

BURKINA FASO

Unité-Progrès-Justice

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO (UPB)



INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES
DE LA SANTE (IN.S.SA)



Année universitaire 2012-2013

Mémoire N°

Influence du gène de résistance *kdr* sur la
compétence vectorielle d'*Anopheles gambiae s.s.*
vis-à-vis de *Plasmodium falciparum*

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le 27 Mars 2013 pour l'obtention du diplôme de **Master de Parasitologie médicale**

par

YAMEOGO Koudraogo Bienvenue

Jury

Président : **Professeur Tinga Robert GUIGUEMDE**, Professeur titulaire, INSSA/UPB

Membres : **Professeur Jean-Bosco OUEDRAOGO**, Directeur de recherche, IRSS/CNRST

Professeur K. Roch DABIRE, Directeur du mémoire, Maître de recherche IRSS/CNRST

BURKINA FASO

Unité-Progrès-Justice

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO (UPB)



INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES
DE LA SANTE (IN.S.SA)



Année universitaire 2012-2013

Mémoire N°....

Influence du gène de résistance *kdr* sur la
compétence vectorielle d'*Anopheles gambiae* s.s.
vis-à-vis de *Plasmodium falciparum*

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le 27 Mars 2013 pour l'obtention du diplôme de **Master de Parasitologie médicale**

par

YAMEOGO Koudraogo Bienvenue

Jury

Président : **Professeur Tinga Robert GUIGUEMDE**, Professeur titulaire, INSSA/UPB

Membres : **Professeur Jean-Bosco OUEDRAOGO**, Directeur de recherche, IRSS/CNRST

Professeur K. Roch DABIRE, Directeur du mémoire, Maître de recherche IRSS/CNRST

DEDICACES

Je dédie le présent mémoire à toute la famille YAMEOGO.

A mon père (in memoriam)

A ma mère qui ma permis d'être un homme et d'arriver là ou j'en suis.
Merci infiniment Maman. Que le Tout Puissant t'accorde tout ce que tu désires.

Je fais mention spéciale à toi, Stéphanie, pour ta présence indispensable à mes côtés. Tu m'as encouragé et supporté pendant cette période et je t'en serai toujours reconnaissant. Puisse le Tout-Puissant veiller sur nous et sur notre petite Wendyam Marie Graciella.

A chacune de mes sœurs, Armelle, Reine, Nadège et Pascaline, et à mon frère Maurice.

REMERCIEMENTS

Il est de bon ton de formuler mes remerciements aux personnes et institutions dont les services m'ont permis de réaliser cette étude. Ces remerciements s'adressent :

Au Professeur Tinga Robert Guiguemdé, Directeur de l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé (IN.S.SA), pour l'opportunité qu'il m'a offerte à travers ce master, d'approfondir mes connaissances.

Au Professeur Jean-Bosco Ouédraogo, Directeur régional de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS), pour son soutien et pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant de m'accueillir au sein de son Laboratoire malgré mon inexpérience.

Au Docteur K. Roch Dabiré, pour son accueil au sein de son équipe et pour tous ses précieux conseils.

Je m'en voudrais de manquer de reconnaissance au **Docteur Anna Cohuet**, l'une des premières à avoir cru en moi. Sa confiance et sa disponibilité sont sans doute celles qui m'ont le plus galvanisé. Je lui formule à cet égard, ma profonde gratitude.

Au Docteur Haoues Alout, dont le passage à l'IRSS m'a été d'un grand apport scientifique. Pour l'encadrement je te dis merci.

Une attention particulière à toute l'équipe d'infectivité, les Docteurs Serges Yerbanga, Thierry Lefèvre, et Amelie Vantaux ; à Arzouma Diasso, Baudoin Dabiré, Souleymane Tamboula, Fulgence Da, Fofana Aminata, Raymond Hien, Jean Bazié, et Moussa Namountougou, j'exprime toute ma gratitude.

A Tout le personnel de l'IRSS et de l'IRD, Merci à tous.

Je ne saurais faire économie de ma reconnaissance à l'égard de :

- tous les étudiants avec qui j'ai des relations plus qu'amicales, Yao Franck, Somé Fabrice, Sangaré Ibrahim, Da Dari, Da Ollo Daniel, Hien Francois, Mamai Wadaka ainsi que tous les étudiants. Merci pour tout.
- mes oncles et tantes, cousines et cousins pour tout le soutien dont j'ai bénéficié.
- tous mes amis et camarades de promotion pour leurs soutiens multiformes.

| | |
|--|-----------|
| 3. 1 Elevage des moustiques | 21 |
| 3.1.1 Origine du matériel biologique et site d'étude | 21 |
| 3.1.2 Conditions d'élevages pré-imaginale..... | 21 |
| 3.2 Compétence vectorielle vis-à-vis de <i>Plasmodium falciparum</i> | 22 |
| 3.2.1 Enquêtes parasitologique : recherche de porteurs de gamétocytes..... | 22 |
| 3.2.2 Système d'infection expérimentale | 23 |
| 3.2.3 Détection des oocystes..... | 25 |
| 3.2.4 Mesure de la longueur des ailes des femelles..... | 26 |
| 3.3 Identification moléculaire..... | 26 |
| 3.4. Considérations éthiques..... | 27 |
| 3.5. Analyse des données..... | 27 |
| | |
| IV. RESULTATS | 29 |
| | |
| 4.1 La proportion de moustiques infectés..... | 29 |
| | |
| 4.2 Intensité de l'infection | 33 |
| | |
| 5. DISCUSSION | 36 |
| | |
| 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 40 |
| | |
| 7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 41 |
| | |
| 8. ANNEXES | 49 |

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| DEDICACES | I |
| REMERCIEMENTS | II |
| TABLE DES MATIERES | III |
| RESUME | V |
| LISTE DES FIGURES | VIII |
| LISTE DES TABLEAUX..... | VIII |
| TABLE DES ANNEXES | VIII |
| 1. INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| 2. GENERALITE SUR LE PALUDISME | 4 |
| 2.1 Les agents pathogènes du paludisme | 4 |
| 2.1.1 Taxonomie | 4 |
| 2.1.2 Biologie | 4 |
| 2.2 Les vecteurs de l'agent pathogène..... | 10 |
| 2.2.1 Position taxonomique | 10 |
| 2.2.2 Le complexe <i>Anopheles gambiae</i> | 10 |
| 2.2.3 Les facteurs influant les traits d'histoires de vie des vecteurs..... | 13 |
| 2.3 Les stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme..... | 15 |
| 2.3.1 Lutte anti-larvaire | 15 |
| 2.3.2 Lutte anti-adulte..... | 15 |
| 2.3.3 Réduction du contact homme-vecteur | 15 |
| 2.3.4 Moustiques transgéniques..... | 16 |
| 2.4 Les insecticides | 16 |
| 2.4.1 La résistance aux insecticides..... | 18 |
| 2.4.1.1 Définition..... | 18 |
| 3. MATERIELS ET METHODES..... | 21 |

RESUME

La lutte antivectorielle est un des moyens les plus efficaces pour prévenir la transmission du paludisme en Afrique subsaharienne. La mutation « *kdr* » est apparue et évolue parmi les vecteurs, notamment sur *An. gambiae s.l.* La connaissance du coût génétique de l'infection à *P. falciparum* chez les souches PYR/DDT résistantes est instructive en termes de recherche fondamentale sur les interactions vecteur-parasite mais est aussi essentielle pour les stratégies de lutte antivectorielle. La présente étude avait pour but de déterminer l'effet de l'allèle de résistance « *kdr* » sur la compétence vectorielle d'*An gambiae s.s.* vis-à-vis de *P. falciparum*, dans différentes conditions environnementales. Nous avons infecté des souches sensibles et résistantes avec les parasites naturels en utilisant un système de gorgement sur membrane. Les résultats montrent un effet associé à l'allèle *kdr* sur la proportion de moustiques infectés. Cet effet est influencé par des interactions entre des facteurs biologiques (gamétoycytémie) et environnementaux (densité larvaire, compétition larvaire). Ces interactions démontrent la complexité des liens entre les différentes variables testées. Ces résultats confirment l'hypothèse qu'il y'a une association entre la réponse à l'infection de *An gambiae s.s* avec *P.falciparum* et la résistance aux insecticides. Cette étude est une contribution à la connaissance du rôle de l'allèle « *kdr* » sur la transmission de *P. falciparum*. En outre les résultats offrent des perspectives de recherches pour comprendre le coût génétique de cet allèle sur les traits d'histoire de vie des moustiques et indirectement sur la compétence vectorielle.

Mots clés : Paludisme *Anopheles gambiae*, résistances, *kdr*, compétence vectorielle.

ABSTRACT

Vector control is currently one of the most effective strategy for malaria prevention in sub-Saharan Africa. “*kdr*” mutation appeared and spread among vectors, *Anopheles gambiae* *s.s* essentially. Knowledge on the cost of *P. falciparum* infection in PYR / DDT resistant mosquito strains is not only instructive in terms of basic research on vector-parasite interactions, but also for malaria control programs based on the use of insecticides. The present study explored the effect of the resistance allele “*kdr*” on *An. gambiae s.s* competence to *P. falciparum* infection in different environmental conditions. We infected susceptible and resistant mosquito strains with natural isolates of *P. falciparum* using direct membrane feeding. Results show a effect of the “*kdr*” allele on the prevalence of infection with *P. falciparum*. This effect is influenced by interactions between biological (gametocyte) and environmental factors (larval density, larval competition). These interactions demonstrate the complexity of the relationships between the different tested variables. These results confirm the hypothesis that there is an association between the response to *Plasmodium* infection and mosquito resistance to insecticides. This study contributes to better understand the effect of “*kdr*” on mosquito life history traits, vector competence, and ultimately to increase the knowledge of its role on *P. falciparum* transmission.

Keywords: malaria, *Anopheles gambiae*, “*kdr*” mutation, vector competence

SIGLES ET ABREVIATIONS

| | |
|------------------|---|
| ABC | ATP Binding Cassette |
| ACh | Acétylcholine |
| AchE | Acétylcholinestérase |
| ADMB | AD Model Builder |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| An | Anopheles |
| Ca ⁺⁺ | Ion Calcium |
| CDC | Centers for Disease Control |
| CnaVdp | Canal Sodium Voltage Dépendant |
| CO ₂ | Dioxyde de carbone |
| CTAB | Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide |
| Cx | Culex |
| DDT | Dichloro diphényl trichloroéthane |
| GABA | Acide Gamma-Amino Butyrique |
| glmm | General linear mix model |
| GR | Globule Rouge |
| IRSS | Institut de Recherche en Science de Santé |
| kdr | Knock down resistance |
| LAV | Lutte anti-vectorielle |
| LLIN | Long lasting insecticide-treated |
| LRT | Likelihood ratio test |
| MII | Matériaux Imprégnés Insecticide |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| OPs | Organophosphorés |
| Pf | Plasmodium falciparum |
| PYR | Pyréthroïdes |
| s.l | Sensus lato |
| s.s. | sensu stricto |
| SE | Standard Error |
| VKPR | Vallée du Kou Pyrétroïdes Résistante |
| µl | Microlitre |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i> (CDC) | 6 |
| Figure 2: Les différentes étapes critiques du développement parasite | 9 |
| Figure 3 : Distribution d' <i>Anopheles gambiae s.s.</i> et <i>An. arabiensis</i> | 11 |
| Figure 4 : Cycle biologique de l'anophèle. (Sources : Philippe Boussès/IRD) | 13 |
| Figure 5: Représentation schématisée d'un neurone et d'une synapse cholinergique avec les cibles principales des insecticides. | 17 |
| Figure 6: Photographie illustrant deux gamétocytes sur un frottis..... | 23 |
| Figure 7: Dispositif de l'infection expérimentale | 24 |
| Figure 8 : Schémas du protocole expérimental | 25 |
| Figure 9: Dissection et estomac remplis d'oocystes. | 26 |
| Figure 10: La proportion de moustiques infectés en fonction de la gamétoctémie pour chaque souche. | 30 |
| Figure 11: La Proportion de moustiques infectés (+SE) de chaque souche en fonction de la densité larvaire et des infections | 31 |
| Figure 12 : la proportion de moustiques infectés (\pm SE) au niveau de chaque souche en fonction de l'infection. | 32 |
| Figure 13 : Nombre moyen d'oocyste (ES) en fonction de la gamétoctémie | 34 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Effets aléatoires et effets fixes sur la proportion de moustiques infectés | 29 |
| Tableau II: Effet sur le nombre moyen d'oocyste | 34 |

TABLE DES ANNEXES

Annexes 1 : Protocole d'extraction au *CTAB*

Annexe 2 : Protocole PCR de la mutation *kd*

1. Introduction générale

Le paludisme est une parasitose causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre de moustique femelle du genre *Anopheles*. Il demeure de nos jours l'un des grands fléaux de l'humanité. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2012), deux milliards de personnes vivent dans des zones à forte endémie et particulièrement en Afrique subsaharienne. Au Burkina Faso, le nombre total de cas de paludisme rapportés pour l'année 2010 était supérieur à 5 millions avec 366 000 de paludisme grave (PNLP-BF, 2010).

