut émettre sur la variabilité de la taille est celle de l'entrée en diapause d'une partie de la population d'*An. coluzzii*. En effet, Benoit et Denlinger, (2007) montrent que les individus destinés à la diapause ont des tailles plus importantes. Par ailleurs, s'il est admis que la taille des individus à l'émergence est proportionnelle à la qualité de la nutrition larvaire et les individus de grande taille résistent mieux à la dessiccation (Gray et Bradley 2005, Fouet et al. 2012), ce résultat reflèterait le statut métabolique de cette espèce, qui aurait accumulé d'importantes réserves énergétiques au début de la SS.

1.4) Conclusion partielle

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence des différences physiologiques et morphologiques révélatrices de la mise en place de stratégies de survie à l'approche de la saison sèche chez les différentes espèces du complexe *An. gambiae*. Ces réponses se manifestent par le phénomène de discordance gonotrophique (donc par une dépression de la reproduction), une hypertrophie du corps gras, une accumulation de réserves nutritives, et l'émergence d'individus de grande taille. Ces phénomènes sont plus marqués chez *An. coluzzii* et dans la zone de gîtes temporaires. Bien que les trois espèces présentent une hypertrophie du corps gras, nos données illustrent aussi bien qu'il existe des différences physiologiques et morphologiques entre les trois espèces majeures du paludisme au Burkina Faso pour répondre aux conditions stressantes de la saison sèche autant des données à prendre en compte dans la modélisation des risques épidémiologiques et la recherche des nouvelles cibles pour le contrôle des vecteurs.

PARTIE 2: Métabolomique et variations des concentrations d'hormones ecdystéroïdes chez *An.gambiae* s.l. exposés aux conditions stressantes de la saison sèche

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article:

Mamai W., Mouline K., Blais C., Larvor V., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Simard F., Renault D. 2014 Metabolomic and ecdysteroïd variation in *Anopheles gambiae* s.l mosquitoes exposed to the stressful conditions of the dry season in Burkina Faso, West Africa. *Physiological and Biochemical Zoology* .

2.1) Introduction

Les fluctuations saisonnières des paramètres environnementaux, comme la température, l'humidité relative et les précipitations, exposent périodiquement les populations d'insectes aux stress, impactant leur répartition géographique, et leur abondance (Su et Mulla 2001, Hill et al. 2011). Pour faire face à ces stress (thermique et/ou hydrique) des périodes défavorables, les insectes ajustent leur métabolisme et leur comportement. La variation saisonnière d'hormones et des métabolites (métabolome) est une réponse physiologique assez courante chez les organismes en état de stress. Ceci est bien documenté chez les insectes en hibernation ou en diapause (Michaud et Denlinger 2006, Renault et al. 2006, Košťál et al. 2011), mais peu d'études sont disponibles sur les diptères d'importance médicale comme les anophèles vecteurs de paludisme. La métabolomique, qui a pour ambition d'appréhender qualitativement et quantitativement les variations d'un nombre important de métabolites à l'échelle d'un organisme ou des différents compartiments de ce dernier, fournit des informations sur le statut biochimique des insectes. Chez les insectes, les ecdystéroïdes sont des hormones jouant un rôle important dans la reproduction des femelles (Hagedorn 1983, Swevers et Iatrou 2009). Chez de nombreux insectes comme *An. gambiae*, elles sont produites par les ovaires (Hagedorn et al. 1975, Klowden 1997, Pondeville et al. 2008), et les glandes accessoires mâles (Pondeville et al. 2008) bien que leur rôle chez les mâles demeure peu connu. En particulier, l'hormone 20 hydroxyecdysone (20E) joue un rôle clé dans la vitellogénèse, et se retrouve généralement en très faible concentration chez les insectes diapausants (Denlinger et al. 2005).

Notre but ici est de caractériser les ajustements métaboliques et d'explorer les changements hormonaux sous-jacents, notamment concernant les ecdystéroïdes, chez les moustiques mâles

et femelles exposés aux conditions environnementales contrastés, telles que rencontrées dans les savanes de l'ouest du Burkina Faso.

2.2) Résultats

2.2.1) Analyse des métabolites par GC-MS chez les mâles et les femelles d'*An. gambiae* s.l.

Trente cinq composés ont été détectés par GC-MS au cours de cette étude dont douze (12) sucres et polyols, quinze (15) acides aminés et amines, quatre (04) intermédiaires du cycle de Krebs et quatre (04) autres métabolites secondaires (Tableau VII). Les analyses multivariées ont été réalisées grâce au logiciel R 2.13.1 (R Development Core Team 2008; Thioulouse et al. 1997) pour l'analyse de nos données. L'analyse factorielle discriminante (AFD) globale des données a mis en évidence une différence significative entre mâles et femelles (MANOVA, $F_1 = 42,395$, $p < 0,001$), ce qui nous a conduit à les analyser séparément. En outre, l'analyse de variance réalisée sur l'ensemble des données montre des différences quantitatives entre les groupes expérimentaux (1h, 24h, SS, SP) chez les mâles et femelles (Tableau VIII). Des réarrangements en contenu métabolique ont eu lieu chez les femelles des trois espèces exposées aux conditions SP et SS (MANOVA, $F_2 = 2,207$, $p < 0,001$). De telles différences significatives entre SS et SP n'ont pas été mises en évidence chez les mâles (MANOVA, $F_2 = 1,0$, $p = 0,4826$) (Tableau VIII).

Tableau VII: Métabolites identifiés par GC-MS chez *An. gambiae* s.l.

Sucres	Polyols	Acides aminés	Amines	Intermediaires cycle de Krebs	Autres métabolites
Fructose	Adonitol	Alanine	Cadavérine	Citrate	Acide pipécolique
Glucose	Arabitol	Glutamate	Ethanolamine	Fumate	Acide Phosphorique
Maltose	Erythritol	Glycine	Putrescine	Malate	Acide gluconolactone
Mannose	Glycérol	Isoleucine	Triéthanolamine	Succinate	Acide glycérique
Ribose	Inositol	Leucine			
Trehalose	Xylitol	Ornithine			
		Phénylalanine			
		Proline			
		Sérine			
		Thréonine			
		Valine			

Tableau VIII: Résultats de l'analyse de variance (MANOVA) réalisée chez les mâles et femelles des trois colonies d'*An. gambiae s.l.*

Effets		Approximatif F	ddl (num ; den)	ddl. Pillai ^a	P ^b
Femelles	Colonie	4,840	40 ; 180	2 1,03643	***
	Saison	9,823	20 ; 89	1 0,68821	***
	Age	71,865	20 ; 89	1 0,94169	***
	Colonie : Saison	2,207	40 ; 180	2 0,65820	***
	Colonie : Age	2,144	40 ; 180	2 0,64532	***
	Saison : Age	12,155	20 ; 89	1 0,73200	***
	Colonie : Saison : Age	1,452	40 ; 180	2 0,48784	ns
Mâles	Colonie	4,54	34 ; 186	2 0,90722	***
	Saison	6,90	17 ; 92	1 0,56043	***
	Age	368,07	17 ; 92	1 0,98551	***
	Colonie : Saison	1,00	34 ; 186	2 0,30789	ns
	Colonie : Age	3,97	34 ; 186	2 0,84137	***
	Saison : Age	5,03	17 ; 92	1 0,48168	***
	Colonie : Saison : Age	1,20	34 ; 186	2 0,36049	ns

ddl, degré de liberté; num = numérateur; den = dénominateur

^a Pillai trace multiplié par 10.

^b ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; "ns", non significatif.

i) Ajustements métaboliques chez les femelles.

L'analyse multivariée AFD montre des différences significatives d'ajustements métaboliques chez les femelles des trois espèces exposées aux conditions SS et SP (Figure 19, tests de permutation de Monte-Carlo, 10.000 permutations, $p < 0,001$). Le premier axe factoriel LD1 représentant 67% de l'inertie totale, permet de séparer les individus néonates (1h) des individus plus âgés (24h). Les composés qui fluctuent sont l'alanine, la proline, le xylitol trouvés en forte concentrations chez les individus âgés de 24h tandis que la cadavérine et l'inositol sont retrouvés en quantités plus élevées chez les femelles néonates (1h) (Figure 19 et Annexe 1). La projection sur le deuxième axe (LD2), qui explique 11,4% de l'inertie totale, permet de séparer les individus âgés de 24h en fonction des saisons. Ce deuxième axe factoriel discrimine les individus élevés en SS (en rouge) de ceux élevés en SP (en bleu). Cette distinction entre les deux saisons est observée chez les 3 espèces (Figure 19). Les concentrations en glycine, isoleucine, leucine et malate sont significativement réduites en SS. Aucune différence saisonnière n'a été observée chez les femelles néonates (1h) et ce quelque soit l'espèce considérée (Figure 19, Annexe 1).

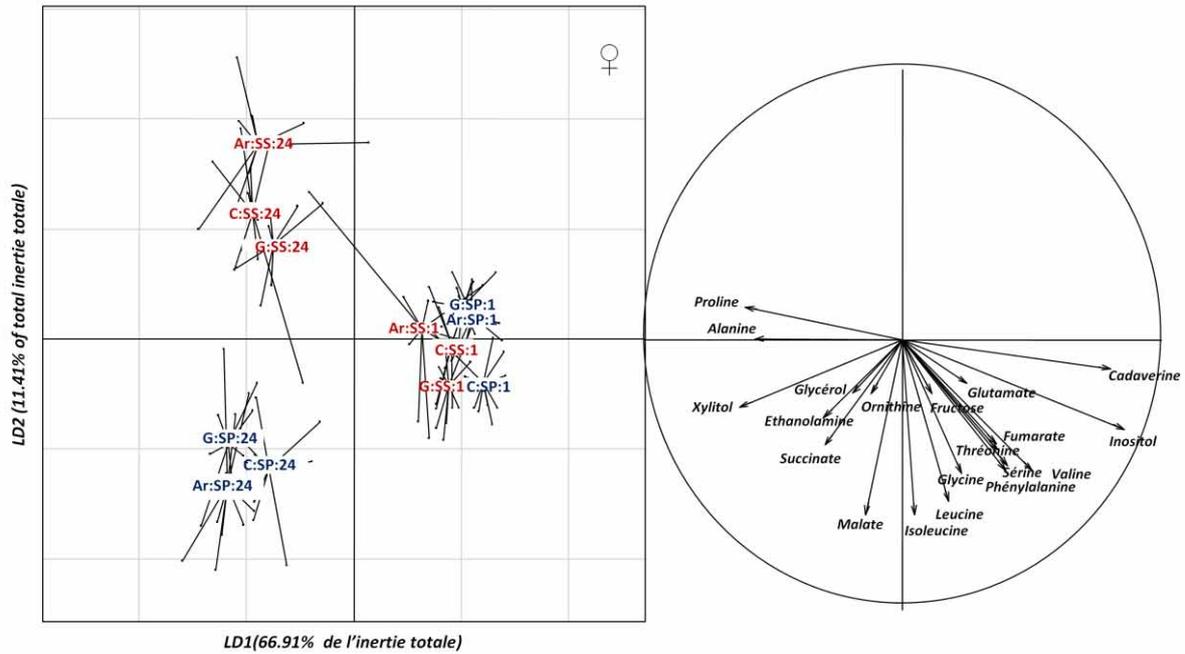


Figure 19: Analyses Factorielles Discriminantes (gauche) et cercles de corrélation des métabolites (droite) chez les femelles d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G), et *An. arabiensis* (Ar) collectées 1h (1) et 24h (24) après émergence et exposées aux conditions de saison sèche (SS, en rouge) et de saison des pluies (SP, en bleu). $N = 10$ replicats dans chaque cas.

ii) Ajustements métaboliques chez les mâles

Les différences métaboliques des six groupes expérimentaux des mâles sont exprimées sur la figure 20, (tests de Monte-Carlo basés sur 10.000 permutations). Le premier axe (LD1) explique 71,7 % de la variance totale et sépare les individus selon leur âge. Selon cet axe, l'alanine est en quantité élevée chez les mâles de 24h tandis que les mâles d'1h se caractérisent par les composés tels que fumarate, glutamate, isoleucine, leucine, serine et valine (Figure 20, Annexe 2). Le deuxième axe représente 9,2 % de l'inertie totale. Cet axe sépare les espèces bien que les chevauchements apparaissent évidentes et plus particulièrement chez les individus d'1h.

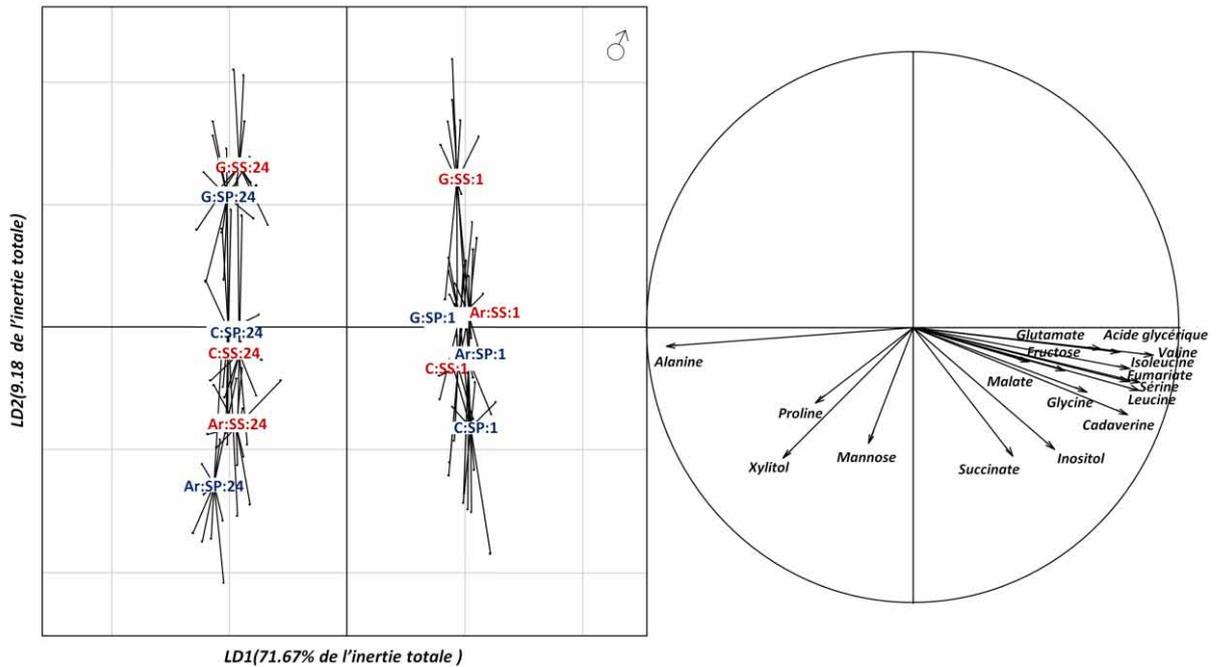


Figure 20: Analyses Factorielles Discriminantes (gauche) et cercles de corrélation des métabolites (droite) chez les mâles d'*An. coluzzii* (C), *An. gambiae* (G), et *An. arabiensis* (Ar) collectés 1h (1) et 24h (24) après émergence et exposés aux conditions de saison sèche (SS, en rouge) et de saison des pluies (SP, en bleu). $N = 10$ réplicats de 5 à 6 moustiques dans chaque cas.

2.2.2) Analyse des ecdystéroïdes

Les taux d'hormones ecdystéroïdes sont faibles chez les femelles 1h après émergence chez les trois espèces étudiées, et aucune différence n'a été mise en évidence chez les femelles entre les deux conditions expérimentales ($F_2 = 0,52$, $p = 0,47$; Figure 21A). Ce taux est au-dessous du seuil de détection de la méthode utilisée (EIA) chez les femelles âgées de 24h. Par contre, toutes espèces confondues, les mâles présentent des teneurs plus élevées que les femelles. Ces concentrations sont plus importantes à 24h (26 à 43 fois plus élevées en SP et 9 à 23 fois en SS) que 1h après émergence. Aucun effet saison n'a été mis en évidence chez les mâles des trois espèces à 1h (Figure 21B). Le test *post-hoc* de Tukey montre cependant que ce taux est maximal chez les mâles d'*An. coluzzii* âgés de 24h et élevés en conditions de saison des pluies ($p < 0,0001$, Figure 21C).