Le parasite responsable de cette maladie est un protozoaire du genre *Plasmodium*. On en distingue 5 espèces : *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. knowlesi*, décrite chez l'Homme en 2004 (Figtree et al., 2010). *P. falciparum* est responsable de la forme la plus sévère de la maladie et de la plupart des décès dus au paludisme (OMS, 2010).

En Afrique subsaharienne, deux complexes d'espèces assurent la presque totalité de la transmission : *Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 et *Anopheles funestus* s.l. Giles, 1900 (Fontenille et al., 2003).

La lutte contre cette maladie vectorielle repose essentiellement sur : la prise en charge des cas, la chimioprophylaxie, et la lutte contre les vecteurs (essentiellement par l'utilisation d'insecticide). Cependant, une chimioprophylaxie de masse dans le cas du paludisme n'est pas envisageable pour des raisons techniques, économiques et de sélection des chimiorésistances spécialement en Afrique (Djogbenou, 2008). La lutte anti-vectorielle (LAV) par l'utilisation des Matériaux Imprégnés d'Insecticide (MII) à base de pyréthrinoïdes (PYR) apparaît aujourd'hui comme étant la méthode de prévention de masse applicable la plus efficace contre le paludisme.

Si cet outil permet de protéger les populations vulnérables (enfants de moins de 5 ans et femmes enceintes), son utilisation à grande échelle reste aujourd'hui confrontée au problème de la résistance des vecteurs aux insecticides (Chandre et al., 1999).

La résistance aux pyréthrinoïdes se développe parmi les vecteurs majeurs du paludisme, notamment par l'intermédiaire de la mutation *kdr*. Cette mutation ponctuelle résultant du remplacement de la leucine par la phénylalanine (mutation *kdr* Leu-Phe) au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant pour le canal sodium voltage dépendant (CnaVdp)

confère la résistance aux pyréthriinoïdes (PYR) et au Dichloro diphényl thrichloroéthane (DDT) en Afrique de l'Ouest. Les études de l'impact de cette mutation sur l'efficacité des MII sont contradictoires. Les moustiques résistants sont capables de rester plus longtemps au contact de la moustiquaire traitée et absorbent une plus grande quantité d'insecticide ce qui expliquerait des taux de mortalité sensiblement identiques entre moustiques sensibles et moustiques résistants (Chandre *et al.*, 2000; Corbel *et al.*, 2004b). Plus récemment, une évaluation menée au Bénin a montré que l'efficacité de moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine était considérablement réduite en zone de résistance (N'Guessan *et al.*; 2007). Les résultats ont en effet montré que la mortalité induite par les MII passait de 98% en zone sensible à 30% en zone résistante.

La transmission du plasmodium par le moustique est l'aboutissement d'interactions complexes entre le parasite et l'hôte moustique qui constitue l'environnement du parasite. Lors de son développement chez le moustique, le plasmodium se heurte à un certain nombre de barrières physiologiques : il subit l'agression des enzymes dans l'estomac et des mécanismes de défense du moustique lors de son passage dans l'hémolymphe. Tous ces facteurs inhibiteurs qui conditionnent la sensibilité du moustique au parasite sont sous le contrôle de mécanismes génétiques et environnementaux qui sont encore peu connus.

Les allèles résistants (dus à des mutations génétiques) peuvent modifier la physiologie des moustiques vecteurs de diverses façons et donc modifier l'environnement des agents pathogènes qu'ils transmettent (Rivero *et al.*, 2010). En effet les mutations génétiques sont très souvent associées à des effets délétères qui s'expriment sur différents traits d'histoire de vie. Ces effets négatifs ont pour conséquence de réduire la valeur adaptative (fitness) des individus porteurs de la mutation : on parle alors de coût génétique. Dans le cas de la mutation de l'acétylcholinestérase *ace-1*, les moustiques résistants ont une durée de vie plus réduite, un développement larvaire plus lent que les moustiques dépourvus de mutations ; ils sont plus fréquemment capturés par des prédateurs, et sont plus sensibles aux infections par des bactéries endocellulaires de type *Wolbachia* dans un environnement sans insecticides (Weill *et al.*, 2003). A notre connaissance, peu d'études ont rapporté un coût associé à la mutation *kdr* jusqu'ici.

Aussi, plusieurs facteurs environnementaux jouent un rôle dans la modulation des traits d'histoire de vie des vecteurs du paludisme, tels que la température (Teng and Apperson, 2000, Paaijmans *et al.*, 2009), la densité larvaire (Lowrie, 1973) la qualité et la quantité de nourriture (Barrera, 1996). Ces facteurs influencent les performances, comme la taille et la

fécondité des femelles adultes (qui participent à la transmission des parasites) ; ainsi, une variation de ces facteurs peut probablement avoir un impact indirect sur la transmission des pathogènes. La présence de la mutation *kdr* au niveau des vecteurs du paludisme en Afrique de l'Ouest notamment au Burkina Faso augmente chaque année. Cependant, les études du coût génétique de la mutation sur la bio-écologie des vecteurs sont quasi inexistantes. Or, on sait que toutes les stratégies de contrôle des vecteurs basées sur l'utilisation d'insecticides nécessitent une connaissance approfondie de la biologie et de l'écologie des vecteurs responsables de la transmission, des mécanismes de résistance vis-à-vis des insecticides utilisés et de leur niveau de résistance dans les populations naturelles.

Nous avons cherché à voir s'il existait un coût associé à l'allèle *kdr* sur l'histoire évolutive commune entre le vecteur et le parasite en matière de proportion de moustiques infectés et d'intensité de l'infection.

L'objectif général de notre travail est d'étudier l'effet du gène de résistance « *kdr* » sur la compétence vectorielle d'*An.gambiae s.s* vis-à-vis de *Plasmodium falciparum*.

Spécifiquement il s'agit de :

- Comparer la compétence vectorielle (proportion de moustiques infectés et intensité de l'infection) de la souche sensible de référence Kisumu avec la souche KdrKis résistante aux PYT/DDT.
- déterminer l'effet des interactions compétitives entre souches sensibles et résistantes sur la proportion de moustiques infectés et l'intensité de l'infection.

2. Généralité sur le paludisme

2.1 Les agents pathogènes du paludisme

2.1.1 Taxonomie

Les infections palustres humaines sont dues à un agent parasite, le *Plasmodium*, inoculé lors d'une piqûre de moustique infecté du genre *Anopheles*.

Les *Plasmodium* sont des protozoaires appartenant au phylum des *Apicomplexa*, à l'ordre des *Haemosporidae* et à la famille des *Plasmodiidae*. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces animales, mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, et *Plasmodium knowlesi*. Les cinq espèces diffèrent par des critères génétiques, biologiques, cliniques, par leur répartition géographique. *P. falciparum* est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde, mais aussi qui développe le plus de résistances aux antipaludiques et qui est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles. (Université. Médicale .Virtuelle. Francophone, 2010-2011).

2.1.2 Biologie

Le cycle des *Plasmodium* est dixène puisque deux hôtes successifs sont nécessaires à son accomplissement. On distingue donc 2 phases dans le cycle de vie des *Plasmodium* :

- une phase chez l'hôte intermédiaire, l'Homme (phase asexuée) ;
- une phase chez l'hôte définitif le moustique l'anophèle (phase sexuée).

2.1.2.1 Le développement parasite chez l'homme

La multiplication chez l'Homme comporte successivement une phase hépatique (développement exo-ou pré-érythrocytaire) puis une phase sanguine (cycle érythrocytaire).

● La phase hépatique

Au cours de son repas humain, le moustique infesté injecte avec sa salive des centaines de parasite sous forme de sporozoïtes fusiformes. Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle restent pendant une trentaine de minutes dans la peau, la lymphe et le sang. Beaucoup sont détruits par les macrophages, mais certains parviennent à gagner les hépatocytes environ 40 minutes après. Ils se transforment alors en schizontes pré-érythrocytaires multi nucléés (ou corps bleus) qui, après quelques jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes

dans le sang (10 000 à 30 000 mérozoïtes en fonction des espèces). La schizogonie pré-érythrocytaire dure généralement de 8 à 15 jours respectivement chez *P. falciparum* et *P. malariae*.

Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, une schizogonie hépatique retardée peut entraîner la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois après la pique du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces 2 espèces.

● La phase sanguine

Après éclatement des schizontes hépatiques, les mérozoïtes libérés arrivent dans le sang, envahissent des globules rouges (GR) et marquent ainsi le début du cycle de réplication érythrocytaire. C'est un processus cyclique, allant de l'invasion d'un GR à son éclatement en passant par différentes stades: anneau, trophozoïte, schizonte et rosace (8-32 mérozoïtes). L'éclatement du GR permet ainsi la libération d'une trentaine de nouveaux mérozoïtes qui vont envahir des hématies saines et entreprendre un nouveau cycle érythrocytaire ou évoluer en gamétocytes. Cette phase dure 48h pour *P. falciparum*. La formation des gamétocytes n'intervient qu'après plusieurs cycles érythrocytaires. La phase de reproduction des parasites et leur dissémination exigent le passage par l'hôte anophélien.

2.1.2.2 Le développement parasitaire chez l'anophèle femelle (sporogonie)

Lors d'une piqûre sur un paludéen, le moustique peut absorber des schizontes, des rosaces et des gamétocytes. Les éléments asexués sont digérés et seuls les gamétocytes ingérés poursuivent le cycle. Les deux facteurs principaux qui induisent la gamétogénèse sont la chute de température entre le sang chez l'homme et le contenu stomacal du moustique, et la présence de l'acide xanthurénique produit par l'estomac du moustique. Les transformations sont profondément différentes selon le sexe. Le micro-gamétocyte (gamétocyte mâle) subit plusieurs divisions pour donner 8 noyaux fils, puis par le phénomène d'exflagellation libère 8 gamètes mâles haploïdes. Les gamétocytes femelles se bornent au processus d'activation sans multiplication cellulaire, si bien qu'un gamétocyte femelle produit un seul gamète femelle, appelé aussi macro gamète. Chaque gamète mâle est pourvu d'un flagelle grâce auquel il va à la rencontre d'un gamète femelle pour le féconder. Les œufs qui en résultent vont devenir mobiles (ookinètes) et pénétrer dans les parois du tube digestif pour se loger au niveau de la lame basale des cellules épithéliales. L'ookinète perd alors sa mobilité et se transforme en jeune oocyste 24 à 36 heures après le repas de sang. Il va subir des méioses pour former les

cellules haploïdes. Il devient mature (20 à 60 µm) au bout de 9 à 15 jours, selon la température environnante (Pimenta *et al.*, 1994).

Le noyau de l'oocyste se divise plusieurs fois pour donner plus de 10 000 sporozoïtes. Ils sont libérés par rupture de l'oocyste dans la cavité générale du moustique. Ils gagnent les glandes salivaires préférentiellement au niveau du lobe médian et de l'extrémité distale des lobes latéraux. Ils passent à travers la lame basale de l'épithélium salivaire, puis traversent le cytoplasme des cellules (Robert and Boudin, 2002). Enfin, ils pénètrent dans les acini et pourront être injectés lors d'une nouvelle piqûre.

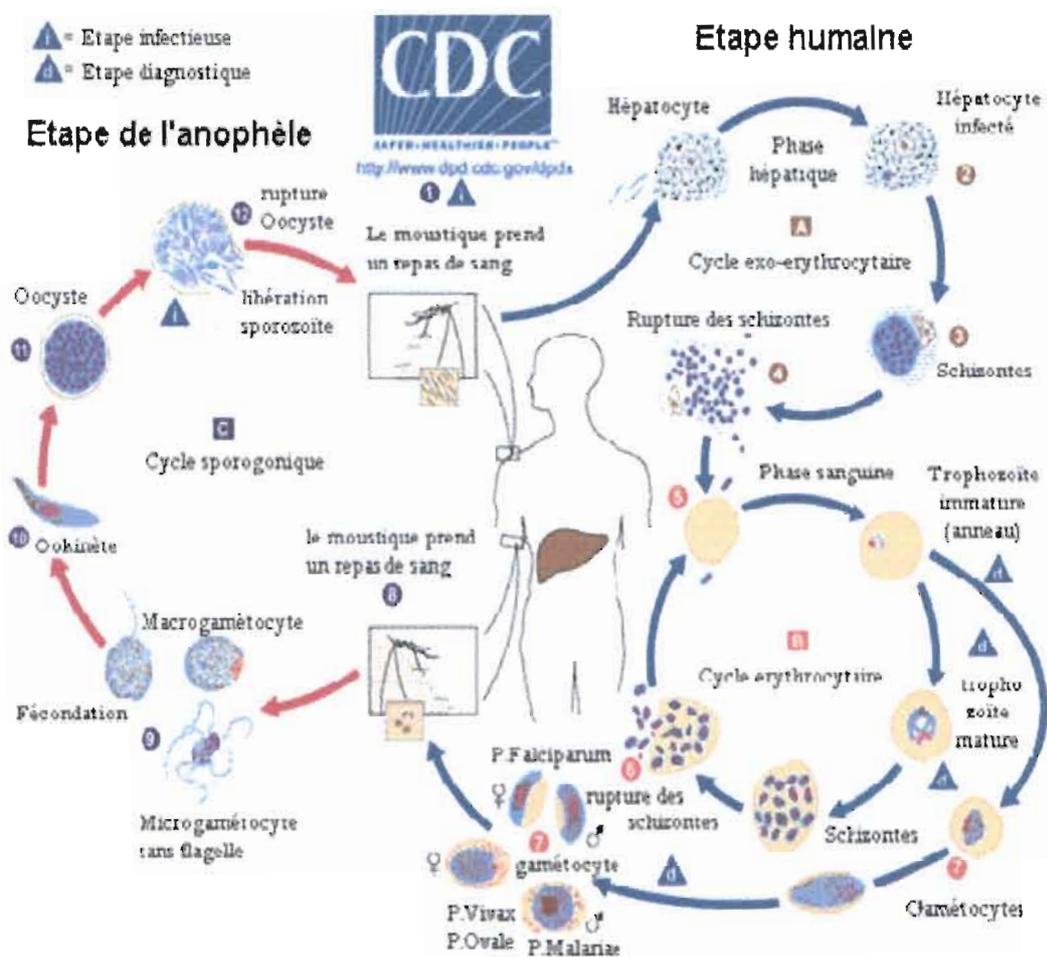


Figure 1 : Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* (CDC)

Source : <http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Malaria.htm> consulté le 13/08/2012

2.1.3.1 La gamétocytogénèse

La gamétocytogénèse est un processus qui conduit une partie des parasites à un arrêt du cycle cellulaire et à initier une phase de différenciation cellulaire en formes sexuées. Les gamétocytes de *P. falciparum* proviennent de stades sanguins asexués (Sinden, 1998).

En culture *in vitro*, l'induction de la gamétocytogénèse dépend de facteurs environnementaux tels que la parasitémie, le stress oxydatif et l'action de certains antipaludiques. Cinq stades sont décrits dans la maturation des gamétocytes de *P. falciparum*. Les gamétocytes immatures (stade I à IV) sont séquestrés dans les tissus profonds, en particulier dans la moelle osseuse (Smalley and Brown. J, 1981). Cette séquestration favoriserait la maturation des gamétocytes durant 9 à 12 jours et éviterait leur élimination lors de leur passage dans la rate.

Le nombre de gamétocytes est ordinairement inférieur à celui des stades asexués, de l'ordre de 1 à 3 gamétocytes pour 100 trophozoïtes (Eichner *et al.*, 2001). Pour *P. falciparum*, les premiers stades de différenciation en gamétocytes sont morphologiquement identiques à ceux des trophozoïtes jeunes. Au stade V, rencontré dans la circulation périphérique, l'hématie est déformée par le gamétocyte mature allongé, le gamétocyte mâle est reconnaissable par son plus grand noyau, la rareté des ribosomes et des mitochondries.

2.1.3.2 Facteurs influençant le cycle sporogonique

➤ Facteurs liés aux parasites

- La densité gamétocytaire

Estimé lors de la goutte épaisse, elle est le premier facteur qui influence l'infestivité des moustiques. Des études ont montré une corrélation positive entre la densité gamétocytaire et l'infestivité des moustiques.

- Le sex ratio

La présence des gamétocytes des deux sexes est indispensable pour le succès de l'infestation du vecteur par les plasmodies. Cependant le sex ratio est en faveur des gamétocytes femelles. Il y a généralement un gamète mâle pour trois à quatre gamètes femelles (Robert *et al.*, 1996b) rendant faible la probabilité de rencontre des deux sexes chez le vecteur en cas de faible gametocytémie.

- La maturité et la qualité des gamétocytes

La maturation des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez l'homme dure entre 7 et 12 jours et passe par cinq phases de développement. Seuls les gamétocytes du stade V présents

les zones de forêt mais remonte dans les savanes humides jusqu'à la limite de la ceinture sahélienne pré-désertique. *An. arabiensis* est présent au Sahel et sur les plateaux d'Afrique méridionale. Il s'enfonce assez profondément dans les savanes humides, recoupant la zone de répartition *gambiae s.s.* (Mouchet *et al.*, 2004).

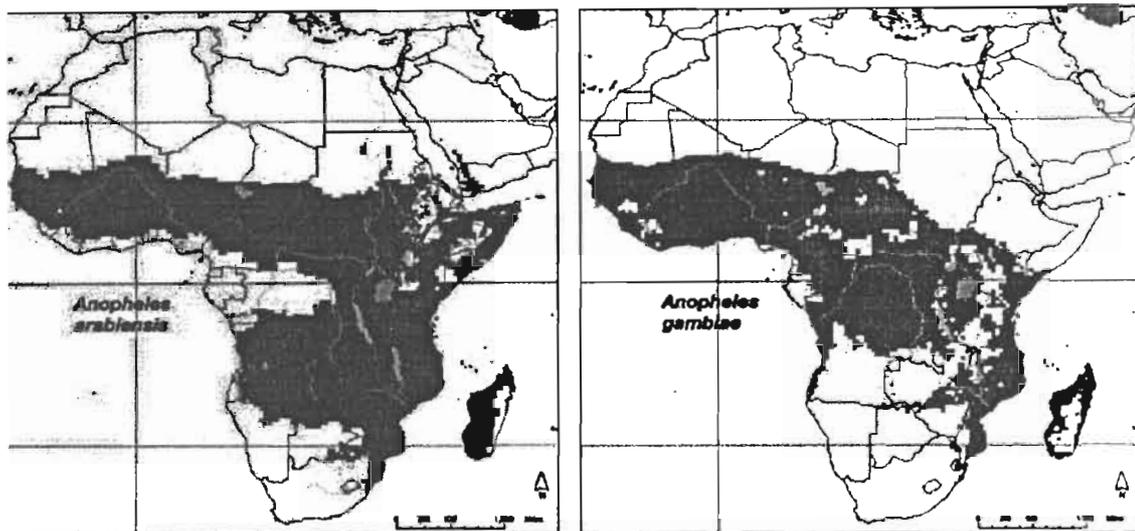


Figure 3 : Distribution d'*Anopheles gambiae s.s.* et *An. arabiensis*

Chez *An. gambiae s.s.* cinq formes chromosomiques ont été identifiées en Afrique de l'Ouest: les formes Savanna, Mopti, Bamako, Bissau et Forest (Coluzzi *et al.*, 1985). Le génotypage de l'ADN ribosomal du chromosome X réalisé sur les formes chromosomiques Mopti, Savanna présents au Mali et au Burkina Faso, a mis en évidence deux sites polymorphes dans les fragments intergéniques de l'ADN ribosomal (della Torre *et al.*, 2001, della Torre *et al.*, 2002). Ces deux sites, permettent de différencier au moins au Mali et au Burkina Faso, les écotypes Mopti d'une part et Savanna d'autre part. Ces deux formes moléculaires M et S présentent des préférences écologiques différentes. Les formes S se développent préférentiellement dans les petites collection d'eau et les *gambiae M* se retrouvent majoritairement dans les gîtes anthropiques semi-permanents ou permanents (Favia *et al.*, 2001, della Torre *et al.*, 2001, Costantini *et al.*, 2009, Simard *et al.*, 2009). Récemment en conformité avec le comité international de nomenclature zoologique, la forme moléculaire M a été nommée *Anopheles coluzzii* en l'honneur du regretté Professeur Mario Coluzzi qui a consacré une grande partie de sa vie à l'étude de ce complexe d'espèces en Afrique de l'Ouest, et la forme S *Anopheles gambiae* Giles (Coetzee *et al.*, 2013).

Les flux de gène semblent limités entre les formes moléculaires M et S qui présentent des sensibilités différentes aux insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes (Diabaté, 2003).

dans le sang périphérique sont infestants. Ce pouvoir infestant est généralement influencé par l'âge (Hogh *et al.*, 1998).

➤ **Facteurs liés à l'Homme**

- Le type d'hémoglobine

La nature des hémoglobines du porteur de gamètes influence le développement des gamétocytes chez le vecteur. L'étude de Robert *et al* (1996b) a montré que le pourcentage de moustiques infestés par les gamétocytes était deux fois supérieur avec le sang à hémoglobine AS par rapport au sang à hémoglobine AA. Ces résultats ont été confirmés plus récemment (Gouagna *et al.*, 2010).

- L'immunité contre les formes sexuées

Elle englobe la réponse immunitaire contre les gamétocytes chez l'homme et les stades sexués chez l'anophèle. En effet en milieu endémique, l'homme est capable de développer des anticorps naturels contre les antigènes des gamètes. Ces antigènes sont encore appelés antigènes de pré-fertilisation et post-fertilisation car intervenant respectivement avant et après la phase zygote. Les anticorps anti-gène de pré-fertilisation tels que Pfs230, Pfs45 Pfs48 peuvent empêcher la formation des zygotes dans l'intestin du moustique. En revanche les anticorps de postfertilisation interviennent après la formation des zygotes. A titre d'exemple les anticorps Pfs25 empêchent la pénétration des ookinetes à travers l'épithélium intestinal. De plus les anticorps monoclonaux Pf11.1 anti protéine de surface des jeunes gamétocytes entraîneraient une lyse du gamète via le complément (Fenz *et al.*, 1993).

2.1.3.3 Les mécanismes génétiques contrôlant le cycle sporogonique

Après ingestion par le moustique, les gamétocytes se libèrent de leur enveloppe érythrocytaire et se retrouvent directement au contact de l'environnement cellulaire, immunitaire et enzymatique du bol alimentaire. De très nombreux facteurs du moustique sont susceptibles d'influer sur l'aptitude à transmettre le parasite; et ces facteurs permettent de définir la notion de "compétence vectorielle" du moustique à transmettre le *Plasmodium*. Ces facteurs génétiquement contrôlés peuvent moduler la susceptibilité ou l'incompatibilité vecteur-parasite. Ces facteurs peuvent être des caractéristiques des barrières physiques que le parasite doit outrepasser : la matrice péritrophique, l'épithélium stomacal, la coque de l'oocyste et l'épithélium des glandes salivaires, ou d'autres facteurs agissant sur la survie des parasites comme les enzymes dans l'estomac et les mécanismes de défense du moustique lors de son passage dans l'hémolymphe. L'activité enzymatique digestive atteint son maximum à

des moments variables juste après l'ingestion du repas sanguin et est fortement liée au développement et à la migration de l'ookinète. Ce temps dépend aussi de l'espèce de moustique. En dehors de leur rôle sur le bol alimentaire, ces enzymes digestifs peuvent détruire l'ookinète. Celui-ci semble pourtant plus résistant aux enzymes que les stades précédents. Il doit probablement mettre en jeu des mécanismes de protection qui sont encore inconnus. Ainsi le rendement entre gamétoyte et oocyste va généralement en diminuant progressivement, mais est compensé par la forte multiplication parasitaire entre les stades oocyste et sporozoïte. La figure 2 résume les différentes étapes critiques du cycle sporogonique (Robert and Boudin, 2002).