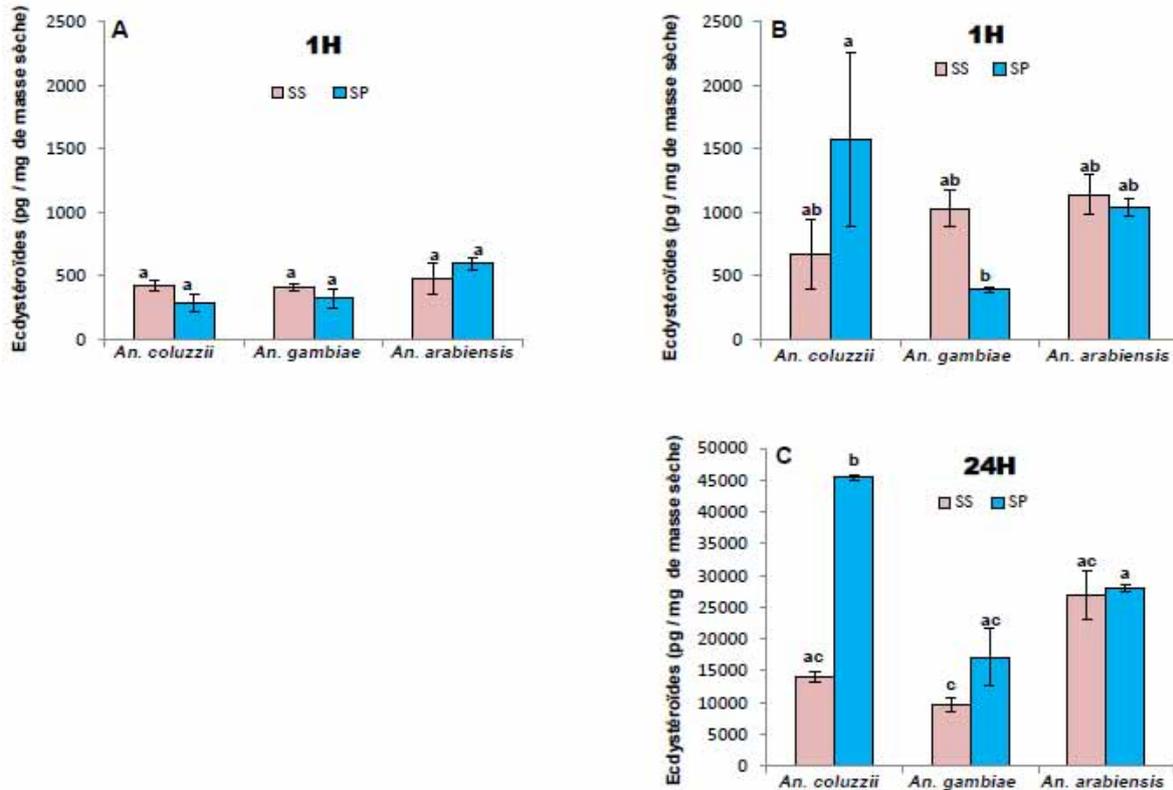


Figure 21: Teneur en ecdystéroïdes (20E) chez les femelles (A) et mâles (B et C) d'*An. gambiae* s.l élevés en conditions SS et SP et collectés 1h et 24h après émergence. La présence de deux lettres différentes au-dessus des barres indique une différence statistiquement significative (ANOVA suivie du test *post-hoc* de Tukey, $p < 0.05$).

2.3) Discussion

Dans cette étude réalisée avec des colonies de laboratoire élevées dans des conditions environnementales contrastées, nous avons effectué une analyse comparative de la plasticité métabolique chez l'adulte mâle et femelle d'*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Utilisant la métabolomique, outil d'analyse holistique, ce travail apporte des éléments nouveaux et importants dans la compréhension des processus physiologiques qui soutiennent la résistance à la sécheresse et la survie en saison sèche de ces espèces de moustiques d'importance médicale. Plusieurs résultats importants découlent de notre analyse.

Sur la base des 35 métabolites détectés, les signatures métaboliques des trois espèces étudiées sont similaires lorsque les spécimens du même âge et même sexe sont élevés dans des conditions environnementales identiques.

En effet, les trois espèces étudiées *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont génétiquement différentes et les divergences phénotypiques entre ces espèces peuvent avoir une valeur adaptative dans la nature (Lehmann et Diabaté 2008, Gimonneau et al. 2010, Gimonneau et al. 2012, Mouline et al. 2012, Coetzee et al. 2013). Ces trois espèces sont des espèces jumelles isomorphes ayant divergé récemment et qui coexistent dans la plupart des savanes d'Afrique centrale et de l'ouest (della Torre et al. 2005, Lehmann et Diabaté 2008). La radiation (l'expansion) du complexe *An. gambiae* est supposée avoir eu lieu à la fois récemment et rapidement, facilitant la différenciation écotypique et la diversification des lignées. Il en résulte des espèces à barrières incomplètes, principalement d'origine prézygotique (Ayala et Coluzzi 2005, Costantini et al. 2009, White et al. 2011). Par conséquent, les phénotypes métaboliques similaires exprimés par les trois colonies de moustiques reflètent probablement la proximité phylogénétique et la diversification incomplète des lignées, ce qui expliquerait pourquoi les facteurs de stress environnementaux ont eu le même impact sur la physiologie générale de ces trois taxons sympatriques. Cependant mâles et femelles montraient des métabotypes très distincts, quelles que soient les conditions expérimentales et les espèces considérées.

Les empreintes métaboliques des moustiques émergents (âgés de 1h) sont homogènes, et ceci quelles que soient les conditions expérimentales ou les espèces considérées.

De manière intéressante, l'exposition des moustiques aux stimuli environnementaux contrastés dès les stades aquatiques immatures n'a pas conduit à obtenir des métabotypes distincts chez les adultes émergents (âgés de 1h); les empreintes métaboliques de tous les spécimens «1h» se chevauchent, quelles que soient les conditions expérimentales ou les espèces considérées. En effet, les premiers instants après l'émergence est une période critique, plusieurs processus biologiques essentiels doivent être fixés dans un laps de temps court après l'émergence. Les moustiques subissent alors des réarrangements physiologiques extrêmes, avec des modifications structurelles intenses, y compris l'expansion des ailes, le durcissement de la cuticule et la maturation des gonades (Clements 1992, Li et Denlinger 2009). Ainsi, les différences entre métabolites induites par les stress environnementaux peuvent être masquées par les processus nécessitant l'énergie et des métabolites impliqués dans la maturation des adultes peu après l'émergence. Cependant, ce résultat soulève des questions intéressantes sur l'importance des stimuli environnementaux perçus par les stades immatures sur le phénotype ultérieur de l'adulte, à savoir (i) les stades immatures donnent-ils naissance à un adulte «de

base» qui sera la cible des réarrangements plastiques induites par le stress environnemental dès l'émergence de l'adulte? ou (ii) les spécimens sont-ils déjà engagés dès le stade larvaire dans des trajectoires métaboliques et physiologiques distinctes en fonction des stimuli de l'environnement, avec une expression des réarrangements plastiques au stade adulte seulement? L'étude de cette question nécessitera la prise en compte des effets trans-générationnels (à savoir les effets maternels) et d'autres types d'interactions biotiques telles que l'effet de forte densité des larves et la compétition dans l'expression des phénotypes alternatifs chez les adultes.

Les différences d'empreintes métaboliques entre les adultes d'1h- et ceux de 24h- reflètent la maturation des imagos et la capacité de l'initiation au vol.

Une source de variation en métabolites est liée à l'âge des moustiques et elle concerne principalement des acides aminés. En effet, plusieurs acides aminés libres (*i.e.* glycine, leucine, phénylalanine, sérine, thréonine et valine) étaient en fortes concentrations chez les moustiques émergents (1h), et leurs teneurs ont ensuite diminué 24h après l'émergence chez les mâles et les femelles. Cela a été particulièrement manifeste chez les femelles élevées dans les conditions SS. Plusieurs acides aminés sont généralement associés au processus de sclérotisation de la cuticule des insectes. Par exemple, chez le criquet adulte *Schistocerca gregaria*, et chez la larve et l'adulte du coléoptère *Tenebrio molitor*, la quantité d'acides aminés libres a diminué au cours des 24 premières heures de sclérotisation de la cuticule (Andersen et Roepstorff 2007). Globalement, les processus physiologiques de maturation des adultes contribuent fortement à façonner la fitness ultérieure des adultes, et, à ce titre, présentent un certain degré de plasticité en réponse aux variations des conditions environnementales.

Les teneurs en l'alanine et proline, étaient plus élevées chez les mâles et femelles de 24h. Ces deux acides aminés sont importants dans l'approvisionnement de l'énergie aux muscles lors du vol chez le coléoptère *Pachnoda sinuate* (Auerswald et al. 1998). La proline a également été trouvée comme substrat principal de vol chez la mouche tsé-tsé *Glossina morsitans* (Bursell et al. 1974). Il est probable que les moustiques du complexe *An. gambiae* utilisent la proline comme substrat pour le vol, tel que cela a été rapporté chez le moustique *A. aegypti* (Scaraffia et Wells 2003). Les faibles quantités d'alanine et proline observées chez les moustiques émergents, dont les ailes ne sont pas entièrement déployées et l'activité de vol n'étant pas encore amorcée, sont en accord avec cette hypothèse. Par conséquent,

l'accumulation de la proline et alanine dans les moustiques de 24h chez les deux sexes refléterait la préparation pour de vol de routine.

Des différences d'ajustements métaboliques existent entre conditions expérimentales SS et SP chez les femelles de 24h.

La différence métabolique la plus remarquable entre les femelles exposées aux conditions SS et celles exposées aux conditions SP se trouve au niveau des composés intervenant dans le cycle de Krebs ou cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). En effet, les composés fumarate, malate et succinate étaient significativement moins abondants chez les femelles de 24h des trois colonies de moustiques élevées dans les conditions SS. Ce résultat suggère que la capacité métabolique serait plus faible chez les femelles maintenues dans des conditions SS, ce qui est cohérent avec les résultats récents obtenus par d'autres auteurs sur des populations naturelles de moustiques. En effet, les travaux de Huestis et collaborateurs (Huestis et al. 2011, Huestis et al. 2012) ont montré que l'activité de vol chez *An. coluzzii* était assez faible au cours de la saison sèche dans la zone sahélienne du Mali, comparée à celle du plein milieu de la saison des pluies. Les mêmes auteurs ont également indiqué que le taux métabolique moyen était plus faible pendant la période de transition entre la saison des pluies et la saison sèche dans le Sahel. Ainsi, la diminution des concentrations des composés intermédiaires du cycle de Krebs observée dans cette étude est en accord les données de ces auteurs.

L'acide aminé isoleucine marque une différence entre les deux conditions environnementales SS et SP chez les femelles de 24h, alors qu'aucune variation n'a été observée chez les groupes constitués des mâles. Cet acide aminé subit une forte diminution en conditions SS. Des quantités non limitantes d'isoleucine permettent de booster la fécondité chez des espèces d'*Aedes* (Briegel 1985) et son rôle dans le développement et la production d'œufs chez la femelle *Aedes aegypti* a été fortement démontrée (Chang et Judson 1977, Harrington et al. 2001). Par conséquent, la diminution de la teneur en isoleucine détectée chez les femelles exposées aux conditions SS refléterait la dépression de la reproduction, comme observée dans les populations naturelles d'*An. gambiae* pendant la saison sèche dans la région Sahélienne du Mali (Yaro et al. 2012) et dans cette étude (chapitre 1).

Des polyols et sucres sont généralement accumulés chez les insectes exposés à toute une gamme de stress environnementaux (Yancey et al. 1982, Košťál et al. 2001, Renault et al. 2002, Watanabe 2006, Yoder et al. 2006, Michaud et Denlinger 2007). Les organismes augmentent leurs concentrations cellulaires dans les milieux déshydratés. Ces composés de

faibles poids moléculaires sont impliqués dans la protection de la structure des protéines contre la dénaturation et la stabilisation des membranes (Back et al. 1979, Henle et al. 1982). Dans cette étude, aucune augmentation significative de concentration en polyols spécifiquement liée aux conditions environnementales n'a pu être mise en évidence. Les concentrations en glycérol, inositol, tréhalose et xylitol ont soit diminué ou n'ont pas varié, chez les mâles et les femelles d'*An. arabiensis*, *An. coluzzi*, et *An. gambiae* exposés aux conditions SS, ce qui est étonnant, vu l'accumulation de ces composés chez les insectes dans les conditions de dessiccation (Michaud et al. 2008). Nous ne pouvons dire avec certitude si ces composés ont un rôle moins important chez nos moustiques dans les conditions testées ou pourraient indirectement jouer un rôle par leur transformation en d'autres composés. En effet, la conversion métabolique des polyols en d'autres composés (Hendrix et Salvucci 1998, Hahn et Denlinger 2007), tels que le glucose, réserve organique sous forme de glycogène (Chino 1958, Adedokun et Denlinger 1985, Storey et Storey 1986), a été démontrée chez une large gamme d'espèces d'arthropodes. C'est ainsi par exemple, le glycogène qui joue un rôle de carburant énergétique s'accumule chez *Drosophila melanogaster* lors de stress de la dessiccation (Graves et al. 1992, Gibbs et al. 1997b). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur les moustiques collectés sur le terrain (Chapitre 1) qui montrent une accumulation de glycogène au début de la saison sèche chez *An. coluzzii*.

Variation d'hormones ecdystéroïdes

Le taux d'hormones ecdystéroïdes a été déterminé chez les mâles et femelles des trois espèces d'anophèles. Nous avons observé des concentrations très faibles en ecdystéroïdes chez les femelles dès leur émergence (âgées de 1h). Nous pensons que ces faibles quantités seraient le contenu résiduel provenant du stade nymphal antérieur, comme l'ont montré Whisenton et al. (1989) chez *Aedes aegypti* à l'émergence. Il est démontré que chez les femelles de cette espèce, d'autres tissus en dehors des ovaires produisent après un repas de sang les hormones ecdystéroïdes mais à un niveau plus faible que dans les ovaires (Sieglaff et al. 2005). En revanche, chez *Drosophila melanogaster*, les ovaires immatures (0-2h) produisent plus d'ecdystéroïdes que les matures (Bownes 1989). Ce processus autocrine de signalisation pourrait également être impliqué dans les remaniements structurels qui ont lieu pendant les premières heures de la vie imaginale. Chez les femelles de 24h, les hormones ecdystéroïdes étaient inférieures au seuil de détection de la méthode utilisée comme précédemment rapporté chez les moustiques femelles anautogènes à jeun et vierges, y compris chez *An. gambiae*

(Pondeville et al. 2008, Bai et al. 2010). A l'inverse, les concentrations en ecdystéroïdes sont dans tous les cas plus élevées chez les mâles comparées aux femelles. Ceci est en accord avec la capacité ecdystéroïdogénique plus grande des glandes accessoires mâles d'*An. gambiae* (Pondeville et al. 2008). En outre, ces résultats suggèrent un rôle comme allohormone du 20-hydroxyecdysone (20E) dans le comportement reproductif d'*An. gambiae*, ce qui implique l'importance des glandes accessoires mâles dans l'établissement des dynamiques des populations de moustiques et de leurs stratégies de reproduction. Bien qu'aucune différence significative en hormones ecdystéroïdes n'a été mise en évidence chez *An. arabiensis* et *An. gambiae* mâles entre conditions SS et SP, *An. coluzzii* par contre montre une concentration significativement plus élevée en ecdystéroïdes chez les mâles élevés en conditions optimales SP. Une telle différence dans les dynamiques et dans l'amplitude de variation des teneurs en ecdystéroïdes chez les moustiques mâles peut entraîner des dynamiques de reproduction et de populations différentes dans les zones où les trois espèces sont en sympatrie.

2.4) Conclusion partielle

Des différences d'ajustements métabolique et hormonal ont pu être mises en évidence chez les trois espèces étudiées au cours de ce travail entre mâles et femelles et entre conditions environnementales. Les femelles de 24h élevées dans les conditions SS montrent des métabotypes différents comparées à leurs congénères élevées dans les conditions SP. Les ajustements métaboliques observés sont principalement au niveau des composés intermédiaires du cycle de Krebs et des acides aminés. Ces ajustements en relation avec la capacité métabolique et la reproduction représentent des mécanismes importants dans les stratégies mises en place par les insectes dans les conditions hostiles. Bien que connu pour leur rôle dans la déssiccation, nous n'avons pas observé une accumulation en solutés compatibles dans les échantillons exposés aux conditions SS et des études des pertes en d'eau à travers la cuticule devront être examinés ultérieurement. Si cette étude a permis de mettre en évidence la variabilité phénotypique vis-à-vis des métabolites secondaires en réponse au stress, il est de même important d'examiner les ajustements morphologiques mis en place par les insectes exposés aux conditions de la saison sèche.