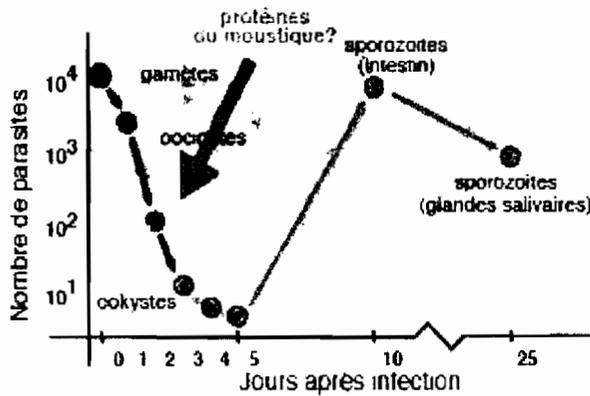


Figure 1: Les différentes étapes critiques du développement parasite

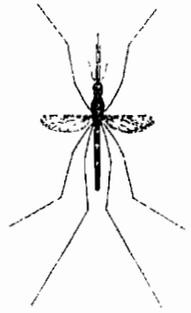
2.2 Les vecteurs de l'agent pathogène

2.2.1 Position taxonomique

Les vecteurs des plasmodies de mammifères, y compris les plasmodies humaines appartiennent tous au genre *Anopheles* qui occupe une position taxonomique bien précise.

Position taxonomique des anopheles

(Knight *et al.*, 2004)

| | | |
|-----------------|---|---|
| Embranchement : | <i>Arthropoda</i> (= pattes articulées) |  <p>Le moustique <i>Anopheles gambiae</i> (source : J.G. Smith <i>in</i> Gillet, 1972)</p> |
| Classe : | <i>Insecta</i> (= corps segmenté en trois parties) | |
| Sous-classe : | <i>Pterygota</i> (= avec des ailes) | |
| Ordre : | <i>Diptera</i> (= avec 2 ailes) | |
| Sous-ordre : | <i>Culicidae</i> (=moustique) | |
| Famille : | <i>Nematocera</i> (= avec antennes rondes et longues) | |
| Sous-famille : | <i>Anophelinae</i> (= anophele) | |
| Genres : | <i>Anopheles, Bironella, Chagasia</i> | |

La famille des *Culicidae*, synonyme du terme courant de « moustiques », comprend 37 genres et environ 3300 espèces dont les femelles sont toutes hématophages et possèdent des pièces buccales de type « piqueur-suceur » (Carnevale *et al.*, 2009). On distingue 2 sous-familles parmi les *Culicidae*: les *Culicinae* et les *Anophelinae*. C'est dans cette dernière sous-famille que l'on retrouve le genre *Anopheles* (insectes holométaboles) qui contient au dernier recensement 484 espèces (Harbach, 2004) parmi lesquelles 68 sont considérées comme vecteurs de *Plasmodium*.

2.2.2 Le complexe *Anopheles gambiae*

Le complexe *Anopheles gambiae* compte actuellement 7 espèces morphologiquement identiques, potentiellement vectrices de plasmodies (White, 1974, Hunt *et al.*, 1998). Ce sont *An. gambiae s.s.*, *Anopheles arabiensis*; *An. melas*, *Anopheles merus*, *Anopheles bwambae* (White, 1985), *Anopheles quadriannulatus* A (Theobald, 1911) et *Anopheles quadriannulatus* B, (Carnevale *et al.*, 2009). *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* se révèlent les meilleurs vecteurs de *Plasmodium* sur le continent africain en raison de leur large distribution géographique et de leur forte anthropophilie (Carnevale *et al.*, 2009). *An. gambiae s.s.* occupe

- **Bio-écologie des anophèles**

Le cycle de développement est marqué par une phase pré-imaginale aquatique (œufs, larves, nymphes) et une phase adulte (imago).

– la phase aquatique pour les stades preimaginaux ou immatures : Les femelles déposent leurs œufs en vol à la surface de l'eau ou sur le substrat humide des gîtes larvaires. Les stades larvaires concernent une période de croissance avec une augmentation notable de taille qui peut être de l'ordre de 10 fois, du stade I au stade IV. La durée de développement larvaire est très variable, *An. gambiae* s.l. accomplit son développement larvaire en moins de 10 jours en milieu tropical dans les collections d'eau stagnante, temporaires, peu profondes et ensoleillées, faiblement chargées en matières organiques et où la température de l'eau peut dépasser 30°C (Clements, 1992a).

– la phase aérienne pour le stade adulte ou imaginal, avec des mâles et des femelles. C'est la période de reproduction et de dispersion. Le mâle se nourrit exclusivement de jus sucrés, tandis que la femelle s'alimente non seulement de jus sucrés (qui procurent l'énergie nécessaire pour le vol) mais aussi de sang humain et (ou) animal qui permet le développement des œufs. Chez les anophèles, seule la femelle est hématophage, et c'est au cours d'un repas de sang qu'elle peut ingérer et (ou) transmettre le parasite. La femelle n'est fécondée qu'une fois dans sa vie, mais les mâles peuvent féconder plusieurs femelles. Le cycle de maturation des ovocytes qui débute avec le repas de sang et se termine avec la ponte est dénommé *cycle gonotrophique*.

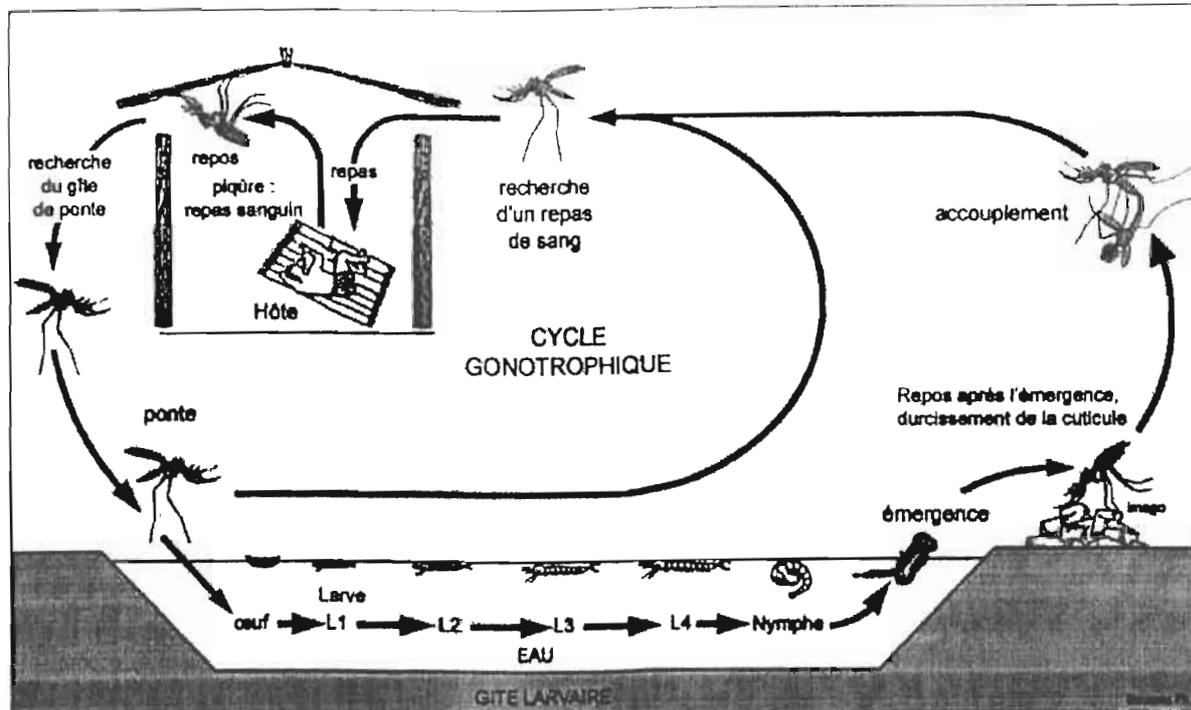


Figure 4 : Cycle biologique de l'anophèle. (Sources : Philippe Boussès/IRD)

2.2.3 Les facteurs influant les traits d'histoires de vie des vecteurs

Le développement des stades pré-imaginaux est influencé par des facteurs physiques du milieu (gîte) tels que la température, l'éclairement, le pH, ainsi que l'apport nutritif. Ces facteurs introduisent des changements quantitatifs et qualitatifs sur les populations larvaires en particulier et aussi sur la population imaginale.

❖ Au stade larvaire

- La température

La relation entre la température, le taux de croissance des moustiques et le développement larvaire a fait l'objet d'un certain nombre d'étude et peut se résumer à trois états.

- i) Pour toutes les espèces, la croissance et le développement se produisent entre une plage de température dite de seuil inférieur de développement et une température supérieure létale ;
- ii) dans cette fenêtre de températures, le taux de croissance et de développement est généralement positivement corrélé avec la température ;
- iii) les plages de température varient avec les espèces.

- **La nutrition**

Lorsque la quantité de nourriture disponible est inférieure à un certain seuil, le taux de développement larvaire diminue. Selon la densité des larves, le facteur critique peut être la quantité de nourriture par larve ou par unité de volume.

- **La densité larvaire**

Des observations au laboratoire et sur le terrain ont montré que la compétition intra-spécifique, causée par la densité des larves est élevée. Les résultats sont : un temps de développement plus long ; une réduction du succès de la nymphose et du poids des nymphes (Clements, 1992a).

❖ **Au stade adulte**

Les comportements des femelles de moustiques, à la recherche de l'hôte nécessaire à leur alimentation sanguine, sont souvent caractéristiques de l'espèce. Ils sont sous le contrôle des facteurs exogènes (rythme circadien, température) et endogènes (préférences trophiques). Cependant c'est généralement la disponibilité de l'hôte, et les facteurs attractifs responsables de l'agressivité différentielle des anophèles (âge, taille, sexe, groupe sanguin, état physiologique, dégagement de CO₂, chaleur du corps ou sécrétion de phéromones de l'hôte vertébré piqué), qui jouent un rôle essentiel (Day *et al.*, 1983). Pour qu'une espèce d'anophèle soit vectrice, elle doit remplir un certain nombre de conditions dont la compétence et la capacité vectorielle :

La compétence vectorielle désigne la faculté d'un vecteur à s'infecter après ingestion d'un repas de sang infectant, puis à assurer le développement du pathogène et sa transmission à l'hôte vertébré lors d'une piqûre. Elle exprime alors le degré de coadaptation pathogène/vecteur invertébré et dépend essentiellement de facteurs génétiques.

La capacité vectorielle exprime le potentiel de transmission d'un pathogène par une population de vecteurs. Elle dépend de facteurs liés au vecteur, à l'agent infectieux et à l'environnement : densité de population du vecteur, fréquence du contact vecteur-hôte vertébré, survie du vecteur et durée de développement extrinsèque du pathogène. L'anthropophilie est la condition *sine qua non* de la transmission naturelle du paludisme à l'homme. Une anthropophilie stricte, soit par suite des préférences trophiques du vecteur, soit par suite de l'absence d'hôtes alternatifs, constitue la situation la plus favorable.

2.3 Les stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme

2.3.1 Lutte anti-larvaire

La plupart des méthodes de lutte visant à réduire la production de moustiques nécessitent le traitement des gîtes larvaires. Néanmoins, une lutte anti-larvaire bénéfique au plan épidémiologique contre le paludisme implique une réduction quasi totale des gîtes à anophèles, principalement dans les zones de paludisme stable où la transmission peut être assurée par un petit nombre de vecteurs. Or les caractéristiques des gîtes larvaires des espèces vectrices *An. gambiae* et *An. arabiensis* (nombreux et temporaires) ne permettent pas l'utilisation aisée des méthodes de lutte anti-larvaire quelle que soit la méthode (aménagement de l'environnement, lutte biologique, lutte chimique).

2.3.2 Lutte anti-adulte

La principale méthode de lutte contre les adultes est l'aspersion intradomiciliaire utilisée pour lutter contre les vecteurs du paludisme endophiles et anthropophiles comme *An. funestus* et *An. gambiae*. Si l'intérieur de l'habitation a fait l'objet d'un traitement insecticide, la plupart des anophèles seront tués. De la sorte, le vecteur ne pourra plus transmettre la maladie (dans le cas d'un moustique déjà infecté) ni même pondre les œufs que ce repas de sang lui aurait permis de mener à maturation. Le DDT fut longtemps l'insecticide de choix pour les aspersion de par sa rémanence et son efficacité contre les moustiques et autres insectes nuisibles (cafards et punaises par exemple). Cependant, il est remplacé par des insecticides moins rémanents dans l'environnement comme certains organophosphorés (malathion), carbamates (bendiocarb) ou pyréthrinoïdes (perméthrine).

Les traitements intradomiciliaires présentent cependant l'inconvénient de ne pas éliminer les moustiques les plus exophages et/ou exophiles (i.e. *An. arabiensis*), qui continuent de prendre des repas sanguins, assurant ainsi un niveau minimal de transmission.

2.3.3 Réduction du contact homme-vecteur

Les moustiquaires sont utilisées depuis longtemps pour se protéger des piqûres de moustiques (Snow *et al.*, 1987). Leur efficacité s'est vue renforcée lorsqu'elles ont été imprégnées d'insecticides (Darriet *et al.*, 1984), ajoutant à la barrière physique, un effet répulsif et létal. En effet, l'effet répulsif des PYR empêche le moustique de se gorger au travers de la moustiquaire et d'y pénétrer lorsque celles-ci sont trouées après un certain temps d'utilisation. L'effet létal sur les moustiques contribue lui à la protection communautaire conférée par les matériaux imprégnés d'insecticides (MII). Une couverture de la population

supérieure à 80%, entraînerait une diminution de la transmission palustre « effet de masse » en réduisant la densité vectorielle, la durée de vie du moustique, ainsi que les indices sporozoïtiques (Lengeler, 2004). Aussi selon l'OMS (2011) les MII ont apporté la preuve qu'elles réduisaient la mortalité, toutes causes confondues, d'environ 20%.

La disponibilité des moustiquaires à « longue durée d'action» (Long lasting Insecticide-treated bed nets: LLINs) sur le marché, présente l'avantage de ne nécessiter aucun retraitement durant la durée de vie de la moustiquaire, estimée à 4 ou 5 ans (Guillet *et al.*, 2001).

2.3.4 Moustiques transgéniques

La lutte génétique et l'utilisation des mâles stériles (Fontenille and Simard, 2004; Klassen, 2009) sont des approches de plus en plus explorées dans la lutte anti-vectorielle. Ces approches génétiques appliquées en santé publique depuis les années 60 ont eu un succès très limité. Elle représente des perspectives intéressantes de lutte anti-vectorielle (LAV).

2.4 Les insecticides

Un insecticide est une substance active ou une préparation susceptible de tuer les insectes (ou d'autres arthropodes, tels que les acariens) leurs larves et (ou) leurs œufs. Ils appartiennent au groupe des pesticides, eux-mêmes inclus dans les biocides. La totalité des insecticides est issue de la lutte contre les insectes nuisibles à l'agriculture. Les cibles potentielles des insecticides sont nombreuses : système nerveux central, le métabolisme respiratoire ou le métabolisme hormonal.

Seules quatre familles de produits chimiques représentent plus de 10% de part de marché chacune et plus de 70% de l'ensemble : les organophosphorés (utilisés à partir de 1940), les carbamates (à partir de 1950), les pyréthrinoïdes de synthèse (à partir de 1970) et les néonicotinoïdes (à partir de 1990) (Nauen, 2006). La cible principale de ces insecticides est le système nerveux des insectes, en effet près de 90% des insecticides utilisés sont neurotoxiques.

Les pyréthrinoïdes agissent sur le canal sodium voltage dépendant (CNaVdp) en augmentant la fréquence des décharges nerveuses (type I) ou le temps d'ouverture des canaux (type II). Cette action neurotoxique provoque une transmission répétée ou continue de l'influx nerveux, qui aboutit à la tétanie de l'insecte (effet KD). L'action de ces insecticides se manifeste également par une perturbation des échanges en ions calcium (Ca⁺⁺) et magnésium

(Mg⁺⁺) qui, normalement, circulent au travers des membranes cellulaires. L'atteinte de la circulation de ces ions entraîne la libération massive de neurohormones qui déséquilibrent l'organisme tout entier. L'insecte physiologiquement désorienté passe par des phases d'incoordination et de tétanisation. La mort survient plus ou moins rapidement suivant la dose et la puissance de l'insecticide.

Les organochlorés du groupe des cyclodiènes ont comme site d'action les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) du système nerveux central.

Les organophosphorés et les carbamates prennent la place de l'acétylcholine en se fixant sur son site d'interaction avec l'acétylcholinestérase. Il en résulte un blocage des sites d'action, suivi d'un accroissement rapide de l'acétylcholine qui peut s'accumuler jusqu'à 260 % de la normale. La propagation de l'influx nerveux est bloquée, et l'insecte meurt de paralysie.

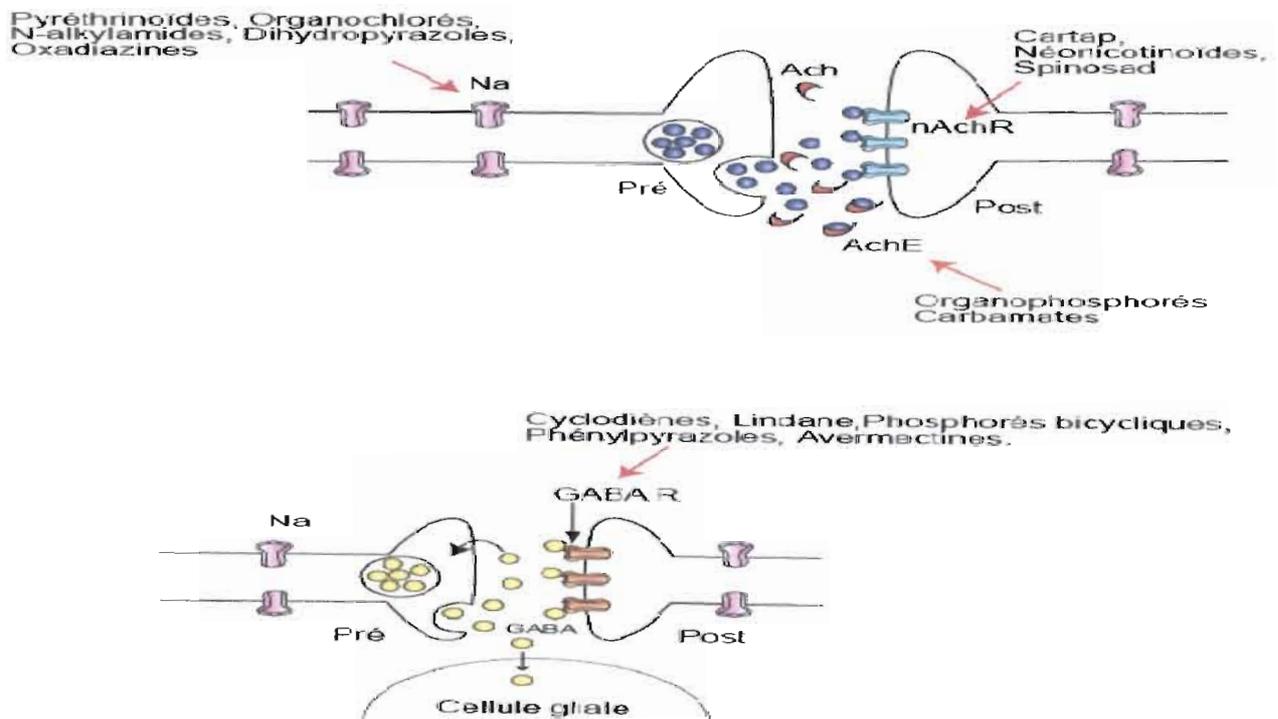


Figure 1: Représentation schématique d'un neurone et d'une synapse cholinergique avec les cibles principales des insecticides.

ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; AChR : récepteur cholinergique de type nicotinique. N : noyau ; Na : canal sodium ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique ; RyR : récepteur à ryanodine (Modifié d'après (Raymond- Delpech et al 2005)).

B : Représentation schématique d'une synapse GABAergique avec les cibles principales des insecticides. GABA : acide-aminobutyrique ; GABAR : récepteur au GABA ; Na : canal sodium ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique (Modifié d'après (Raymond-Delpech *et al* 2005)).

2.4.1 La résistance aux insecticides

2.4.1.1 Définition

La résistance est définie comme l'apparition d'individus possédant la faculté de survivre à des doses d'une substance toxique létales pour les individus de la même population.

Différents facteurs vont influencer la sélection de la résistance :

- les facteurs opérationnels : mode et fréquence des applications, taille des zones traitées, dosage, stade de développement de l'insecte ciblé, sélectivité du produit et persistance de résidus;
- les facteurs bio-écologiques : mobilité, migration, nature de l'habitat, climat (température, humidité, etc.), temps de génération, nombre de descendants, régime de reproduction et certains facteurs comportementaux ;
- Les facteurs génétiques : fréquence, nombre et dominance des gènes de résistance, expression et interaction des gènes responsables de la résistance (Alout, 2009) .

2.4.1.2 Les mécanismes de résistance

Différents mécanismes de résistance ont été sélectionnés par l'utilisation massive d'insecticide aussi bien pour la LAV que pour les traitements agricoles (Chandre *et al.*, 1999, Dabiré *et al.*, 2012). Deux mécanismes majeurs (la résistance métabolique, et la modification de cible) sont impliqués dans la résistance des vecteurs aux insecticides. A ces deux mécanismes s'ajoutent d'autres mécanismes d'une moindre importance.

a) La résistance métabolique

La résistance métabolique est due à l'accroissement de l'activité d'enzymes de détoxification assurant l'élimination ou la séquestration des insecticides, essentiellement des estérases, des oxydases à cytochrome P-450 et des glutathion-Stransférases. Cet accroissement peut provenir soit d'une modification de la conformation de l'enzyme la rendant plus efficace ; soit d'une production accrue de protéine (Vaughan *et al.*, 1995) pouvant parfois représenter jusqu'à 12% des protéines totales d'un individu. La surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme (Mouches *et al.*, 1987) ou à une augmentation du nombre de copies du gène qui code pour ces enzymes (Hemingway *et al.*, 2004).

b) La modification de cible

Les mutations au niveau des cibles principales (CNaVdp, AChE, GABA) sont des mécanismes de résistance très efficaces qui s'accompagnent de phénomènes de résistance croisée pour tous les insecticides agissant sur la même cible. Chez la plupart des espèces d'insectes, les mêmes points de mutations se retrouvent généralement sur les gènes codant pour ces protéines, de par le fait que le changement d'acide aminé doit non seulement réduire l'affinité de l'insecticide avec la cible mais aussi, préserver les fonctions initiales de la protéine à un niveau compatible avec la survie de l'insecte.

Le canal sodium est une protéine qui comporte quatre domaines homologues répétés comprenant chacun six segments hydrophobes transmembranaires. Les pyréthriinoïdes et le DDT agissent en modifiant la cinétique d'inactivation des CNaVdp.

La résistance de type « *kdr* » (*knock-down resistance*) est due au remplacement d'un acide aminé (leucine en phénylalanine, L1014F) dans le sixième segment du domaine II du canal sodium (Martinez Torrez *et al.*, 1998) dans les populations d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Ouest. Elle se caractérise par une diminution d'affinité entre l'insecticide et son site de fixation (Pauron *et al.*, 1989). En Afrique de l'Est, c'est plutôt le remplacement de la leucine par la sérine à la même position (mutation *kdr* Leu-Ser) qui est à l'origine d'une faible résistance à la perméthrine.