PARTIE 3: Variations morphologiques des spiracles mésothoraciques d'*An.gambiae* s.l. exposés aux conditions stressantes de la saison sèche

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article:

Mamai W., Mouline K., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Renault D., Simard F. Mesothoracic spiracles morphology in *Anopheles gambiae* s.l (Diptera) with particular reference to responses to dry season conditions in Burkina Faso (West Africa). In revision. *Parasites and Vectors*.

3.1) Introduction

La dessiccation constitue l'un des stress environnementaux les plus importants auxquels font face les insectes dans la nature (Gibbs et al. 1997). Chez la plupart des insectes, la perte d'eau à travers la cuticule est la principale voie, mais 5-20% d'eau sont perdus à travers les processus de la respiration (Hadley 1994, Chown 2002). Les échanges gazeux respiratoires chez les moustiques se produisent à travers le système trachéal dont les ouvertures au niveau de la cuticule appelées «spiracles» sont situées sur le thorax et l'abdomen. Chez les moustiques adultes, les spiracles sont situés de manière bilatérale et symétrique sur le mésothorax, métathorax et les segments abdominaux. Leurs ouvertures régulent les compromis ou «trade-offs» entre les échanges de gaz et les pertes en eau, car l'oxygène, nécessaire à l'activité de la cellule, passe par les spiracles pour entrer dans le système respiratoire (Sukontason et al. 2006). La régulation de l'ouverture des spiracles joue un rôle important dans la conservation de l'eau et est mieux illustrée chez les insectes qui manifestent un mécanisme discontinu d'échanges de gaz respiratoires (Lighton 1996, Sibul et al. 2006). Bien que la valeur adaptative de ce mécanisme discontinu fasse l'objet de multiples débats, il se caractérise par une période où les spiracles sont complètement fermés. En effet, le mécanisme discontinu est une répétition de cycles d'ouverture-fermeture des spiracles qui conduit au rejet périodique de dioxyde de carbone (Gray et Bradley 2006). Chez les espèces de fourmis *Pogonomyrmex barbatus*, le taux métabolique est plus faible chez les individus utilisant le mécanisme discontinu d'échanges gazeux respiratoires, intermédiaire pour les individus ayant un mécanisme cyclique, et plus élevé chez les individus utilisant le mécanisme continu d'échange (Gibbs et Johnson 2004). Les spiracles qui sont en permanence ouverts permettent un échange maximal des gaz mais exposent les insectes à la dessiccation (Krafsur 1971). Les mécanismes de conservation d'eau sont d'une importance considérable

dans la survie des organismes. Burshel (1963) a montré que les spiracles jouent un rôle important dans ce processus de rétention d'eau chez les espèces des glossines en milieux arides. L'objectif ici était donc d'explorer les différences morphologiques et structurelles à tous les niveaux à travers l'observation directe des moustiques des trois espèces majeures de vecteurs du paludisme au Burkina Faso élevées en conditions de SS et de SP.

3.2) Résultats

Huit (8) échantillons par espèce et par condition ont été analysés dans cette étude. Les femelles entières et plusieurs parties de l'insecte dont la tête, les antennes, les haltères les spiracles abdominaux et thoraciques, ont été soigneusement observées par MEB dans le but de mettre en évidence d'éventuelles différences morphologiques et structurelles entre les espèces et/ou conditions environnementales. Aucune différence visible sur la morphologie générale des insectes n'a été observée entre les conditions expérimentales. Les seules différences évidentes et frappantes lors de nos observations résident dans l'aspect structurel des spiracles mesothoraxiques qui étaient clairement identifiables et observables (Figure 22). *An. coluzzii* et *An. arabiensis* montrent des différences dans l'aspect visuel des spiracles mésothoraciques et des trichomes les entourant (Figure 23). Chez ces deux espèces, la densité et l'épaisseur des trichomes (Figure 23) semblent augmenter chez les femelles élevées en saison sèche et recouvrent presque entièrement l'ouverture des spiracles. Mais, il est difficile par nos observations de dire si nous sommes en présence de trichomes gonflées (où des composés osmotiquement actifs ont été accumulés pour augmenter le volume des trichomes) ou si les trichomes sont entourés d'une épaisse couche de composés leur donnant cet aspect gonflé. De plus, nous ne pouvons non plus conclure si les spiracles sont fermés parce qu'ils sont scellés avec les trichomes ou si les valves en soi sont jointes. Quoi qu'il en soit, les ouvertures des spiracles semblent étanches et hermétiques chez *An. coluzzii* et *An. arabiensis* élevés en conditions de saison sèche par opposition à *An. gambiae*, où toutes les femelles montrent des spiracles grandement ouverts quelque soit la saison. En outre, nous n'avons pas été en mesure de constater une différence saisonnière dans l'aspect des trichomes chez cette espèce. Cependant, dans leur ensemble, nos résultats suggèrent des capacités différentes entre les espèces du complexe *An. gambiae* à réguler la perte d'eau et les échanges gazeux à travers les spiracles respiratoires dans un environnement sec.

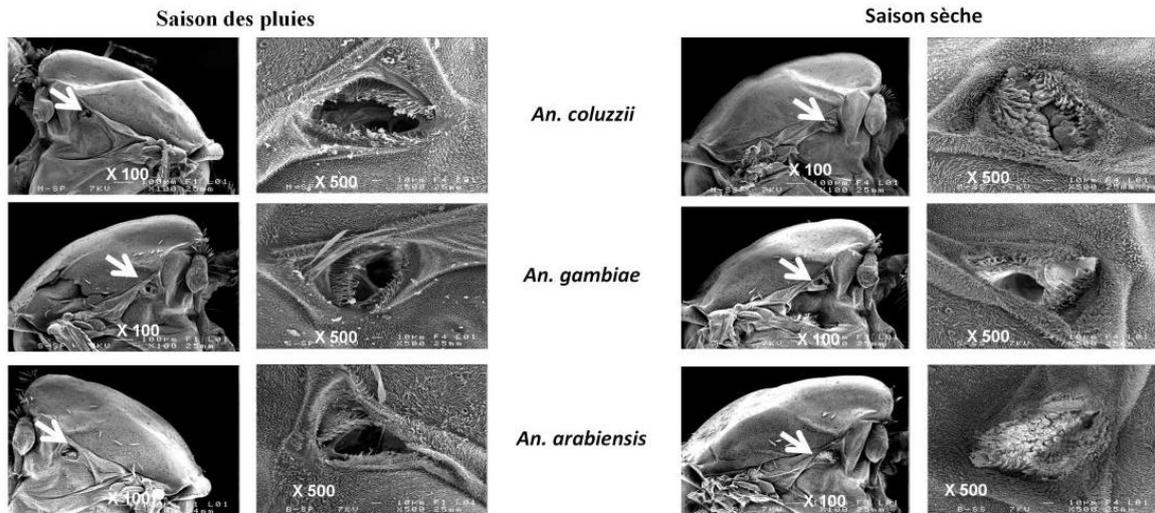


Figure 22: Vue au microscope électronique à balayage (MEB) des spiracles chez les femelles d'*An. coluzzii*, d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* élevées dans les conditions de saison des pluies (à gauche) et de saison sèche (à droite).

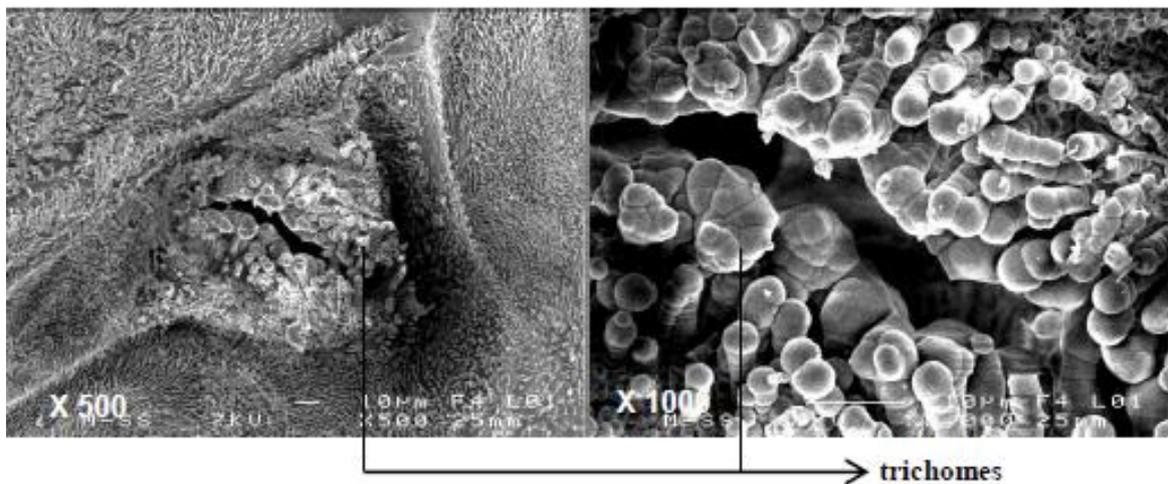


Figure 23: Micrographes des trichomes aux abords des spiracles (grossissement x500 et x1000) d'*An. gambiae* s.l.

3.3) Discussion

Malgré l'importance épidémiologique des moustiques anophèles, rien n'est connu sur les mécanismes qui sous-tendent la survie de ces espèces dans des conditions stressantes de la saison sèche. Nos observations constituent ainsi de données de base sur les réponses morphologiques mises en place par *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* en réponse aux conditions de la saison sèche dans les savanes d'Afrique de l'Ouest. La menace de la dessiccation étant plus sévère lorsque les spiracles sont ouverts (Bursell 1957, Lehman 2001),

nous nous attendions à ce que les populations élevées dans les conditions sub-optimales d'humidité et de température présentent des traits morphologiques qui servent à lutter contre les pertes d'eau. En effet, il est connu qu'au cours de la respiration, l'eau est perdue rapidement à travers des spiracles ouverts (Lighton et al. 1993, Quinlan et Hadley 1993, Hadley 1994). En plus, il est démontré chez la fourmi *Cataglyphis bicolor* des zones arides par exemple, que les spiracles thoraciques agissent comme des voies de grande capacité pour le système trachéal et sont globalement responsables d'environ 90% des échanges de gaz, ainsi que de la vapeur d'eau pendant l'activité (Lighton et al. 1993). D'autres études ont par ailleurs démontré que les spiracles facilitent efficacement la conservation d'eau (Mellanby 1934, Buck et Keister 1949, Bursell 1957, Miller 1964, Kanwisher 1966). Par exemple, en mesurant le taux de perte en eau chez les mouches tsé-tsé dans divers états de dessiccation, (Bursell 1957) a pu montrer que le contrôle de la transpiration par les spiracles augmente quand les réserves en eau diminuent. Nos données montrent que les moustiques anophèles exposés aux conditions de la saison sèche présentent des modifications morphologiques au niveau des spiracles. Chez *An. coluzzii* et *An. arabiensis*, ceux-ci sont hermétiquement fermés et recouverts par des trichomes épais. Ce résultat est cohérent avec les résultats de plusieurs études antérieures effectuées sur d'autres invertébrés. Par exemple, certaines études ont indiqué que la fermeture des spiracles par le mécanisme des valves est une adaptation physiologique qui réduit les pertes en eau chez les insectes (Richards et Davies 1977, Kesler 1985, Borrer et al. 1989, Lehman 2001). Des spiracles fermés ont été rapportés chez *Drosophila melanogaster* au cours de l'activité du vol afin de réduire la perte en eau et des échanges de gaz dans le système trachéal (Lehman 2001). De la même manière, Vinogradskaya et Buhorpa (1950) ont conclu que la manière simple et apparemment inefficace dont les spiracles thoraciques d'*An. maculipennis* se ferment est une des causes de la perte immédiate d'eau caractéristique de cette espèce et d'autres anophèles. Chez les espèces hygrophiles d'*Anophèles* et d'*Aedes*, les ouvertures des spiracles abdominaux sont relativement plus larges, alors que chez les espèces xérophiles, elles sont plus petites (Vinogradskaya et Buhorpa 1950). Par ailleurs, le rapport entre la longueur du spiracle et celle du thorax, appelé *indice spiraculaire*, a été utilisé comme outil taxonomique pour identifier deux variants écologiques d'*An. stephensi* exposés à des conditions environnementales contrastées (Nagpal et al. 2003). Etant donné la perte d'eau rapide lorsque les spiracles sont ouverts (Burkett et Schneiderman 1967), nous pensons que face à la dessiccation, les moustiques conserveraient mieux l'eau en réduisant les ouvertures des spiracles puisque,

lorsque ces derniers sont fermés, il y a moins de possibilité de diffusion des vapeurs d'eau hors du système trachéal. En plus de la réduction de la perte en eau, nous pensons que la fermeture des spiracles pourrait également contribuer à réduire le taux métabolique et les échanges gazeux respiratoires. Huestis et al. (2012) ont démontré que le taux métabolique moyen chez *An. coluzzii* était le plus faible pendant la période de transition entre la saison des pluies et la saison sèche dans le Sahel, ce qui est cohérent avec l'observation des spiracles fermés chez les moustiques élevés dans ces conditions. Le succès évolutif des espèces dans le temps ou d'un individu dans son milieu dépend de sa capacité de mise en place de comportements ou de physiologies adaptatives en fonction des fluctuations de l'environnement (Willis 1999). A notre connaissance, notre étude est la première à mettre en évidence la présence d'un nombre important de trichomes en réponse au stress environnemental chez les insectes. Et ceci peut être considéré comme une première barrière pour prévenir les effets néfastes de conditions environnementales défavorables, tels que la perte excessive d'eau pendant la respiration. Il reste à déterminer ce qui constitue ces changements morphologiques et les mécanismes qui les gouvernent. Une étude récente sur *Drosophila melanogaster* a montré qu'il y a un lien entre le métabolisme des acides gras dans les oenocytes et l'étanchéité des spiracles (Parvy et al. 2012).

3.4) Conclusion partielle

Cette étude a mis en évidence des variations saisonnières morphologiques des spiracles chez *An. gambiae* s.l. exposés aux conditions arides de saison sèche dans les savanes d'Afrique de l'Ouest. En dehors de l'aspect mécanique de fermeture des spiracles respiratoires en saison sèche, la densité et l'épaisseur des trichomes augmentent chez *An. coluzzii* et *An. arabiensis*. ce qui suggère un rôle important des spiracles dans la réduction des pertes d'eau et le ralentissant global du métabolisme via la respiration. Les différences observées entre les espèces montrent que des espèces proches sur le plan taxonomique peuvent être phénotypiquement distinctes lorsqu'elles sont exposées aux mêmes conditions stressantes. Bien qu'il existe des différences claires entre les conditions environnementales chez *An. coluzzi* et *An. arabiensis*, d'autres études sur la morphologie et la composition de la cuticule, les niveaux d'échanges gazeux et le métabolisme général sont nécessaires pour explorer plus en détail la pertinence biologique et la valeur adaptative de ces variations morphologiques.

PARTIE 4: Variation temporelle et persistance en saison sèche des populations d' *An. gambiae* s.l. dans une serre grillagée, la malariasphère

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article:

Mamai W., Mouline K., Couret D., Dabiré KR., Ouedraogo GA., Lehmann T., Renaud D., Simard F. Monitoring dry season persistence of *Anopheles gambiae* s.l. populations in a new contained semi-field system in Southwestern Burkina Faso, West Africa. En préparation.

4.1) Introduction

La disparition des moustiques en saison sèche, sur le terrain, rend difficile toute étude visant à explorer l'écologie de ces vecteurs dans leur environnement naturel. Or, pour être réellement informatives, de telles études ne peuvent être réalisées qu'avec des spécimens provenant du terrain (ou leur descendance directe), car l'établissement d'une colonie au laboratoire, où les moustiques sont élevés dans des conditions standardisées de température et d'hygrométrie, sans prédateurs ou pathogènes et dans des conditions optimales de nourriture et d'accès aux ressources (compétition intraspécifique limitée), se traduit inévitablement par une dépression de la variabilité génétique et phénotypique des populations colonisées qui ne sont alors plus comparables avec leurs congénères exposés aux conditions de terrain. Un bon compromis entre conditions naturelles et contrôlées pour l'étude de ce type de paramètres, réside dans l'utilisation d'enceintes grillagées de grande taille, implantées sur le terrain et à l'intérieur desquelles les populations de moustiques peuvent être établies et étudiées (Knols et al. 2002, Ferguson et al. 2008). L'objectif de ce travail était de mettre en évidence par une approche semi-naturelle menée en environnement clos (i) si les populations d'*Anopheles gambiae* s.l. étaient capables de se maintenir pendant la période défavorable, (ii) si la disparition virtuelle des vecteurs en saison sèche et la recolonisation soudaine des sites sur le terrain était possible dans ce milieu clos et (iii) d'identifier de manière comparative entre les trois espèces les mécanismes comportementaux qui entrent en jeu dans la survie et la persistance de ces populations au cours de la saison sèche.