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acétylcholine (ACh), le principal neurotransmetteur chez les insectes. Elle est la cible principale des insecticides organophosphorés (OPs) et des carbamates. La résistance provient soit d'une augmentation de la quantité d'AChE (Fournier and Mutero, 1994) soit d'une diminution de l'affinité de celle-ci avec ces insecticides (Soderlund and Bloomquist, 1989). Chez *Cx. quinquefasciatus*, *An. albimanus* et *An. gambiae*, la mutation glycine / sérine se retrouve en position 119 sur le gène *Ace.1* et confère une résistance croisée aux OPs et aux carbamates (Weill *et al.*, 2003). Chez *Cx. quinquefasciatus*, l'acétylcholinestérase insensible (*Ace.1^R*) s'avère être beaucoup moins efficace à dégrader les substrats que celle des individus sensibles. Des études ont d'ailleurs montré que le coût de l'allèle résistant est fort et peut affecter de nombreux traits de vie (développement larvaire, compétition sexuelle, taux de prédation) (Djogbenou, 2008).

c) La pénétration réduite

Nombre d'insecticides pénètrent dans l'organisme de l'insecte à travers la cuticule. Des changements au niveau de cette dernière peuvent réduire la pénétration de l'insecticide conférant ainsi une résistance à certains types d'insecticides. Mais ce mécanisme à lui seul confère en général un très faible niveau de résistance. Cependant son action en complément d'autres mécanismes peut conduire à une augmentation significative de la résistance.

d) La résistance comportementale

Des changements de comportement pouvant conduire à une réduction de contact avec un insecticide peut augmenter la probabilité de survie de l'insecte dans un environnement traité. De tels comportements peuvent réduire la tendance de l'insecte à pénétrer dans une zone déjà traitée ou augmenter sa tendance à fuir une surface quand celle-ci est traitée. Dans tous les cas l'insecte a la capacité de détecter l'insecticide et l'éviter. Ce phénomène de résistance comportemental est mal connu.

e) Résistance croisée à plusieurs familles d'insecticides

La résistance croisée se produit lorsqu'un mécanisme de résistance, qui a permis à l'insecte de résister à un premier insecticide, confère également la résistance à des composés de la même famille, ou d'une autre famille d'insecticides. Le phénomène de résistance croisée est fréquent dans les populations de vecteurs. Par exemple, le DDT et les pyréthrinoïdes sont chimiquement différents, mais les deux agissent sur la même cible (CNaVdp).

3. Matériels et Méthodes

3.1 Elevage des moustiques

3.1.1 Origine du matériel biologique et site d'étude

Nous avons mené une étude expérimentale dans les laboratoires de la Direction régionale de l'Ouest de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS/DRO).

Les larves utilisées dans ces expériences sont issues des colonies d'*An. gambiae s.s* (*Anopheles gambiae* Giles). Il s'agit des souches Kisumu et Kdr kis.

- La souche Kisumu est une souche de référence sensible à tous les insecticides. Elle a été initialement isolée dans la région de Kisumu à l'ouest du Kenya dans les années 1950 et a été maintenue au laboratoire depuis lors (Diabaté, 1999).

- La souche Kdr kis est homozygote pour la mutation *kdr-west* (L1014F) qui confère une résistance croisée PYR/DDT (Martinez Torrez *et al.*, 1998). Cet allèle provient de la souche VKPR échantillonnée dans la Vallée du Kou au Burkina Faso en 1997. La souche Kdr kis a été obtenue par croisements successifs des souches VKPR et Kisumu suivis par une sélection à la perméthrine. Seuls les individus résistants ont été gardés pour le croisement suivant avec Kisumu. Au bout de 15 générations, le génome de VKPR est introgressé à 99% par celui de Kisumu pour obtenir la souche Kdr kis. Ces souches possèdent un fond génétique commun à celui de Kisumu sauf au niveau du gène de résistance. Les variations observées pourront donc être directement associées au gène de résistance.

3.1.2 Conditions d'élevages pré-imaginale

Nous avons utilisé les deuxième et troisième pontes de femelles pour effectuer les expériences dans le but d'avoir le maximum de larves. Les pontes recueillies ont été mises en eau jusqu'à éclosion. Les larves ont ensuite été distribuées dans des bacs circulaires de 23cm de rayon et de 10cm de hauteur, remplis d'eau de source (750mL).

Deux niveaux de densité ont été constitués par bac :

- faible densité : 150 larves, soit 0.35 larves/ cm²
- forte densité : 300 larves, soit 0.70 larves/cm²

Nous avons constitué trois lots de bacs à raison de deux bacs pour les fortes densités et de trois bacs pour les faibles densités pour s'affranchir d'un potentiel effet bac.

- Le premier était constitué de larves de la souche; sensible Kisumu
- Le second était constitué de larves de la souche résistante Kdr kis ;
- Le troisième lot était constitué de mélange 50% de la souche Kdr kis et de 50% de Kisumu.

Les bacs ont été recouverts d'un tulle moustiquaire (maille de 0,2mm). Les conditions environnementales de l'insectarium ont été standard: $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% d'humidité relative et une photopériode de 12L:12D. Quotidiennement, les larves mortes ont été comptées et retirées. Chaque deux jours les bacs étaient nettoyés, l'eau changée afin de limiter l'accumulation de matière organique plus ou moins dégradée, qui rendent le milieu toxique pour les larves (Bayoh and Lindsay, 2003); les larves survivantes ont été nourries avec une quantité limitée de Tetramin® Baby fish-food à raison de 0,2mg/larve (TetraWerke, Melle, Germany) (Koenraadt *et al.*, 2004) . Au stade nymphale celles-ci ont été triées chaque jour et mises dans des gobelets contenant de l'eau de source puis placées dans une cage : une pour les fortes densités et une autre pour les faibles densités pour chaque lot.

3.2 Compétence vectorielle vis-à-vis de *Plasmodium falciparum*

La compétence vectorielle vis-à-vis de *P. falciparum* des souches Kisumu et Kdr kis en présence ou non de compétition a été étudiée en réalisant des infections expérimentales à partir des femelles issues des élevages précédents.

3.2.1 Enquête parasitologique : recherche de porteurs de gamétocytes

Nous avons effectué des prospections parasitologiques dans les localités de Bama, Dandé et Soumousso, 3 villages environnant la ville de Bobo-Dioulasso. Des gouttes épaisses ont été réalisées chez des volontaires âgés de 5 à 12 ans. La goutte épaisse et le frottis ont consisté à un prélèvement de 2 ou 3 microlitres de sang capillaire au bout du doigt de chaque sujet et déposé sur une lame. Après fixation du frottis au méthanol et séchage, la goutte épaisse et le frottis ont été colorés au Giemsa 10% pendant 10 minutes puis examinés au microscope à l'objectif 100 pour la détection des stades sexués et asexués des parasites ainsi que pour déterminer l'espèce de *Plasmodium*. Les patients porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* ont été emmenés le lendemain au laboratoire (IRSS) pour le prélèvement sanguin.

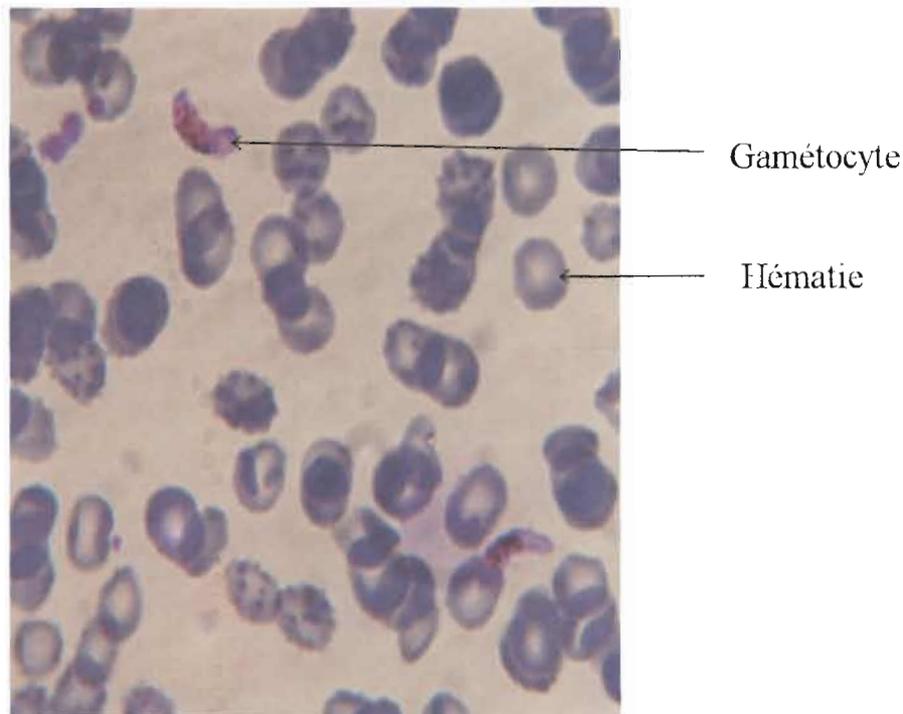


Figure 1: Photographie illustrant deux gamétoocytes sur un frottis

(Yaméogo, 2012)

3.2.2 Système d'infection expérimentale

➤ Dispositif expérimental

Cette procédure connue sous le nom de « Direct Membrane feeding Assay » (Gouagna *et al.*, 2004, Graves *et al.*, 1988, Tchuikam *et al.*, 1993) consiste à faire gorger des moustiques sur du sang contenu dans des cellules de gorgement (feeders). La base de chaque cellule est préalablement recouverte d'une membrane de Parafilm® amincie à travers laquelle les moustiques vont se gorger de sang. L'ensemble est maintenue à 37°C grâce à un bain thermostaté car une basse température, inférieure à la température corporelle, aurait provoqué l'exflagellation des gamétoocytes et les rendrait moins viable chez le moustique (**figure 7**).



Figure 1: Dispositif de l'infection expérimentale

➤ **Réalisation**

Les infections expérimentales ont été réalisées par gorgement sur membrane (Parafilm). Deux tubes héparinés de 5 ml de sang de porteurs de gamétocytes ont été centrifugés immédiatement après prélèvement à 3000 rotation par minutes (rpm) pendant 3 min à 37°C. Le plasma a été remplacé par une quantité équivalente de plasma AB d'un sujet non immunisé contre le paludisme dans le but d'éviter la potentielle interférence de l'immunité antipalustre du porteur. Toutes les femelles élevées précédemment ont séjourné après émergence dans des cages communes avec les mâles pendant au moins 3 jours. Pour chaque infection, deux gobelets contenant 50-60 moustiques ont été utilisés pour chaque densité. Les moustiques ont été mis en contact avec le sang à travers la membrane parafilm et maintenus dans l'obscurité pendant une trentaine de minutes pour gorgement. Les femelles gorgées ont été ensuite triées et placées dans des cages au laboratoire dans les conditions standard d'élevage jusqu'au jour de dissection. Pendant ce temps elles étaient nourries de solution sucrée (glucose à 2.5%) afin d'assurer leur survie.

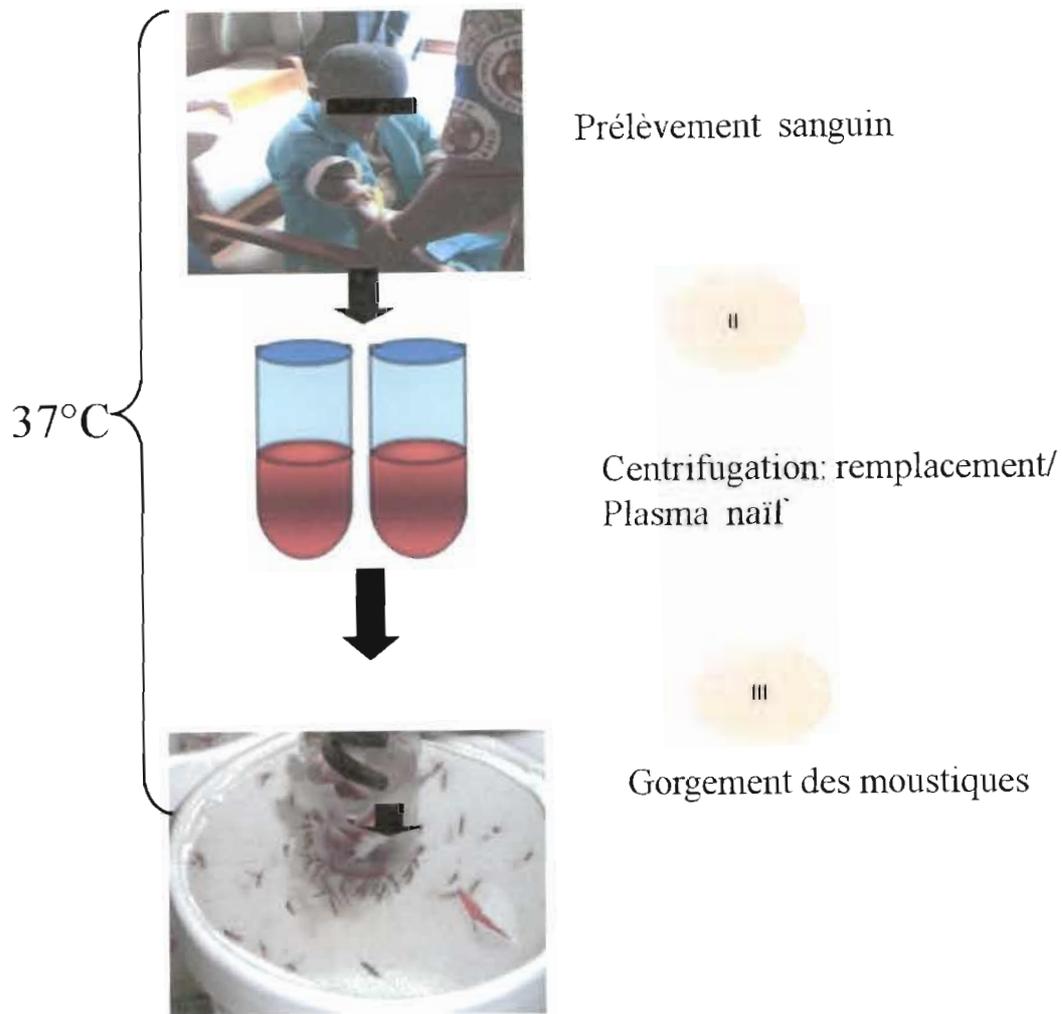


Figure 1 : Schémas du protocole expérimental

3.2.3 Détection des oocystes

Les femelles qui ont survécu au 7^{ème} jour au septième jour après l'infection ont été disséqués pour la recherche et le comptage des oocystes. Pour cela ils ont été placés au congélateur, le temps qu'elles s'engourdissent (2-3 minutes) afin de faciliter la dissection. Le moustique est déposé sur la lame et immobilisé au niveau du thorax par un mandrin dans une solution de mercurochrome 0.4%. Cette solution sert à la coloration des tissus pour faciliter l'observation des oocystes au microscope. A l'aide d'un autre mandrin, la partie terminale de l'avant dernier segment subit une pression pour extraire les ovaires, les tubes de Malpighi, et l'estomac. L'estomac est ensuite détaché du reste et observé au microscope à l'objectif x10 puis x20 pour l'identification des oocystes.



Séance de dissection de femelles d'anophèle

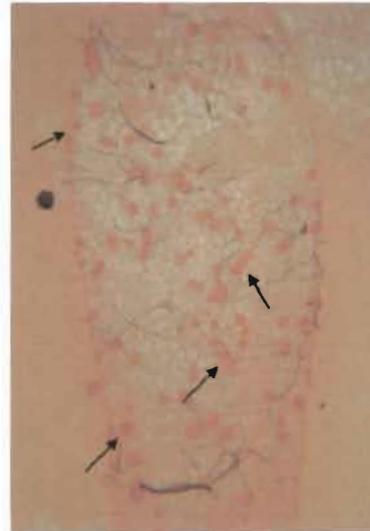


Photo d'un estomac d'anophèle bourré d'oocystes

Figure 1: Dissection et estomac remplis d'oocystes.

3.2 4 Mesure de la longueur des ailes des femelles

La longueur des ailes des moustiques disséqués a été mesurée de l'alula à l'extrémité distale longueur élevée au cube (WL^3) est considérée comme un index de la taille du moustique (Fernandes and Briegel, 2005). Les ailes ont été montées entre lames et lamelles à l'aide d'aiguilles de dissection et photographiées. Leur taille a été ensuite mesurée grâce au logiciel Image J1.41.0, (Wayne Rasband National Institute of Health, USA).

3.3 Identification moléculaire

Pour déterminer les proportions de moustiques infectés après un repas de sang provenant du mélange, les carcasses des moustiques disséqués ont été conservées dans des tubes contenant un dessiccateur (silicagel). Ces tubes ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN par le protocole CTAB (Morlais *et al.*, 2004). L'identification par PCR a été effectuée selon le protocole de Martinez-Torres *et al* (1998). Les contrôles positifs étaient constitués d'ADN de souches de Kisumu et de Kdr kis extrait à partir des souches élevées à l'insectarium.

3. 4. Considérations éthiques

Le présent travail a eu l'approbation du comité institutionnel d'éthique du centre Muraz. Avant l'étude, des séances d'information ont été menées au cours desquelles le protocole a été traduit en langue locale si nécessaire, afin que les personnes ciblées /concernées puissent comprendre et prendre la responsabilité de signer ou pas le consentement éclairé. Les sujets sollicités à participer à l'étude ont été inclus après obtention d'un consentement éclairé signé par leurs parents ou par leurs tuteurs. Une fiche d'information, destinée à expliquer les objectifs de l'étude et des détails sur le protocole employé, a été remise aux participants pour les informer de leur engagement dans l'étude. Les enfants présentant des symptômes et/ou ayant une parasitémie supérieure à 1 000 parasites / μ l ont été référés au dispensaire et traités selon le protocole national.

3.5. Analyse des données

Les données obtenues ont fait l'objet d'analyse ayant pour variables explicatives : «geno» (pour génotype) avec deux modalités qui représentent le génotype des souches Kisumu la souche sensible de référence, et KdrKis la souche PYR/DDT résistante ; « dens » représentant la densité larvaire de départ avec 2 modalités forte et faible densité ;« taille » une variable numérique pour la taille de l'aile ; « gam» qui représente la densité en gamétocytes (le nombre de gamétoocyte par microlitre de sang) ; « compet » qui indique l'absence ou la présence de compétition larvaire entre les deux souches et enfin, « donneur » qui représente les différents patients utilisés. Ces données ont été saisies sous Excel 2007 et analysées par le logiciel R version 2. 13. 1.

Un modèle linéaire généralisé à effets mixtes (glmm) a testé les effets des 6 variables explicatives sur la proportion de moustiques infectés et l'intensité de l'infection. Le «donneur» a été utilisé comme variable aléatoire car les patients ont été choisis au hasard et non pour un effet suspecté pour chacun et pour tenir compte de la corrélation entre individus de la même infection expérimentale (ou donneurs de sang). Les autres variables ont été utilisées pour leur effet fixe.

Pour l'analyse de la proportion de moustiques infectés (probabilité qu'un moustique femelle soit infecté après un repas de sang infectieux), la variable dépendante a été codée 1 pour la présence d'oocystes et 0 pour leur absence. Le modèle a été analysé en utilisant la procédure lmer (package lme4 de R) avec une structure d'erreur binomiale. L'importance des variables et la sélection du modèle minimal ont été évaluées en utilisant le package mixmod, qui effectue

une hypothèse de type III pour les effets fixes. Les modèles maximaux ont inclu 5 variables «geno», «dens», «gam», « taille », «compet»; 6 doubles interactions «geno*gam» «geno*dens», «geno*taille», «dens*taille », «geno*compet », «gam*compet» et 2 interactions triples «geno*dens*taille » et «geno*gam*compet » comme des effets fixes.

L'analyse de l'intensité de l'infection a inclu uniquement les moustiques qui ont développé au moins 1 oocyste dans leur estomac. La procédure glmm ADMB avec une distribution binomiale négative (package glmm ADMB) a été utilisée pour tenir compte de la forte dispersion du nombre d'oocyste dans le système.

L'importance des variables a été établie à l'aide d'un test du rapport de vraisemblance (LRT), qui est distribué approximativement comme une distribution χ^2 .

4. Résultats

4.1 La proportion de moustiques infectés

Nous avons réalisé 6 repas de sang infectieux (codé A à F) avec gamétoctémies variant de 16 à 304 gamétoctes / μl de sang. Ces infections nous ont permis de disséquer un total de 993 femelles. L'impact individuel de chacune des variables ainsi que de leur interaction sur la proportion de moustiques infectés a été évalué par un modèle linéaire généralisé à effets mixtes (glmm) et les résultats de l'analyse sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Effets aléatoires et effets fixes sur la proportion de moustiques infectés

| Variabiles (aléatoire) | χ^2 | P- value |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------|
| donneur | 4,79 | 0,03 |
| Variabiles (fixes) | F | P value |
| Geno | 0,01 | 0,908 |
| Gam | 70,61 | < 0,001 |
| dens | 0,00001 | 0,970 |
| taille | 2,12 | 0,146 |
| compet | 0,66 | 0,417 |
| geno*gam | 4,44 | 0,035 |
| geno*dens | 8,46 | 0,004 |
| geno*taille | 0,04 | 0,837 |
| dens*taille | 0,00 | 0,953 |
| geno*compet | 5,18 | 0,023 |
| gam*compet | 3,77 | 0,052 |
| geno*dens*taille | 8,43 | 0,004 |
| geno*gam*compet | 4,60 | 0,032 |

Les différences ont été considérées comme significatives pour une valeur $p < 0,05$.

Dans les expériences menées, il ressort que la variable donneur a eu un effet significatif sur la proportion de moustiques infectés ($p=0,03$). Cet effet a été pris en compte pour déterminer l'influence des variables fixes. Sur l'ensemble des données, l'allèle de résistance « *kdr* », n'a pas eu d'effet significatif sur la proportion de moustiques infectés de même que la densité larvaire. La compétition larvaire n'a pas eu non plus d'effet sur la prévalence de l'infection. La taille de l'aile n'a eu aucun effet sur la proportion de moustiques infectés ni en interaction avec le génotype ni avec la densité. Cependant l'effet de la gamétoctémie était significatif, les plus fort taux étant observées avec les plus fortes gamétoctémies.

Plusieurs interactions ont été mises en évidence démontrant la complexité qui existe entre les différentes variables testées. Une interaction significative entre la gamétoctémie et le

génotype a été observée. Elle révèle que l'influence de la gamétoctémie sur la proportion de moustiques infectés était différente entre les génotypes. (figure1).

Pour les infections B (16/ μ l) et F (304 μ l), la proportion de moustiques infectés est supérieure avec la souche Kisumu, tandis que dans les infections A, C, D et E, elle est plus élevée avec la souche KdrKis.

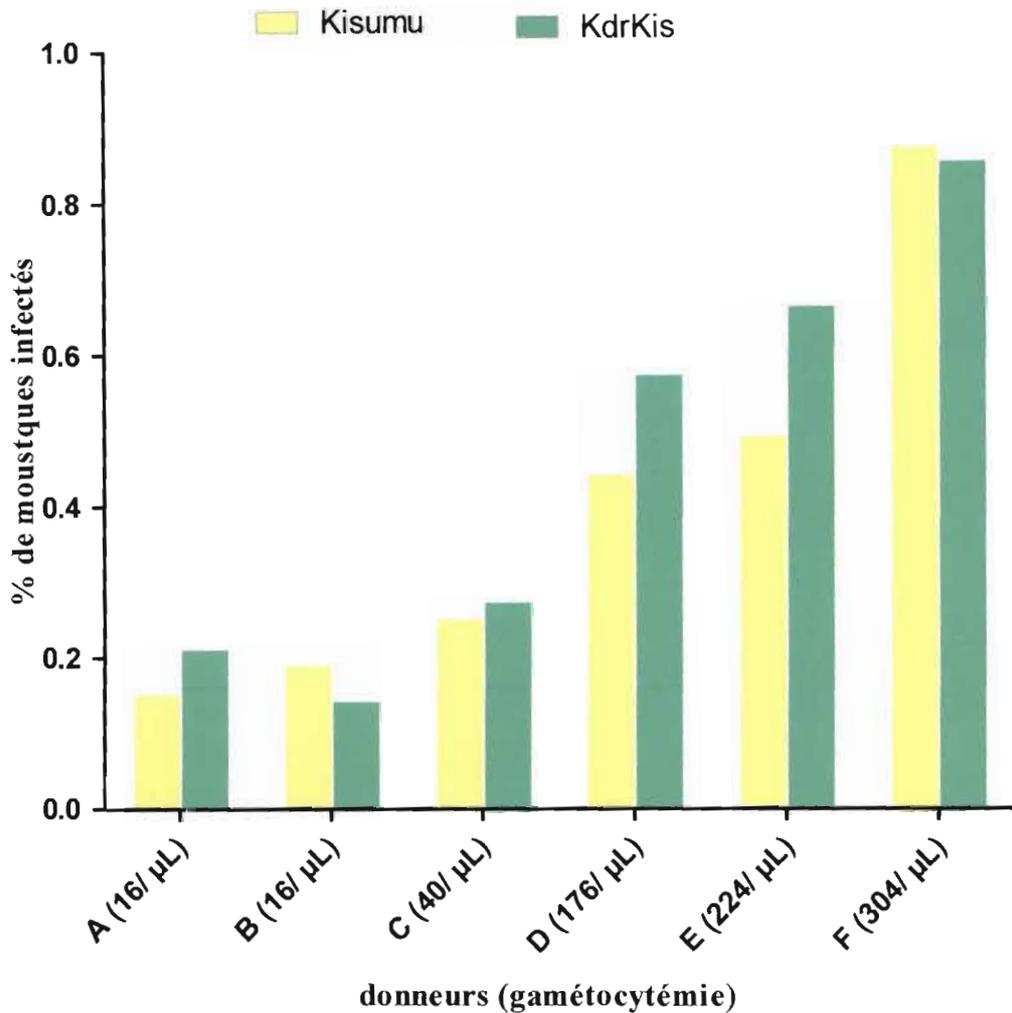


Figure 10 : La proportion de moustiques infectés en fonction de la gamétoctémie pour chaque souche.