4.2) Résultats

4.2.1) Paramètres environnementaux, effectifs et réalisation du cycle de développement des anophèles dans la serre grillagée

Les dates de l'introduction des moustiques adultes âgés de deux jours et les effectifs par espèce et par sexe sont consignés dans le tableau IX. Toutes espèces confondues, 2129 moustiques du complexe *An. gambiae* s.l. ont été introduits dans la serre en 2010, et 10910 dont 5555 femelles et 5355 mâles en 2011.

L'étude réalisée la première année (2010) a consisté à s'assurer de la réalisation du cycle complet de développement du moustique. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la réalisation complète de tout le cycle de développement du moustique à l'intérieur de l'enceinte grillagée au vu des observations suivantes: la présence d'essaims (comportement de reproduction des moustiques sauvages) a été observée régulièrement au crépuscule pendant une durée d'environ un mois en plusieurs points de l'enceinte et notamment au-dessus des gîtes larvaires et à proximité des marqueurs visuels installés. Ensuite la présence permanente d'œufs, de larves (L1 à L4) et de pupes dans les gîtes larvaires artificiels tant qu'ils étaient disponibles atteste du déroulement des phases aquatiques du cycle. Tout ceci suggère que tous les éléments (hôte nourricier, alimentation sucrée) et conditions écologiques (gîtes larvaires favorables) indispensables au développement larvaire et au maintien de la vie aérienne des moustiques étant parvenus au stade adulte sont présents.

Les variables environnementales (température, humidité relative, précipitations) à l'extérieur de la serre, à l'intérieur de la serre et dans la case en banco ont été enregistrées grâce aux stations météorologiques installées dans chaque point. Ces données sont présentées dans la Figure 24. La saison sèche s'étale cette année de Novembre à Mai avec cependant quelques pluies en Avril. Les températures à l'intérieur de la serre varient de 15,6 à 40°C tandis que l'humidité relative varie de 5 à 95%. Globalement, les moyennes des variables environnementales à l'extérieur, à l'intérieur de la serre et à l'intérieur de la case suivent les mêmes fluctuations.

Tableau IX: Effectifs des populations adultes des trois espèces introduites dans la serre

Année	Période de lâcher	<i>An. coluzzii</i>		<i>An. gambiae</i>		<i>An. arabiensis</i>	
		Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles
2010	05/08 au 24/10	449	329	350	333	360	308
2011	14/09 au 01/11	1295	1279	2393	2310	1867	1766

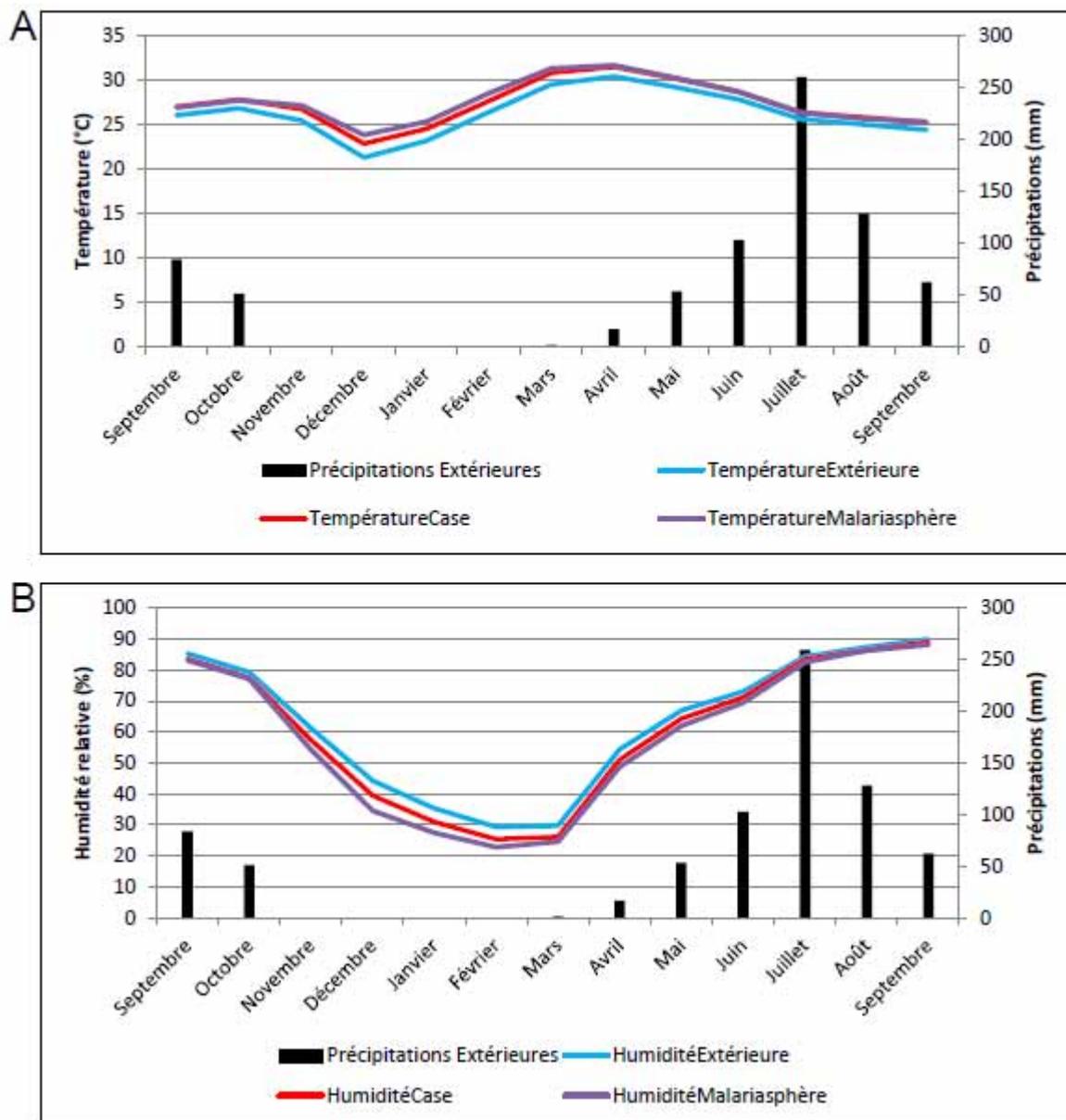


Figure 24: Evolution des moyennes mensuelles de température (A) et d'humidité relative (B) à l'extérieur de la serre (bleu), à l'intérieur de la serre (violet) et à l'intérieur de la case (rouge). Les barres verticales représentent la distribution pluviométrique extérieure.

4.2.2) *Suivi temporel des populations adultes*

La figure 25 représente la présence/absence des anophèles adultes au cours de l'année ainsi que la variation temporelle dans les différents gîtes de repos à l'intérieur de la serre. Les données sont les moyennes mensuelles calculées sur des effectifs comptés pendant une durée de temps fixe de 20 min par jour pour chaque type de site de repos. Les refuges ont été classés en trois catégories à savoir les refuges intérieurs, la case d'habitation locale et l'abri-veau. La densité des adultes est variable en fonction du type de site de repos et de la période de l'année.

De l'introduction des adultes jusqu'au 19 janvier soit 80 jours, les moustiques sont observés en permanence dans les 3 lieux de repos. Mais la densité diminue considérablement jusqu'en Décembre. En période de saison sèche (Janvier – Avril), les moustiques sont quasiment introuvables. Cependant, des anophèles ont pu être observés dans les refuges intérieurs (*i.e* parpaings, canaris). Enfin, à partir de mai (peu après les premières pluies), les vecteurs réapparaissent et la densité croît dans l'abri-veau et les refuges intérieurs mais demeure nulle dans la case d'habitation. Les conditions climatiques (augmentation de l'hygrométrie et baisse de la température, disponibilité en eau) sont alors très favorables à la pullulation des anophèles adultes.

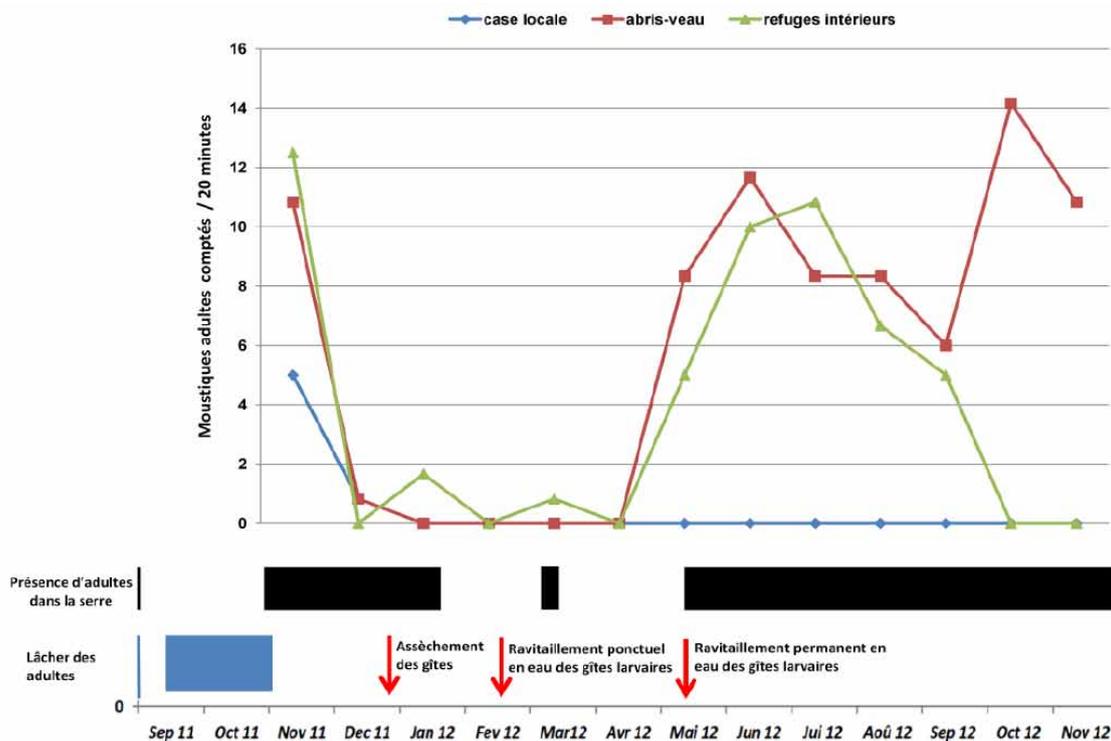


Figure 25: Variation saisonnière des populations adultes d'*An. gambiae* s.l dans les gîtes de repos dans la serre grillagée. Les rectangles noirs correspondent aux périodes de présence des moustiques adultes à l'intérieur de la serre tandis que le rectangle bleu, l'intervalle de temps des lâchers des moustiques dans la serre.

4.2.3) Variation des fréquences relatives et présence des populations pré-imaginale à l'intérieur de la malariasphère.

La dynamique larvaire est présentée à la figure 26. Les larves ont été observées de manière continue jusqu'au 19 Décembre 2011, soit 50 jours environ après l'introduction des

derniers adultes dans la serre. La mise en eau d'un gîte artificiel en pleine saison sèche, le 17 Février puis le 11 Mai 2011 a permis d'observer quelques jours plus tard (5 et 6 jours respectivement) la présence de larves à la surface du gîte. Toutes ces larves appartenaient à l'espèce *An. coluzzii*. *Anopheles gambiae* est présente à l'intérieur de la serre uniquement pendant une courte période en Novembre et Décembre. Au cours du suivi, sur un total de 171 larves collectées et identifiées par PCR, *An. arabiensis* est l'espèce dominante (62,6%), suivie d'*An. coluzzii* (29,6%) et enfin *An. gambiae* (7,60%).

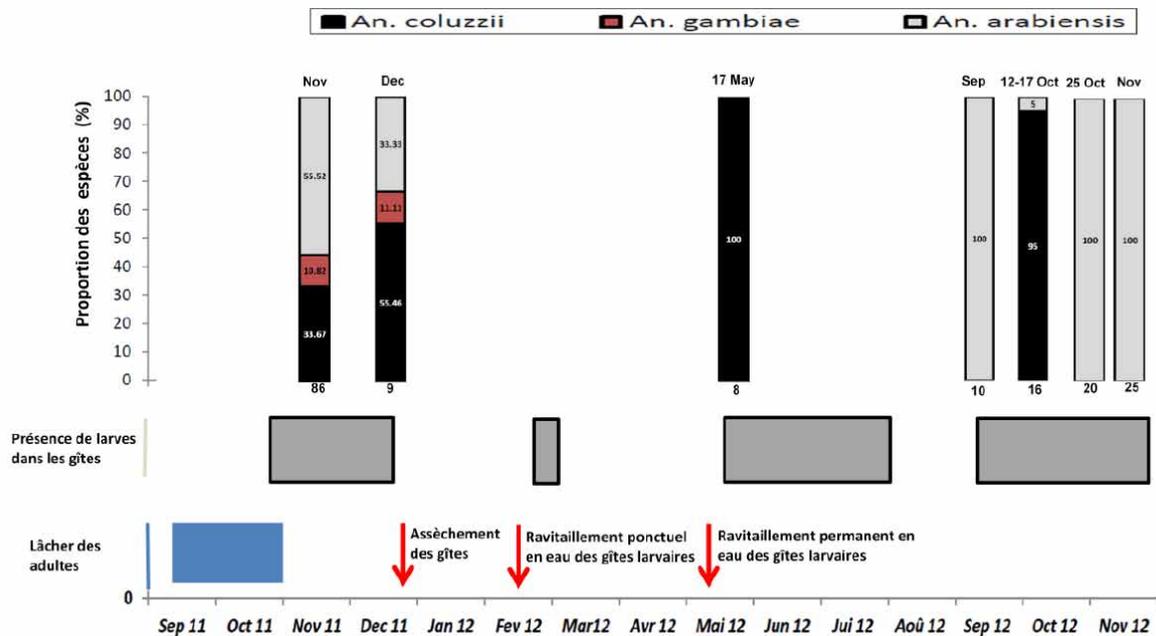


Figure 26: Présence des larves d'anophèle dans la serre grillagée et composition spécifique. Les rectangles gris correspondent aux périodes de présence des larves dans les gîtes larvaires et le rectangle bleu, l'intervalle de temps des lâchers des moustiques dans la serre.

4.3) Discussion

La capacité des moustiques anophèles à persister et surmonter les conditions défavorables de la saison sèche a été évaluée dans cette étude. Nous avons suivi pendant toute l'année la variation temporelle et la distribution à l'intérieur d'une serre grillagée appelée malariasphère, des populations d'*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Des systèmes semi-naturels ont été développés et mis en œuvre avec succès dans de nombreuses régions endémiques du monde et particulièrement en Afrique (Knols et al. 2002, Ferguson et al. 2008, Schaffer et al. 2008, Hassan et al. 2010, Ng'habi et al. 2010, Facchinelli et al. 2011, Ritchie et al. 2011,

Facchinelli et al. 2013). Cette étude décrit pour la première fois en Afrique de l'Ouest, un tel système et son utilisation potentielle pour des études écologiques sur les vecteurs du paludisme en Afrique.

Ce système est réellement viable et reflète aussi proche que possible les conditions environnementales du milieu naturel. La présence des larves de tous les stades (L1 à L4), nymphes et adultes dans les cages d'émergence indique que la réalisation complète du cycle de vie du moustique est effective à l'intérieur de la malariasphère. Tous les traits d'histoire de vie, à savoir l'accouplement, repas sanguin et sucré, oviposition ont eu lieu avec succès dans la serre, démontrant de ce fait la viabilité du système pour les espèces étudiées. Nos données montrent que la malariasphère se caractérise par une large gamme de température et d'humidité relative comparables à celles mesurées pendant la même période dans les conditions naturelles du milieu. Des études en laboratoire ont montré que 27-28°C constitue la température optimale pour le développement d'*An. gambiae* s.l. (Lyimo et al. 1992, Bayoh and Lindsay 2003), tandis que la *fitness* maximale des adultes est manifeste entre 28 et 32°C. Malgré qu'il y ait des températures plus élevées (40°C) et une faible humidité relative pas très favorables aux moustiques, des populations ont résisté à ces conditions et ont recolonisé de manière soudaine le milieu une fois les conditions environnementales redevenues favorables. Pendant la saison sèche, lorsqu'aucune surface en eau n'est disponible, les adultes ont été retrouvés en petit nombre dans des abris cachés. La présence d'adultes en plein milieu de la saison sèche, et des larves dans les gîtes mis en eau suggère en effet l'existence d'un mécanisme de quiescence chez les anophèles du complexe *An. gambiae*, tel que décrit et suggéré par plusieurs auteurs (Holstein 1954, Lehmann et al. 2010, Adamou et al. 2011). En outre, étant donné la faible tolérance à la dessiccation des œufs d'anophèles (Holstein 1954, Beier et al. 1990, Koenraadt et al. 2003), l'augmentation de la densité de la population au retour des conditions favorables doit être due à la présence d'adultes en état d'estivation ou de quiescence et non pas à partir d'œufs ayant résisté à la dessiccation.

Si une espèce particulière est capable de se maintenir pendant la saison sèche par estivation, alors la population de la saison des pluies suivante devrait être constituée uniquement d'individus de cette espèce. Nos résultats montrent la présence d'*An. coluzzii* et *An. arabiensis* la saison pluvieuse suivante, preuve qu'ils ont persisté durant la saison défavorable. Selon (Yaro et al. 2012), les moustiques qui sont capables de développer leurs œufs après le repas de sang et pondre lorsqu'un gîte favorable est disponible sont qualifiés de «estivants faibles», tandis que les «estivants forts» désignent les espèces qui ne développent

pas leurs œufs malgré la prise de repas sanguins ou qui ne pondent pas même si un gîte propice leur est offert. Nos données montrent la présence de larves d'*An. coluzzii*, quelques jours seulement après la mise en eau des gîtes larvaires. Sur cette base, on pourrait penser ou suggérer que cette espèce est un «estivant faible» tandis qu'*An. arabiensis*, réapparu bien plus tard, serait un «estivant fort». Une étude menée au Soudan a constaté que le développement ovarien se produit très lentement chez les femelles collectées pendant la saison sèche. Ces femelles réalisent un seul cycle gonotrophique pendant toute la saison sèche, ce qui leur permet de parvenir au stade gravide et sont prêtes à déposer leurs œufs immédiatement après le début des pluies (Omer and Cloudsley-Thomson 1968).

D'autre part, si une espèce particulière ne peut tolérer la dessiccation et ne peut survivre aux conditions extrêmes de la saison sèche, la recolonisation en saison des pluies est uniquement due aux migrants en provenance des zones adjacentes où les conditions sont favorables. Dans ce cas, la population de cette espèce va disparaître dans notre environnement clos. Nos résultats ont montré qu'*An. gambiae* a complètement disparu et n'a probablement pas pu résister à la dessiccation (Gray and Bradley 2005b). On pourrait alors penser que cette espèce survit essentiellement par migration vers des zones plus clémentes en saison sèche. Ces résultats montrent également que les moustiques adultes sont présents en faible densité dans les habitats cachés pendant la période sèche. Comme tous les arthropodes terrestres, les moustiques doivent faire face à la menace de la dessiccation, de telle sorte que les préférences pour des microclimats sont souvent attendues. En effet, le choix de se réfugier dans des sites particuliers est essentiel à la survie en période de chaleur et de sécheresse. Les preuves évidentes présentées dans cette étude confirment que les moustiques sélectionnent des microhabitats pendant la saison sèche, probablement pour minimiser les effets néfastes de l'exposition à des températures élevées. Plusieurs études antérieures ont démontré la présence de quelques moustiques cachés dans des refuges pendant les mois les plus chauds (Holstein 1954, Charlwood et al. 2000, Minakawa et al. 2001). Cette caractéristique comportementale est très cohérente avec le mécanisme d'estivation.

4.4) Conclusion partielle

Cette étude en conditions semi-naturelles apporte des données nouvelles pour notre compréhension de la persistance des espèces du complexe *An. gambiae* s.l. dans les conditions sévères de la saison sèche. Les populations d'*An. gambiae* s.l. seraient maintenues localement durant la saison sèche par l'intermédiaire des adultes réfugiés dans les sites de

repos leur offrant des conditions de mieux résister à la dessiccation. Par ailleurs, des larves d'*An. coluzzii* ont colonisé aussi rapidement les gîtes quelques jours après leur mise en eau. Ce qui sous-entend que les femelles d'*An. coluzzii* persisteraient dans un état physiologique prêt à permettre l'oviposition dès qu'un gîte larvaire est disponible (concordance gonotrophique). Par contre les femelles d'*An. arabiensis* pourraient persister dans un état physiologique qui ne permet pas l'oviposition (discordance gonotrophique) et ce jusqu'au retour des conditions favorables permettant la reprise de la reproduction. La disparition ou l'extinction complète d'*An. gambiae* dans un environnement clos suggère l'hypothèse que la recolonisation sur le terrain se fait par des populations de migrants provenant des zones voisines où les conditions sont favorables à leur développement. Un argument pouvant être avancé pour expliquer cette disparition est celle de la faible capacité à supporter cette longue période des conditions défavorables.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Cette thèse a pour ambition de documenter la bioécologie en saison sèche des espèces du complexe *An. gambiae* s.l., vecteurs majeurs du paludisme au Burkina Faso et ainsi contribuer à une meilleure connaissance des stratégies de survie mises en place par les moustiques pour pallier aux conditions stressantes de la saison sèche. Plus précisément, il s'agissait d'examiner les réponses ou signatures physiologiques, métaboliques, morphologiques et comportementales mises en place par ces espèces du complexe *An. gambiae* s.l. à l'approche de la saison sèche à l'Ouest du Burkina Faso. Des différences importantes dans les stratégies et cinétiques d'acquisition, de stockage et d'utilisation des ressources ont été mises en évidence, aussi bien entre les 3 espèces jumelles que nous avons étudiées, qu'au sein de chaque espèce, en fonction des conditions environnementales. Les résultats obtenus au laboratoire trouvent leur écho sur le terrain et des phénotypes particuliers ont été décrits pour chaque espèce. Ces différences traduisent notamment différents compromis entre survie et reproduction, qui façonnent la dynamique des populations naturelles de vecteurs et leur permettent d'utiliser de façon optimale l'hétérogénéité spatiale et temporelle de leur environnement. Ainsi, en conditions naturelles, la physiologie de la reproduction, de l'allocation des ressources énergétiques, mais aussi la morphologie géométrique alaire ont été examinées dans deux sites d'études. Les analyses effectuées donnent l'image globale d'une plasticité physiologique et morphologique importante à l'approche de la saison sèche. Ainsi, les femelles adultes d'*An. coluzzii* émergeant pendant la période de transition entre la saison de pluies et la saison sèche dans le village de Soumousso manifestent une dépression de leur reproduction. En effet, une proportion très significative des femelles de cette espèce collectées en saison sèche ne développait pas leurs ovaires jusqu'à maturité (les ovaires restent bloqués au stade prégravidé) malgré la prise de cinq repas de sang. Ce phénomène n'est cependant pas observé à Bama reflétant la présence et le développement continu de cette espèce dans ce village. Pour cette espèce et d'après les résultats obtenus sur le terrain, l'hypothèse d'une dépression de la reproduction au profit de l'extension de la durée de vie des adultes peut être évoquée, qui rappelle le phénotype de diapause reproductrice, comme évoqué dans la littérature. Nous avons également pu mettre en évidence un rôle important de la gestion des réserves lipidiques dans l'adaptation des vecteurs à leur environnement. Certains de ces lipides pourraient être également impliqués dans les modifications morphologiques observées au niveau des spiracles, à l'image de ce qui a été reporté chez la drosophile.

En conditions contrôlées, et en utilisant des colonies de laboratoire, nous avons mimé dans des enceintes climatiques les conditions environnementales de la saison de pluies et de saison sèche. A travers les analyses GC-MS et EIA, nous avons mis en évidence un dimorphisme sexuel important dans les réponses métabolique et hormonale aux conditions de la SS. Les mâles n'ajustent pas ou peu leurs métabolites secondaires en fonction des conditions environnementales, ce qui peut être lié à la capacité différente des deux sexes à résister à la saison sèche. En effet, dans les travaux pionniers sur les stratégies de survie en saison sèche réalisés dans la zone de Bobo Dioulasso, très peu voire aucun mâle n'avait pu être trouvé sur le terrain lors des campagnes d'échantillonnage. Les mâles se caractérisent cependant par des concentrations élevées en hormones ecdystéroïdes, qui diminuent chez *An. coluzzi* en saison sèche. Les mâles de cette espèce seraient ainsi indirectement impliqués dans la dépression de la reproduction observée chez les femelles, dans notre étude mais aussi dans la littérature. Les femelles des 3 espèces étudiées montrent par contre des ajustements physiologiques importants. Ces ajustements impliquent particulièrement une diminution significative des intermédiaires du cycle de Krebs et de l'acide aminé Isoleucine, impliqué dans le développement des œufs. Ces données témoignent d'une dépression métabolique en général mais aussi d'une diminution de l'activité de reproduction pendant la saison sèche chez les 3 espèces. Parallèlement, les observations en microscopie électronique à balayage ont permis de mettre en évidence des caractéristiques originales de la morphologie des spiracles respiratoires en réponse aux conditions drastiques de la saison sèche. Il semble qu'*An. coluzzii* et *An. arabiensis* réduisent au maximum l'ouverture de leurs spiracles grâce à l'hypertrophie de structures appelées trichomes. Implicitement, ce phénomène implique des pertes en eau ajustées et peut également accompagner la mise en place d'une dépression métabolique comme le suggèrent nos données de métabolomique. Enfin, la dernière partie de notre étude était consacrée à la mise en place d'un système clos à l'intérieur duquel l'environnement naturel des vecteurs est reproduit. Cette structure originale mise en place pour la première fois en Afrique de l'Ouest s'est révélée très prometteuse et offre une réelle opportunité pour la réalisation des études écologiques des vecteurs. Cette étude nous a permis de démontrer que les espèces du complexe *An. gambiae* s.l. sont capables de se maintenir pendant la saison sèche en l'absence des gîtes larvaires et réapparaître lorsque les conditions sont redevenues favorables. D'après nos résultats, ces espèces seraient capables de se maintenir en partie grâce à leur capacité à se réfugier dans des microhabitats favorables.

De tout ce qui précède, ces résultats dans leur ensemble montrent des indices qui suggèrent qu'*An. coluzzii* et *An. arabiensis* possèdent des capacités d'estivation pour traverser la période défavorable de la saison sèche. Ces capacités se manifestent par une accumulation des réserves énergétiques, une dépression reproductrice dans les zones où les gîtes larvaires ne sont pas pérennes, une modification morphologique des spiracles respiratoires et de la taille et des ajustements métaboliques en faveur d'une diminution de la capacité métabolique et de la reproduction. Ces ajustements physiologiques et morphologiques associées au comportement de recherche des sites de refuges moins exposées à la chaleur auraient sans doute contribué au maintien localement des populations pendant la période défavorable et leur réapparition lorsque les conditions sont redevenues favorables. *Anopheles gambiae*, contrairement à *An. coluzzii* et *An. arabiensis* se caractérise par une faible modification de ces phénotypes et en particulier la disparition de cette espèce durant la saison sèche suggère que cette espèce opérerait pour une recolonisation en début de saison des pluies par migration à partir des zones voisines plus favorables.

Ainsi, bien que les stratégies adaptatives, diapause, quiescence, ou migration, ne soient toujours pas formellement identifiées, nos études ont permis l'identification de nouvelles molécules et comportements qui contribuent au moins en partie à ces adaptations spécifiques et qui pourront appeler au développement de méthodes de contrôle innovantes. En effet, à l'image de l'hiver en zone tempérée, le passage de la saison sèche tropicale pour ces organismes fragiles reste un challenge primordial. Perturber ces mécanismes par des actions spécifiques pourrait alors permettre de fragiliser cet équilibre en rendant les moustiques inaptes à survivre dans de tels environnements.

Perspectives

Dans cette thèse, nous nous sommes limités à rechercher les réponses phénotypiques mises en place par les membres du complexe *An. gambiae* s.l. au moment de l'installation de la saison sèche, caractérisée par les fluctuations des paramètres environnementaux tels que la température et l'humidité relative. Il serait important dans des études ultérieures de découpler ces différents paramètres afin d'identifier le stimulus ou les stimuli clefs responsables de la mise en place des stratégies de survie en faisant varier un à un et de manière séquentielle, les différents paramètres physiques (température, hygrométrie, photopériode) et biologiques (densité larvaire) lors de l'élevage des moustiques. Les symptômes physiologiques jugés

significatifs et apparaissant sur le terrain et dans la serre au moment de l'installation de la saison sèche seront recherchés. Ce travail sera réalisé sur plusieurs générations, afin de mettre en évidence, s'il existe, un «effet maternel» connu pour stimuler l'apparition des phénomènes de dormance chez les insectes (Denlinger 1986, 2002, Mousseau and Dingle, 1991). De plus, les ajustements métaboliques et morphologiques que nous avons mis en évidence au cours de cette étude vont dans le sens d'une faible capacité métabolique engendrée par les fluctuations des paramètres environnementaux et d'une réduction des pertes en eau. Il serait important d'évaluer le taux métabolique par la mesure des échanges gazeux respiratoires grâce aux expériences de respirométrie reflétant directement le statut métabolique de l'individu. De même, la mesure de l'épaisseur de la cuticule nous renseignera sur la capacité de la résistance à la dessiccation en limitant les pertes en eau à travers la cuticule. La plupart de nos résultats se situent principalement dans l'ère post génomique. L'ensemble du génome de l'anophèle étant séquencé (Holt et al. 2002), il serait important de passer à l'analyse de leurs bases génétiques afin d'identifier les gènes exprimés et ainsi accéder à une vraie compréhension des mécanismes impliqués dans l'adaptation aux conditions d'aridité de la saison sèche. Certes notre méthode a des limites dans le suivi de la dynamique des populations adultes compte tenu de l'effectif limité à l'intérieur de la serre, mais il serait souhaitable et intéressant d'utiliser d'autres approches telles l'utilisation des marqueurs d'exposition aux piqûres d'anophèles dans la serre en mesurant la réponse anti salive du moustique chez les bovins exposés.

La caractérisation fine des mécanismes responsables des ajustements physiologiques et comportementaux permettant la survie des vecteurs en saison sèche générera autant de données fondamentales pour la mise en place de stratégies de lutte alternative possiblement basées sur l'utilisation d'insectes génétiquement modifiés (interruption génétique ou chimique des voies métaboliques impliquées dans la survie). De telles données fourniront en outre la base scientifique innovante d'un contrôle des vecteurs d'autant plus efficace qu'il interviendrait à un moment où les populations de vecteurs sont les plus faibles et dans des conditions environnementales qui leur sont particulièrement défavorables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adam JP, Vattier G and Pajot FX.** Dysharmonie gonotrophique chez deux anophèles cavernicoles du Congo (Brazzaville). *Bull Soc Path Exot.* 1964; 57: 397 - 399.
- Adamou A, Dao A, Timbine S, Kassogue Y, Yaro AS, Diallo M, Traore SF, Huestis DL and Lehmann T.** The contribution of aestivating mosquitoes to the persistence of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *Malar J.* 2011; 10: 151.
- Adedokun TA and Denlinger DL.** Metabolic reserves associated with pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J Insect Physiol.* 1986; 33: 229 – 233.
- Andersen SO and Roepstorff P.** Aspects of cuticular sclerotization in the locust, *Schistocerca gregaria*, and the beetle, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007; 37: 223 - 234.
- Andrewartha HG.** Diapause in relation to the ecology of insects. *Biol Rev.* 1952; 27: 50 – 107.
- Arrese EL and Soulages JL.** Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* 2010; 55: 207-225.
- Auerswald L, Schneider P and Gade G.** Utilisation of substrates during tethered flight with and without lift generation in the African fruit beetle *Pachnoda sinuata* (Cetoniinae). *J Exp Biol.* 1998; 201: 2333 - 2342.
- Ayala FJ and Coluzzi M.** Chromosome speciation: Humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *P Natl Acad Sci USA* 102 Suppl 1. 2005; 6535 – 6542.
- Back JF, Oakenfull D and Smith MB.** Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochem J.* 1979; 18: 5191-5196.
- Bai H, Gelman DB and Palli SR.** Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Pest Manag Sci.* 2010; 66: 936–943.
- Baldet T, Diabate A and Guiguemdé TR.** Malaria transmission in 1999 in the rice field area of the Kou Valley (Bama), Burkina Faso. *Cahiers Santé.* 2003; 13: 55 - 60.
- Bale JS.** Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Phil Trans R Soc Lond B.* 2002; 357: 849 - 862.
- Bayoh MN and Lindsay SW.** Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Research.* 2003; 93: 375-381.

- Beier JC, Copeland R, Oyaro C, Masinya A, Odago WO, Oduor S, Koech DK and Roberts CR.** *Anopheles gambiae* complex egg-stage survival in dry soil from larval development sites in Western Kenya. J Am Mosq Control Assoc.1990; 6: 105-109.
- Bemis WE, Burggren WW and Kemps NE.** The Biology and Evolution of Lungfish Alan R. Liss (eds), New York, NY, USA.1987.
- Benoit J and Denlinger DL.** Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. J Exp Biol.2007; 210: 217.
- Borror DJ, Triplehorn CA and Johnson NF.** An introduction to the study of insects, 6th edn. Saunders College, USA.1989.
- Bowen MF.** Patterns of sugar feeding in diapausing and nondiapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) females. J Med Entomol.1992; 29: 843 – 849.
- Bownes M.** The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. J Insect Physiol.1989; 35: 409 - 413.
- Breman JG, Alilio MS and White NJ.** Defining and defeating the intolerable burden of malaria III. Progress and perspectives. Am J Trop Med Hyg. 2007; 77: vi–xi.
- Briegel H.** Mosquito reproduction: incomplete utilization of the blood meal protein for oogenesis. J Insect Physiol.1985; 31: 15 – 21.
- Briegel H.** Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. J Med Entomol.1990; 27(5): 839 – 850.
- Bruce-Chwatt LJ and De Zulueta J.** Essential Malariology. W. Heinemann med. Books Ltd, London, 1985; chap. 8:166-209.
- Buck JB and Keister ML.** Respiration and water loss in the adult blowfly, *Phormia regina*, and their relation to the physiological action of DDT. Biol Bull.1949; 97: 64 - 81.
- Burkett BN and Schneiderman HA.** Control of Spiracles in Silk Moths by Oxygen and Carbon Dioxide. Science. 1967; 156: 1604 - 1605.
- Bursell B.** Spiracular control of water loss in the tsetse fly. Proc Roy Entomol Soc London (A). 1957; 32: 21-29.
- Bursell E, Billing KC, Hargrove JW, McCabe CT and Slack E.** Metabolism of the bloodmeal in tsetse flies (a review). Acta Tropica. 1974; 31: 297 - 230.
- Camara M, Caro-Riano H, Ravel S, Dujardin JP, Hervouet JP, De Meeus T, Kagbadouno MS, Bouyer J and Solano P.** Genetic and morphometric evidence for population isolation of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) on the Loos islands, Guinea. J Med Entomol. 2006 ; 43: 853-860.

- Carnevale P and Robert V.** Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. Marseille: IRD-Editions. 2009.
- Chang YYH and Judson CL.** The role of isoleucine in differential egg production by the mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) following feeding on human or guinea pig blood. *Comp Biochem Physiol A*.1977; 57: 23 - 28.
- Charlwood J, Vij R and Billingsley PF.** Dry season refugia of malaria-transmitting mosquitoes in a dry savannah zone of east Africa. *Am J Trop Med Hyg*.2000; 62: 726 - 732.
- Charlwood JD, Thomson R and Madsen H.** The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. *J Vector Ecol*.2002; 27: 178 -183.
- Chino H.** Carbohydrate metabolism in the diapausing egg of the silkworm, *Bombyx mori* II: Conversion of glycogen into glycerol and sorbitol during diapause. *J Insect Physiol*. 1958; 2: 1 - 12.
- Chippindale AK, Chu TJ, and Rose MR.** Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 1996; 50: 753 -766.
- Chown SL.** Respiratory water loss in insects. *Comp Biochem Physiol A*. 2002; 133: 791 - 804.
- Clark MS, Thorne MA, Purac J, Burns G, Hillyard G, Popovic ZD, Grubor-Lajsic G, and Worland MR.** Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*. 2009; 10: 328.
- Clements AN.** The biology of mosquitoes, In Development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London; New York. 1992.
- Cloudsley-Thompson JL.** Adaptations of arthropoda to arid environments. *Annu Rev Entomol*. 1975; 20: 261-283.
- Coetzee M, Craig M and Le Sueur D.** Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today*. 2000; 16: 74-77.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, della Torre A, Coulibaly MB and Besansky NJ.** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*. 2013; 3619: 246 – 274.
- Collins WE.** *Plasmodium knowlesi*: A malaria parasite of monkeys and humans. *Annu Rev Entomol*. 2002; 57: 107–121.

- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V and Di Deco MA.** Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73: 483 - 497.
- Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA, and Petrarca V.** A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science.* 2002; 298: 1415-1418.
- Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, Ose K, Fotsing JM, Sagnon N, Fontenille D, Besansky NJ and Simard F.** Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol.* 2009; 9: 16.
- Dabiré KR, Diabaté A, Namountougou M, Toe KH, Ouari A, Kengne P, Bass C and Baldet T.** Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103: 1113-1120.
- Danks HV.** *Insect Dormancy: An Ecological Perspective.* Ottawa: Biol Surv Can (Terrestrial Arthropods). 1987.
- Danks HV.** Key themes in the study of seasonal adaptations in insects. II. Life cycle patterns. *Appl Entomol Zool.* 2006; 41: 1 - 13.
- della Torre A, Tu Z and Petrarca V.** On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005; 35: 755 - 769.
- della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR and Coluzzi M.** Speciation within *An. gambiae* - the glass is half full. *Science.* 2002 ; 298: 115 - 117.
- Delmont J.** Paludisme et variations climatiques saisonnières en savane soudanaise d'Afrique de l'Ouest. In: *Cahiers d'études africaines.* 1982; 22: 117-133.
- Denlinger DL.** Dormancy in tropical insects. *Ann Rev Entomol.* 1986; 31: 239 -264.
- Denlinger DL.** Regulation of diapause. *Annu Rev Entomol.* 2002; 47: 93-122.
- Denlinger DL and Armbruster PA.** Mosquito diapause. *Annu Rev Entomol.* 2014; 59: 73 – 93.
- Denlinger DL, Wilis JH and Fraenkel G.** Rates and cycles of oxygen consumption during pupal diapause in *Sarcophaga* flesh flies. *J Insect Physiol.* 1972; 18: 871-882.

- Denlinger DL, Yocum GD and Rinehart JP.** Hormonal control of Diapause. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford: Elsevier. 2005; 615-650.
- Denlinger DL, Yocum GD and Rinehart JP.** Hormonal control of diapause. In *Insect Endocrinology*, ed. LI Gilbert, pp. 430–63. San Diego, CA: Academic. 2012.
- Detinova T.** Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. World Health Organisation, Monogr Series. 1962; 47: 216p.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemde TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ and Hougard JM.** The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67: 617 - 622.
- Diabaté A, Brengues C, Baldet T, Dabiré KR, Hougard JM, Akogbeto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J and Chandre F.** The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health.* 2004 ; 9 1267-1273.
- Diagne N, Fontenille D, Konate L, Faye O, Lamizana MT, Legros F, Molez JF and Trape JF.** Les anophèles du Sénégal. Liste commentée et illustrée. *Bull Soc Path Ex.* 1994; 87: 267- 277.
- Dingle H.** The experimental analysis of migration and life-history strategies in insects. L Barton Browne (ed.), *Experimental Analysis of Insect Behaviour*. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. 1974.
- Dryden IL and Mardia KV.** *Statistical shape analysis*. Chisester, UK: Wiley. 1998.
- Dujardin JP.** Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 875–890.
- Dujardin JP, Kaba D and Henry AB.** The exchangeability of shape. *BMC research notes.* 2010; 3: 266.
- Edillo FE, Toure YT, Lanzaro GC, Dolo G and Taylor CE.** Spatial and habitat distribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Banambani village, Mali. *J Med Entomol.* 2002; 39: 70-77.
- Facchinelli L, Valerio L, Bond JG, Wise de Valdez MR, Harrington LC, Ramsey JM, Casas-Martinez M and Scott TW.** Development of a semi-field system for contained

- field trials with *Aedes aegypti* in southern Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85: 248-256.
- Facchinelli L, Valerio L, Ramsey JM, Gould F, Walsh RK, Bond G, Robert MA, Lloyd AL, James AA, Alphey L and Scott TW.** Field cage studies and progressive evaluation of genetically-engineered mosquitoes. *PLoS Neglect Trop D.* 2013; 7: 2001.
- Fanello C, Santolamazza F and della Torre A.** Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol.* 2002; 16: 461 - 464.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, SideénKiamos I and Louis C.** Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 2001; 10: 15 - 23.
- Feder ME and Hofmann GE.** Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61: 243 – 282.
- Ferguson HM, Ng'habi KR, Walder T, Kadungula D, Moore SJ, Lyimo I, Russell TL, Urassa H, Mshinda H, Killeen GF and Knols BG.** Establishment of a large semi-field system for experimental study of African malaria vector ecology and control in Tanzania. *Malar J.* 2008; 7: 158.
- Fernandes L and Briegel H.** Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol.* 2005; 30: 11 - 26.
- Fontenille D, and Simard F.** Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27: 357-375.
- Fontenille D, Cohuet A, AwonoAmbene PH, AntonioNkondjio C, Wondji C, Kengne P, Dia I, Boccoloni D, Duchemin JB, Rajaonarivelo V, Dabiré KR, Akre A, Ceainu C, LeGoff G and Simard F.** Systématique et biologie des anophèles vecteurs de Plasmodium en Afrique de l'Ouest, données récentes. *Rev Med Trop.* 2003; 63: 247 - 253.
- Foster WA.** Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol.* 1995; 40: 443 – 474.
- Foster WA and Takken W.** Nectar-related versus human-related volatiles: behavioural response and choice by female and male *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) between emergence and first feeding. *Bull Entomol Res.* 2004; 94: 145 – 157.

- Fouet C, Gray E, Besansky NJ and Costantini C.** Adaptation to Aridity in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*: Chromosomal inversion polymorphism and body size influence resistance to desiccation. PloS one. 2012; 7: e34841. doi:34810.31371/journal.pone.0034841.
- Fournet F, Cussac M, Ouari A, Meyer PE, Toé KH, Gouagna LC and Dabiré KR.** Diversity in anopheline larval habitats and adult composition during the dry and wet seasons in Ouagadougou (Burkina Faso). Malaria J. 2010; 9:78.
- Gallaway WJ and Brust RA.** Blood-feeding and gonotrophic dissociation in overwintering *Anopheles earlei* (Diptera: Culicidae) from southern Manitoba. Can Ent. 1982; 114: 1105 -1107.
- Gibbs AG, Chippindale A and Rose M.** Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. J Exp Biol. 1997; 200: 1821–1832.
- Gibbs AG and Johnson RA.** The role of discontinuous gas exchange in insects: the chthonic hypothesis does not hold water. J Exp Biol. 2004; 207: 3477 - 3482.
- Gillies MT and de Meillon B.** The Anophelinae of Africa South of the Sahara, Johannesburg: South African Institute for Medical Research (Ethiopian Zoogeographical Region) Publ S Afr Inst Med Res. 1968; 54: 1 - 343.
- Gillies MT and Coetzee M.** Anophelines mosquitoes: A supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). Publication no. 55. Johannesburg: The South African Institute for Medical Research. 1987; 143 p.
- Gillott C.** Entomology, third édition. Springer, Netherlands. 2005; 831 p.
- Gimonneau G, Brossette L, Mamaï W, Dabiré KR and Simard F.** Larval competition between *An. coluzzii* and *An. gambiae* in insectary and semi-field conditions in Burkina Faso. Acta Tropica. 2014; 130: 155 - 161.
- Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A and Simard F.** A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Behav Ecol. 2010; 21: 1087–1092.
- Gimonneau G, Pombi M, Dabiré RK, Diabaté A, Morand S and Simard F.** Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. Parasit Vectors. 2012a; 5: 65.
- Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabire KR and Simard F.** Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. Med Vet Entomol. 2012b; 26: 9 - 17.

- Giokas S, Pafilis P and Valakos E.** Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (Pulmonata: Clausiliidae). *J Moll Stud.* 2005; 71: 15 - 23.
- Gothe R and Schöl H.** Morphology and structural organization of spiracles in female *Argas (Persicargas) walkerae* (Acari: Argasidae). *Exp Applied Acarol.* 1992; 14: 151-163.
- Gouagna LC, Poueme RS, Dabiré KR, Ouédraogo JB, Fontenille D and Simard F.** Patterns of sugar feeding and host plant preferences in adult males of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Vect Ecol.* 2010; 32: pp10.
- Graves JL, Toolson EC, Jeong C, Vu LN and Rose MR.** Desiccation, flight, glycogen and postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Zool.* 1992; 65: 268–286.
- Gray, E., and T. J. Bradley. 2005.** Physiology of desiccation resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Am J Trop Med Hyg* 73: 553-559.
- Gray EM, Rocca KAC, Costantini C and Besansky NJ.** Inversion 2La is associated with enhanced desiccation resistance in *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2009; 8: 215.
- Hadley NF.** Desert species and adaptation. *Am Sci.* 1972; 60: 338 - 347.
- Hadley NF.** Water Relations of Terrestrial Arthropods. Academic Press, San Diego, CA. 1994.
- Hagedorn HH.** The role of ecdysteroids in the adult Insect. In Downer RGH, Laufer H, editors. *Endocrinology of Insects.* New York: Alan R. Liss, Inc. 1983; 271 - 304.
- Hagedorn HH.** The endocrinology of the adult female mosquito. *Advances Dis Vect Research.* 1994; 10: 109–148.
- Hagedorn HH, O'Connor JD, Fuchs MS, Sage B, Schlaeger DA and Bohm MK.** The ovary as a source of α -ecdysone in an adult mosquito. *P Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 3255 - 3259.
- Hahn DA and Denlinger DL.** Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *J Insect Physiol.* 2007; 53: 760 - 773.
- Hahn DA, and Denlinger DL.** Energetics of insect diapause. *Annu Rev Entomol.* 2011 ; 56: 103 – 121.
- Hamon J.** Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta); cycles d'agressivité et variations saisonnières. *Ann Soc Ent France.* 1963; 132: 85 - 144.
- Harbach RE.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera : Culicidae) : a working hypothesis of phylogeneric relationship. *Bul Ent Res.* 2004; 94 537-553.

- Harrington LC, Edman JD and Scott TW.** Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J Med Entomol.* 2001; 38: 411 - 422.
- Hassan MM, El-Motasim WM, Ahmed RT and El-Sayed BB.** Prolonged colonisation, irradiation, and transportation do not impede mating vigour and competitiveness of male *Anopheles arabiensis* mosquitoes under semi-field conditions in Northern Sudan. *MWJ.* 2010; 1.
- Hendrix DL and Salvucci ME.** Polyol metabolism in homopterans at high temperatures: accumulation of mannitol in aphids (*Aphididae: Homoptera*) and sorbitol in whiteflies (*Aleyrodidae: Homoptera*) *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol.* 1998; 120: 487 - 494.
- Henle KJ, Nagle WA, Moss Jr AJ, and Herman TS.** Polyhydroxy compounds and thermotolerance: a proposed concatenation. *Radiation research.* 1982; 92: 445-451.
- Hernandez-Martinez S, Mayoral JG, Li Y and Noriega FG.** Role of juvenile hormone and allatotropin on nutrient allocation, ovarian development and survivorship in mosquitoes. *J Insect Physiol.* 2007; 53: 230-234.
- Hill JK, Griffiths HM and Thomas CD.** Climate Change and Evolutionary Adaptations at Species' Range Margins. *Annu Rev Entomol.* 2011; 56: 143 – 159.
- Hoffmann AA, Sorensen JG and Loeschcke V.** Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J Therm Biol.* 2003; 28: 175 – 186.
- Holstein MH.** Biology of *Anopheles gambiae*. Research in French West Africa World Health Organization, Geneva. 1954.
- Huestis DL, Yaro AS, Traoré AI, Adamou A, Kassogué Y, Diallo M, Timbiné S, Dao A and Lehmann T.** Variation in metabolic rate of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in a Sahelian village. *J Exp Biol.* 2011; 214: 2345 - 2353.
- Huestis DL, Yaro AS, Traoré AI, Dieter KL, Nwagbara JI, Bowie AC, Adamou A, Kassogué Y, Diallo M, Timbiné S, Dao A and Lehmann T.** Seasonal variation in metabolic rate, flight activity and body size of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *J Exp Biol.* 2012 ; 215: 2013 - 2021.
- Issartel J.** Adaptation de la faune souterraine aux basses températures : mécanismes et enjeux écologiques. Thèse de Doctorat d'Université. Université Claude Bernard Lyon 1. 2007 ; 164p.

- Jawara M, Pinder M, Drakeley CJ, Nwakanma DC, Jallow E, Bogh C, Lindsay SW and Conway DJ.** Dry season ecology of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in The Gambia. *Malar J.* 2008; 7.
- Jirakanjanakit N and Dujardin JP.** Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. *Se Asian J Trop Med.* 2005; 36: 858–861.
- Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrunkiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C and Dujardin JP.** Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*. *Trop Med Int Health.* 2007; 12: 1354–1360.
- Kanwisher JW.** Tracheal gas dynamics in pupae of the cecropia silkworm. *Biol Bull.* 1966; 130: 96 -105.
- Kesler P.** Respiration and respiratory water loss. In: Hoffmann K (eds) *Environmental physiology and biochemistry of insects.* Springer, Berlin Heidelberg New York. 1985; 137–184.
- Klowden MJ.** Endocrine aspects of mosquito reproduction. *Arch Insect Bioch Physiol.* 1997; 35: 491–512.
- Knols BGJ, Njiru BN, Mathenge EM, Mukabana WR, Beier JC and Killeen GF.** MalariaSphere: A greenhouse-enclosed simulation of a natural *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) ecosystem in western Kenya. *Malar J.* 2002; 1.
- Koenraadt C, Paaijmans K, Githeko A, Knols B and Takken W.** Egg hatching, larval movement and larval survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* in desiccating habitats. *Malar J.* 2003; 2: 20.
- Korsloot A, vanGestel CAM and vanStraalen NM.** Environmental stress and cellular response in arthropods. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2004; 197 p.
- Kostál V.** Eco-physiological phases of insect diapause. *J Insect Physiol.* 2006; 52: 113 - 127.
- Košťál V, Slachta M and Simek P.** Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comp Biochem Physiol B.* 2001; 130: 365 - 374.
- Košťál V, Renault D and Rozsypal J.** Seasonal changes of free amino acids and thermal hysteresis in overwintering heteropteran insect, *Pyrrhocoris apterus* *Comp Biochem Physiol A.* 2011; 160: 245 - 251.
- Krafsur ES.** Behavior of Thoracic Spiracles of *Aedes* Mosquitoes¹ in Controlled Relative Humidities. *Annals Entomol Soc Am.* 1971; 64: 93 - 97.

- Lanciani CA.** Photoperiod and the relationship between wing length and body weight in *Anopheles quadrimaculatus*. J Am Mosq Contr Assoc. 1992; 8: 297- 300.
- Lee Y, Meneses C, Fofana A, and Lanzaro GC.** Desiccation resistance among subpopulations of *Anopheles gambiae s.s.* from Selinkenyi, Mali. J Med Entomol. 2009; 46: 316-320.
- Lehman FO.** Matching spiracle opening to metabolic need during flight in *Drosophila*. Science. 2001; 294: 1926-1929.
- Lehmann T and Diabaté A.** The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective. Infect Genet Evol. 2008; 8: 737 - 746.
- Lehmann T, Dao A, Yaro AS, Adamou A, Kassogue Y, Diallo M, Sekou T and Coscaron-Arias C.** Aestivation of the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* in the Sahel. Am J Trop Med Hyg. 2010; 83: 601 - 606.
- Li A and Denlinger DL.** Pupal cuticle protein is abundant during early adult diapause in the mosquito *Culex pipiens*. J Med Entomol. 2009; 46: 1382 - 1386
- Lighton JRB.** Discontinuous gas exchange in insects. Annu Rev Entomol. 1996; 41: 309 - 324.
- Lighton JRB, Garrigan DA, Duncan FD and Johnson RA.** Spiracular control of respiratory water loss in female alates of the harvester ant *Pogonomyrmex rugosus*. J Exp Biol. 1993; 179: 233 - 244.
- Lyimo EO, Takken W and Koella JC.** Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. Entomologia Experimentalis Applicata. 1992; 63: 265-271.
- MacRae T.** Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. Cell Mol Life Sci. 2010; 67: 2405–2424.
- Magnarelli LA.** Blood-feeding and gonotrophic dissociation in *Anopheles punctipennis* (Diptera: Culicidae) prior to hibernation in Connecticut. J Med Entomol. 1979; 15: 278 - 281.
- Mellanby K.** The site of water loss from insects. Proc Roy Soc Ser B. 1934; 116: 139 -149.
- Melody S, Clark M and Worland R.** How insects survive the cold: molecular mechanisms - a review. J Comp Physiol B. 2008; 178: 917 - 933.
- Michaud MR and Denlinger DL.** Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapauses in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. J Insect Physiol. 2006; 52: 1073-1082.

- Michaud MR, Benoit JB, Lopez-Martinez G, Elnitsky MA, Lee JEJ and Denlinger DL.** Metabolomics reveals unique and shared metabolic changes in response to heat shock, freezing, and desiccation in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *J Insect Physiol.* 2008; 54: 645-655.
- Michaud RM and Denlinger DL.** Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated coldhardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J Comp Physiol B.* 2007; 177: 753-763.
- Miller PL.** Factors altering spiracle control in adult dragonflies: water balance. *Exp Biol.* 1964; 41: 331 - 343.
- Minakawa N, Githure JI, Beier JC and Yan G.** Anopheline mosquito survival strategies during the dry period in western Kenya. *J Med Entomol.* 2001 ; 38(3): 388 – 392.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, RichardLenoble D, and Sircoulon J.** Biodiversité du paludisme dans le monde. Edition John Libbey. 2004 ; pp 117.
- Mouline K, Mamai W, Agnew P, Tchonfienet M, Brengues C, Dabiré KR, Robert V and Simard F.** Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med Vet Entomol.* 2012; 26: 447– 454.
- Mousseau TA and Dingle H.** Maternal effects in insects life histories. *Ann Rev Entomol.* 1991; 36: 511 - 534.
- Nagpal B, Srivastava A, Kalra N and Subbarao S.** Spiracular indices in *Anopheles stephensi*: a taxonomic tool to identify ecological variants. *J Med Entomol.* 2003; 40: 747-749.
- Namountougou M, Simard F, Baldet T, Diabate A, Ouedraogo JB, Martin T and Dabire KR.** Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso, West Africa. *PloS one.* 2012; 7: e48412.
- Ng'habi KR, Mwasheshi D, Knols BG and Ferguson HM.** Establishment of a self-propagating population of the African malaria vector *Anopheles arabiensis* under semi-field conditions. *Malar J.* 2010; 9: 356.
- Omer SM and Cloudsley-Thomson JL.** Dry season biology of *Anopheles gambiae* Giles in the Sudan. *Nature .* 1968; 217: 879-880.
- Omer SM and Cloudsley-Thompson JL.** Survival of female *An. gambiae* Giles through a 9-month dry season in Sudan. *Bull World Health Organ.* 1970 ; 42: 319-330.

- Pages F, OrlandiPradines E and Corbel V.** Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Med Mal infect.* 2007 ; 37 153 – 161.
- Parvy JP, Napal L, Rubin T, Poidevin M, Perrin L, Wicker-Thomas C and Montagne J.** *Drosophila melanogaster* acetyl-coA carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *Plos Genet.* 2012; 8: e1002925.
- Podrabsky J and Hand S.** The bioenergetics of embryonic diapauses in an annual killifish *Austrofunduluslimnaeus*. *J Exp Biol.* 1999; 202: 2567-2580
- Pondeville E, Maria A, Jacques JC, Bourgooin C and Dauphin-Villemant C.** *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *P Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 19631-19636.
- Powell JR.** Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. Oxford University Press, New York.1997.
- Quinlan MC and Hadley NF.** Gas exchange, ventilatory patterns, and water loss in two lubber grasshoppers: quantifying cuticular and respiratory transpiration. *Physiol Zool.* 1993; 66: 628 - 642.
- Renault D, Hervant F and Vernon P.** Comparative study of the metabolic responses during food shortage and subsequent recovery at different temperatures in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Physiol Entomol.* 2002; 27: 291 - 301.
- Renault D, Bouchereau A, Delettre YR, Hervant F and Vernon PP.** Changes in free amino acids in *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during thermal and food stress. *Comparative biochemistry and physiology Part A. Mol & Int Physiol.* 2006; 143: 279 - 285.
- Reynolds JA, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA and Denlinger DL.** Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *J Insect Physiol.* 2012; 58: 966 – 973.
- Richards OW and Davies RG.** Imms' general textbook of entomology. 10th edn, vol 1. Structure, physiology and development. Chapman and Hall, London. 1977.
- Ritchie SA, Johnson PH, Freeman AJ, Odell RG, Graham N, Dejong PA, Standfield GW, Sale RW and O'Neill SL.** A secure semi-field system for the study of *Aedes aegypti*. *PLoS Neglect Trop D.* 2011; 5: e988.

- Rivero A, Agnew P, Bedhomme S, Sidobre C and Michalakis Y.** Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis* Parasitology. 2007; 134: 1355 -1362.
- Robert V and Carnevale P.** Malaria transmission in three sites surrounding the area of Bobo Dioulasso (Burkina Faso): the savanna, a rice field, and the city. Bull Soc Vector Ecol. 1987; 12: 541 - 543.
- Robert V, Trape JF and Rogier C.** Malaria parasites: elimination is not eradication Clin Microbiol Inf. 2011 ; 3657: 1-3.
- Rozendaal JA.** La lutte antivectorielle. Méthodes à usage individuelles et communautaires. OMS/Genève. 1999 ; ISBN 9242544949, 449p.
- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, and dellaTorre A.** Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. Malar J. 2008; 7: 163.
- Sawabe K and Moribayashi A.** Lipid utilization for ovarian development in an autogenous mosquito, *Culex pipiens molestus* (Diptera : Culicidae). J Med Entomo. 2000; 137: 726 - 731.
- Scaraffia PY and Wells MA.** Proline can be utilized as energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. J Insect Physiol. 2003; 49: 591-601.
- Schaffer A, van den Brink P, Heimbach F, Hoy S, de Jong F, Rombke J, Sousa JP and Ross-Nickoll M.** Semi-field methods are a useful tool for the environmental risk assessment of pesticides in soil. Environ Sci Pollut R. 2008; 15: 176-177.
- Schmalhausen II.** Factors of evolution: the theory of stabilizing selection. Blakiston, Philadelphia. 1949.
- Scott JA, Brogdon WG and Collins FH.** Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1993; 49: 520 - 529.
- Secor SM and Lignot JH.** Morphological Plasticity of Vertebrate Aestivation, pp. 183 - 208, C.A. Navas and J.E. Carvalho (eds.), Aestivation: Molecular and Physiological Aspects, Progress in Molecular and Subcellular Biology, Berlin Heidelberg. 2010.
- Servive MW.** Ecological notes on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex in the Kisumu area of Kenya. Bull Ent Res. 1970; 60: 105–108.

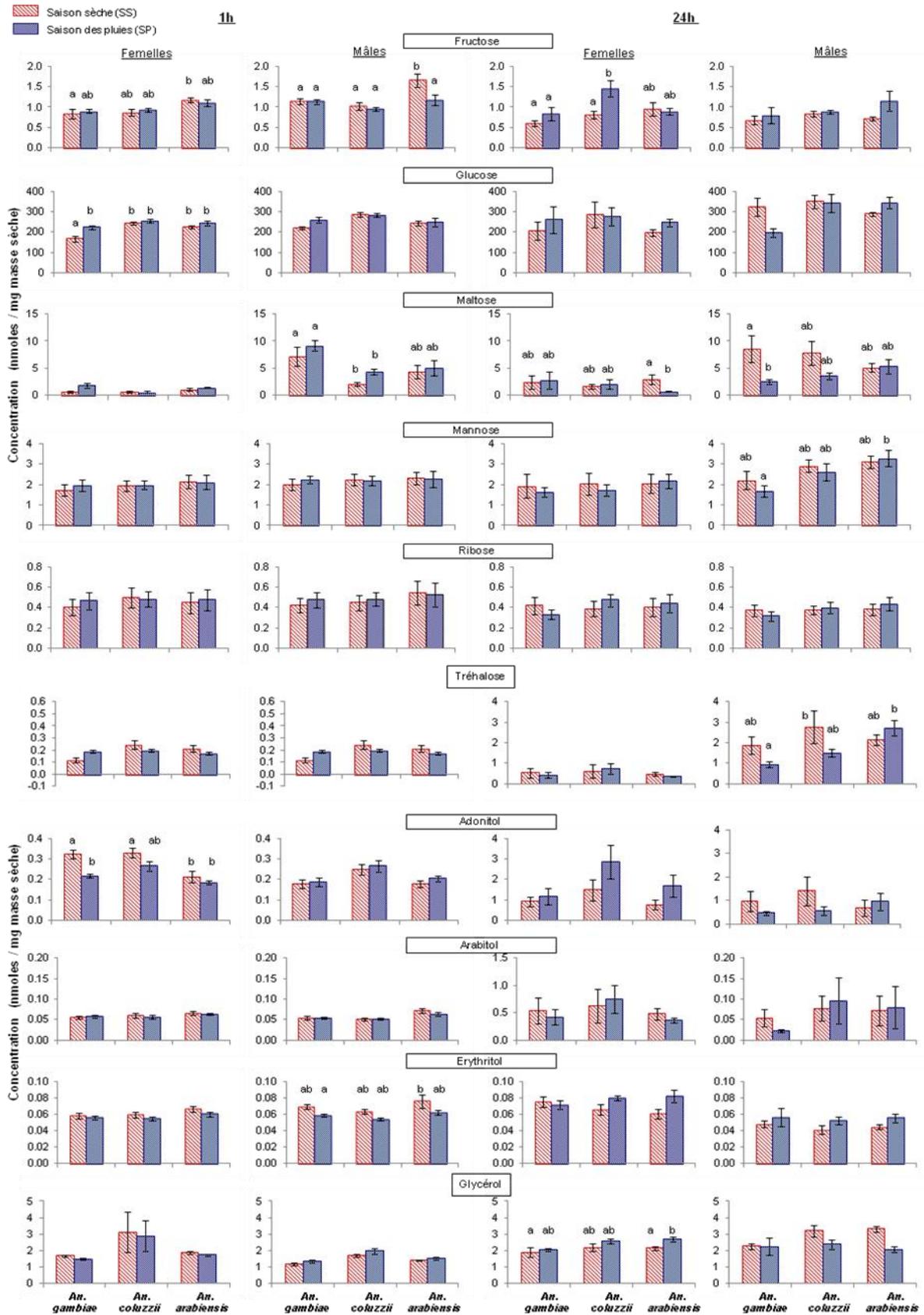
- Sibul I, Kuusik A, Luik A and Voolma K.** Influence of environmental conditions on the breathing rhythms of the pine weevil *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *Agronomy Research*. 2006; 4: 63 - 77.
- Sieglauff DH, Duncan KA and Brown MR.** Expression of genes encoding proteins involved in ecdysteroidogenesis in female mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005; 35: 471 - 490.
- Sim C and Denlinger DL.** Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *P Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 6777 – 6781.
- Simard F, Lehmann T, Lemasson JJ, Diatta M and Fontenille D.** Persistence of *Anopheles arabiensis* during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. *Insect Mol Biol*. 2000; 9: 467-479.
- Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, Fotsing JM, Fontenille D, Besansky NJ and Costantini C.** Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol*. 2009; 9: 17.
- Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, CoxSingh J, Thomas A and Conway DJ.** A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *The Lancet*. 2004; 363: 1017-1024.
- Slobodkin LB.** How to be a predator. *Am Zool*. 1968; 8: 43–51.
- Storey KB and Storey JM.** Winter survival of the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*-profiles of fuel reserves and cryoprotectants in a natural population. *J Insect Physiol*. 1986; 32: 549 - 556.
- Su T and Mulla MS.** Effects of temperature on development, mortality, mating and blood feeding behavior of *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol*. 2011; 26: 83 - 92.
- Sukontason KL, Methanitikorn R, Boonsriwong W, Piangjai S, Kurahashi H, Vogtsberger RC and Sukontason K.** Ultrastructure of spiracles of *Musca domestica* and *Hydrotaea chalcogaster* (Diptera: Muscidae). *Parasitol Res*. 2006; 100: 19 – 23.
- Swevers L and Iatrou K.** Ecdysteroids and ecdysteroid signaling pathways during insect oogenesis. In: Smagghe G, editor. *Ecdysone: Structures and Functions*. Netherlands: Springer. 2009; 127 - 164.

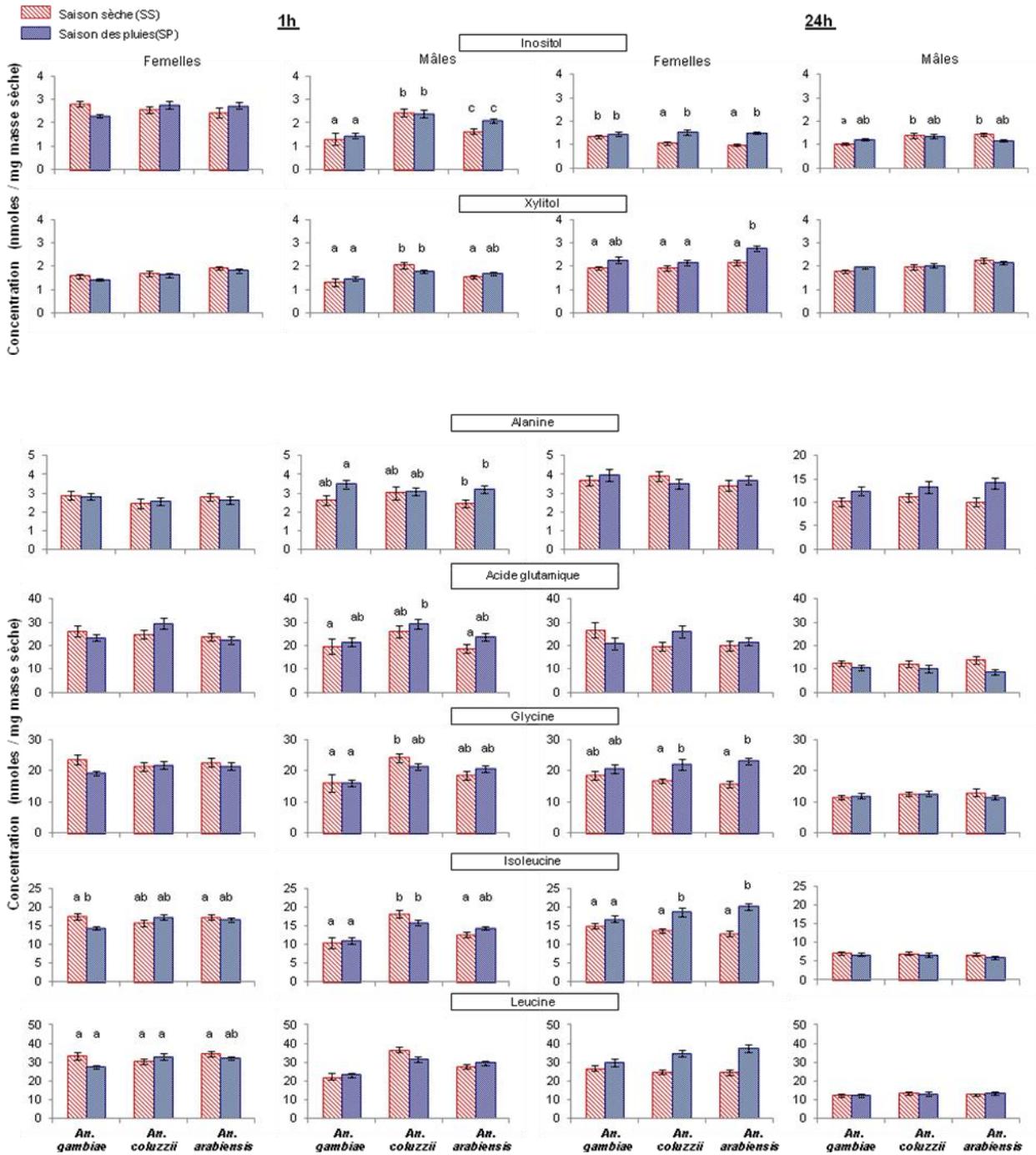
- Tang B, Wang S and Zhang F.** Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. *BMC Mol Biol.* 2010; 11: 65.
- Tauber MJ, Tauber CA and Masaki S.** *Seasonal Adaptations of Insects.* New York: Oxford Univ. Press. 1986; 411pp.
- Thioulouse J, Chessel D, Dole S and Olivier JM.** ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comput.* 1997; 7: 75 - 83.
- Tirados I, Costantini C, Gibson G and Torr SJ.** Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito *Anopheles arabiensis*: implications for vector control. *Med Vet Entomol.* 2006; 20: 425 - 437.
- Vinogradskaya ON and Buhorpa OH.** The Spiracles of *Anopheles* and their Variations depending on the Xerophily and Hygrophily of the individual Species. *Entomologicheskoe Obozrenie.* 1950; 31: 151-154
- Washino RK.** The physiological ecology of gonotrophic dissociation and related phenomena in mosquitoes. *J Med Entomol.* 1977; 13: 381-388.
- Watanabe M.** Anhydrobiosis in invertebrates. *Appl Entomol Zool.* 2006; 41: 15-31.
- Whisenton LR, Warren JT, Manning MK and Bollenbacher WE.** Ecdysteroid titers during pupal-adult development of *Aedes aegypti*: Basis for a sexual dimorphism in the rate of development. *J Insect Physiol.* 1989; 35: 67 - 73.
- White BJ, Cheng C, Simard F, Costantini C and Besansky NJ.** Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol.* 2010; 19: 925-939.
- White BJ, Lawniczak MKN, Cheng C, Coulibaly MB, Wilson MD, Sagnon NF, Costantini C, Simard F, Christophides GK and Besansky NJ.** Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *P Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 244 - 249.
- WHO.** World Malaria Report. World Health Organisation. 2013.
- Willis JH.** Cuticular Proteins in Insects and Crustaceans. *Am Zool.* 1999; 39: 600 - 609
- Yancey PH.** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol.* 2005; 208: 2819 - 2830.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD and Somero GN.** Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science.* 1982; 217: 1214 - 1222.

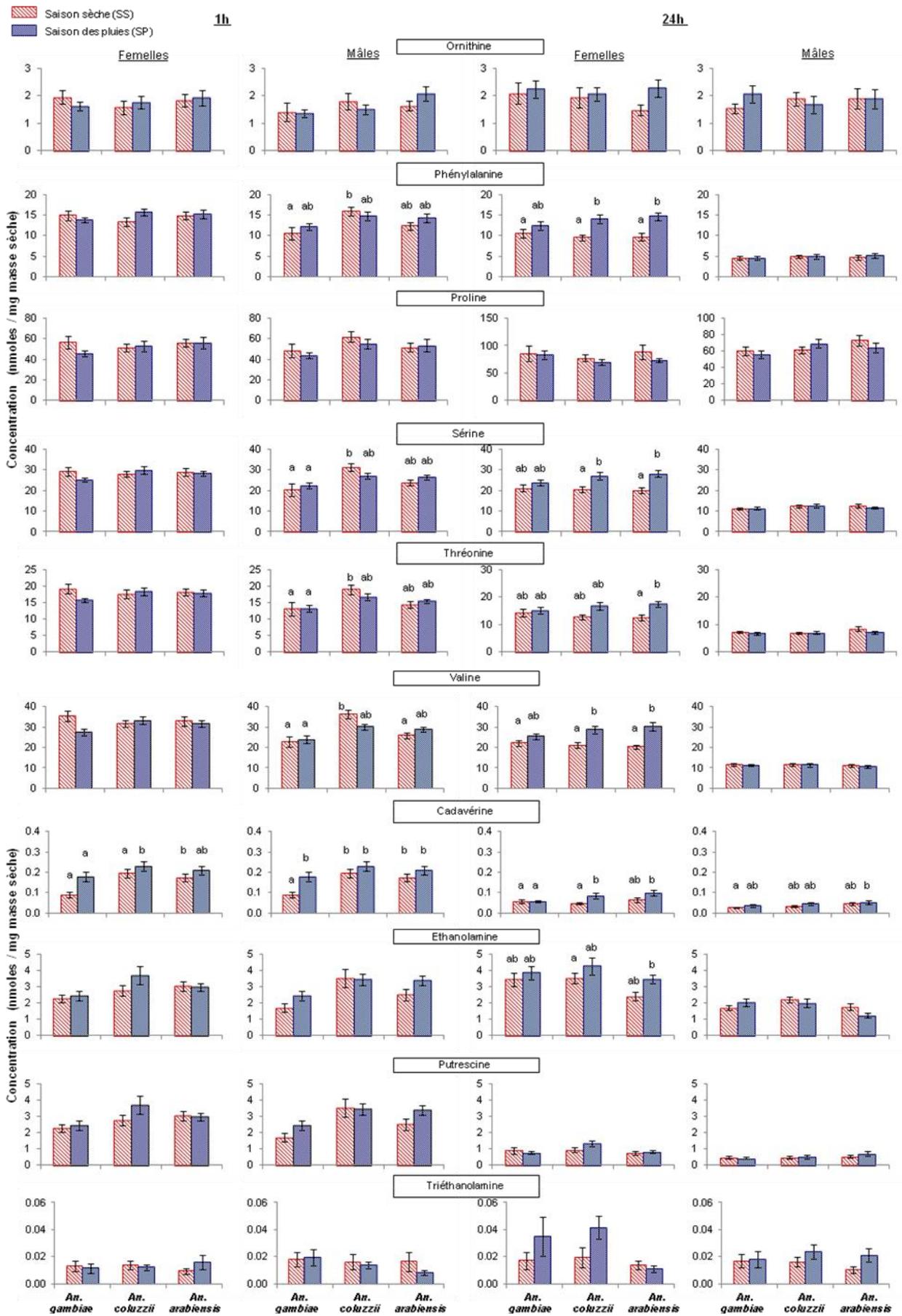
- Yaro AS, Traore AI, Huestis DL, Adamou A, Timbine S, Kassogue Y, Diallo M, Dao A, Traore SF, and Lehmann T.** Dry season reproductive depression of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *J Insect Physiol.* 2012; 58: 1050 - 1059.
- Yoder JA, Benoit JB, Denlinger DL and Rivers DB.** Stress-induced accumulation of glycerol in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*: evidence indicating anti-desiccant and cryoprotectant functions of this polyol and a role for the brain in coordinating the response. *J Insect Physiol.* 2006; 53: 202 - 214.
- Zhang Q and Denlinger DL.** Molecular structure of the prothoracicotropic hormone gene in the northern house mosquito, *Culex pipiens*, and its expression analysis in association with diapause and blood feeding. *Insect Mol Biol.* 2011 ; 20: 201–213.

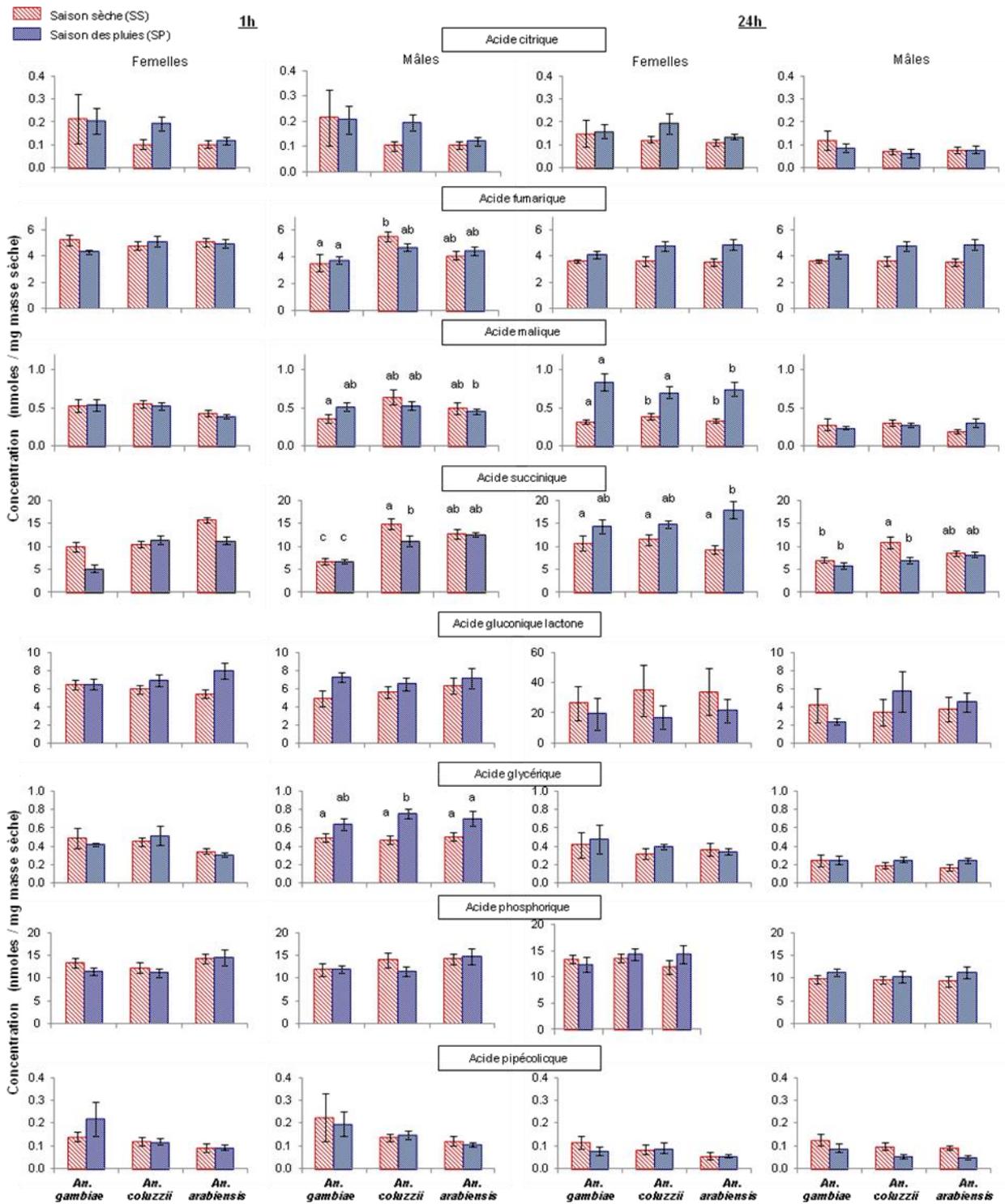
ANNEXES

Annexe 1: Concentrations des métabolites chez les mâles et femelles d'*An. gambiae*, d'*An. coluzzii* et d'*An. arabiensis* collectés 1h et 24h après émergence et exposés aux conditions de saison sèche (rouge, SS) et de saison des pluies (bleu, SP).









Annexe 2 : Protocole de PCR SINE200 pour détecter les différentes espèces du complexe *An. gambiae s.l.* d'après Santolamazza et al. 2008.

Amorces

Sine 200X 6.1 F: TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA

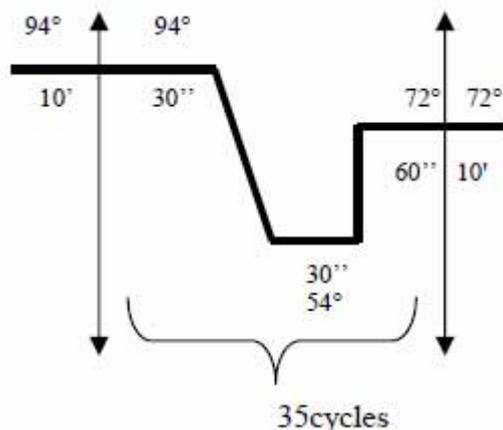
Sine 200X 6.1 R: CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC

Avec la Taq 5 PRIME pour un volume final de 20 µl par réaction

Réactifs	Conc. finale	Pour 1 rxs à 20 µl
Tampon de Taq 10X	1X	2 µl
25 Mm MgCl ₂	2,5mM	2 µl
5Mm dNTP	0,2mM	0,8 µl
Primer F (20 µM)	5 pmoles	0,3 µl
Primer R (20 µM)	5 pmoles	0,3 µl
Taq DNApolym (5U/µl)	0.35 U	0,07 µl
DdH ₂ O		12,53 µl
DNA template		2 µl

Amplification :

10' [30'', 30'', 60''] 35c @ 54°C



Taille attendue :

A. gambiae forme M : 479 bp (présence du gène Sine 200x 6.1)
A. gambiae forme S, *A. melas*, *A. quadriannulatus* : 249 bp (absence du gène Sine 200x 6.1)
A. arabiensis : 223 bp (absence du gène Sine 200x 6.1)