On a observé une interaction significative entre les variables génotype et densité ($p=0,004$) montrant ainsi que l'influence de la densité sur la proportion de moustiques infectés est significativement différente dans les génotypes.

La représentation graphique de cette interaction illustrée par la figure 11 indique qu'en fonction de la densité larvaire la proportion de moustiques infectés est différente dans les deux génotypes.

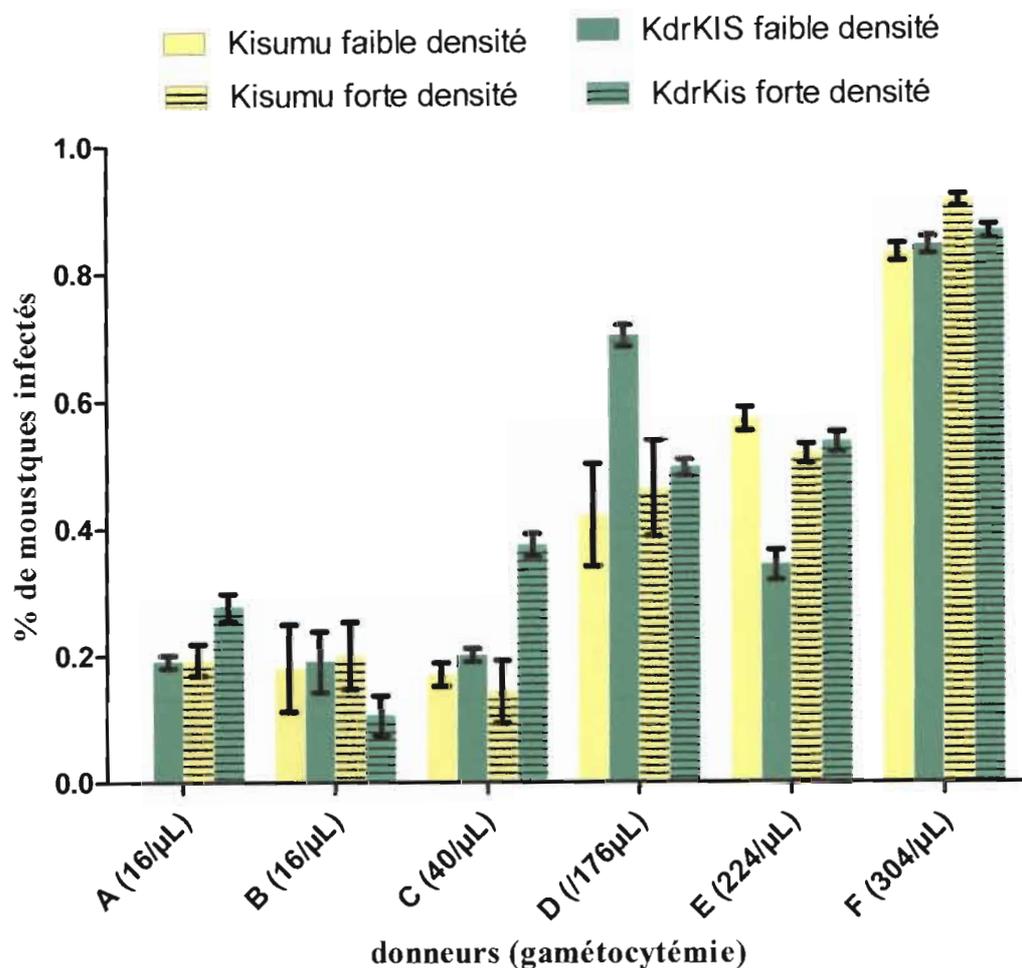


Figure 11 : La Proportion de moustiques infectés (+SE) de chaque souche en fonction de la densité larvaire et des infections.

Dans les infections B, C et F, la proportion de moustiques infectés ne semble pas être influencée lorsque les larves sont élevées en faible densité pour les deux souches. Par contre en forte densité, la proportion infectés de Kisumu des infections B et F est supérieure à celle de KdrKis, alors que dans l'infection C, c'est la souche KdrKis qui a une plus forte prévalence.

Pour l'infection A, la proportion de moustiques infectés est plus élevée pour la souche KdrKis en forte densité, il en est de même pour la souche Kisumu.

Pour les infections D et E, la forte densité n'a pas d'effet sur la proportion de moustiques infectés quelle que soit la souche. Mais en faible densité, la proportion de moustiques infectés de KdrKis est plus élevée pour l'infection D alors que pour l'infection E c'est la souche Kisumu qui présente une forte la proportion.

La triple interaction geno*dens*taille a également influencé la proportion de moustiques infectés alors qu'aucun effet significatif des interactions doubles taille*geno et taille*dens n'a été observé. Cette triple interaction pourrait s'expliquer par un effet significativement différent de la taille de l'aile dans les groupes génotype par densité (Kisumu forte densité, Kisumu faible densité, KdrKis forte densité, KdrKis faible densité).

Pour La compétition, le tableau I indique que prise individuellement, cette variable n'a eu aucun effet significatif sur la proportion de moustiques infectés. Cependant, l'interaction de la compétition avec le génotype a été significative; elle traduit le fait que l'influence de la compétition est différente dans les deux génotypes.

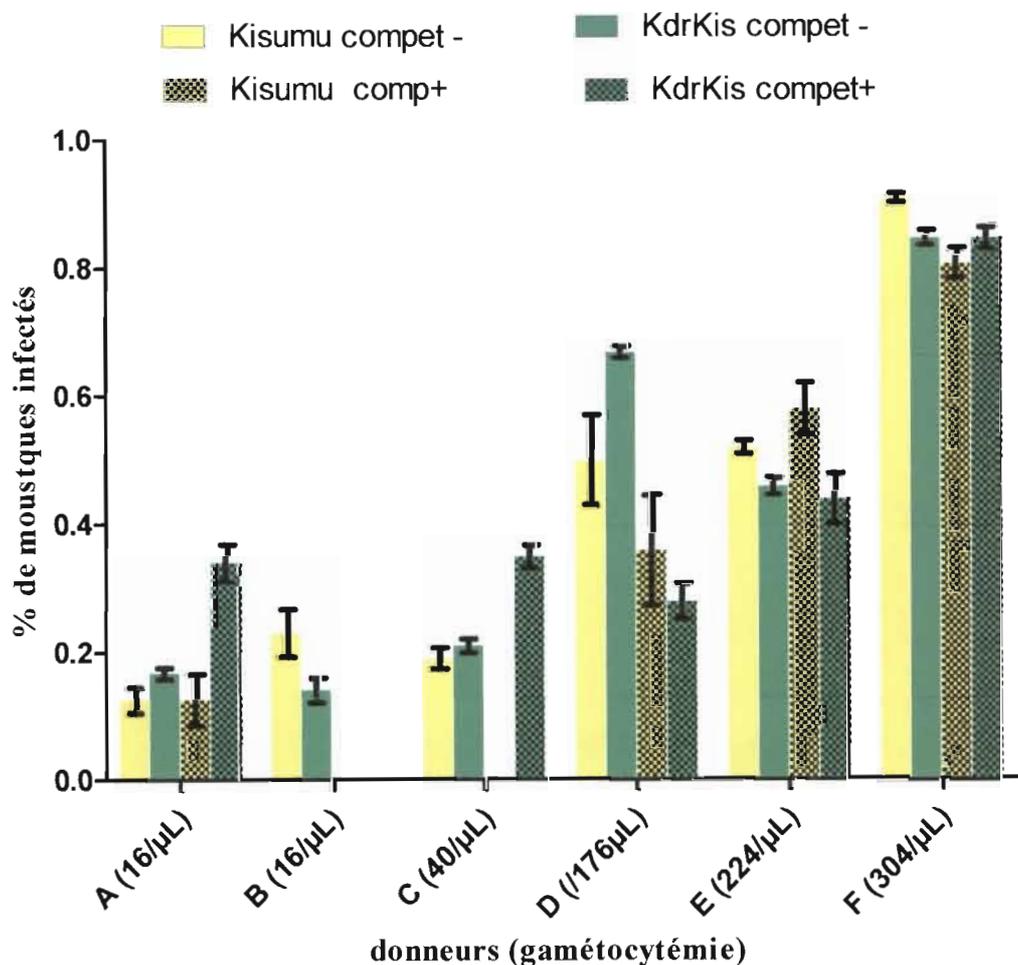


Figure12: la proportion de moustiques infectés (±SE) au niveau de chaque souche en fonction de l'infection

Pour l'infection A, la compétition larvaire semble avoir augmenté la prévalence de l'infection de la souche résistante.

En présence de compétition, la proportion de moustiques infectés de l'infection de la souche KdrKis est plus élevée qu'en absence de compétition. Des résultats différents sont observés pour l'infection D où en présence de la compétition larvaire, la proportion de moustiques infectés de la souche Kisumu est plus élevée que celle de la souche KdrKis. En outre pour la même infection quelle que soit la souche, la proportion de moustiques infectés en présence de la compétition larvaire a baissé.

La compétition larvaire semble avoir favorisé la proportion de moustiques infectés au niveau de la souche Kisumu pour l'infection E. Quant à l'infection F, la compétition semble n'avoir eu aucun effet sur la proportion de moustiques infectés au niveau des deux souches.

Pour les infections B et C, nous n'avons pas pu estimer la proportion de moustiques infectés des individus en compétition en raison de la non représentativité des échantillons.

La proportion de moustiques infectés a été également modulée par l'interaction $\text{geno} * \text{gam} * \text{compet}$.

Elle traduit le fait que l'interaction $\text{gameto} * \text{compet}$ est différente selon le génotype. L'impact de la gamétocytémie est différent quand il y a compétition et cette différence n'est pas la même dans chaque génotype.

4.2 Intensité de l'infection

Dans cette partie de l'étude, nous avons cherché à savoir quel était le rôle de la mutation « *kdr* » et de la densité larvaire dans le développement parasitaire en absence et en présence de compétition larvaire.

Le nombre moyen d'oocyste a été estimé en fonction des paramètres ci-dessus cités. Parmi les 993 femelles disséquées, 465 individus avaient au moins un oocyste ($N_{\text{Kisumu}} = 189$, $N_{\text{Kdrkis}} = 276$) et ont été inclus dans l'analyse.

L'analyse par glmm a retenu le modèle présenté dans le tableau II. Les variables «geno», «taille» «compet» n'ont pas été retenues dans ce modèle final, ce qui signifie que ces variables seules ou en interaction n'expliquent pas les différences observées sur le nombre moyen d'oocyste. La présence de l'allèle de résistance, la taille de l'aile et la compétition n'ont donc pas influencé le développement du parasite.

Tableau I: Effet sur le nombre moyen d'oocyste

| Paramètre (aléatoire) | χ^2 | P value |
|-----------------------|----------|-------------|
| donneur | 77,9 | <0,001 |
| Paramètre (fixes) | F | P value |
| Gam | 7,32 | 0,05 |
| dens | 1,82 | 0,18 |
| gam*dens | 5,94 | 0,02 |

Les différences ont été significatives pour un $p \leq 0,05$.

Comme au niveau de la proportion de moustiques infectés, le donneur de sang a influencé de façon significative le nombre moyen d'oocyste ($p < 0,001$).

La différence entre les densités n'a pas été statistiquement significative ($p = 0,18$) pour tous les groupes confondus. Seul le paramètre « gam », et l'interaction « gam*dens » ont un effet sur l'intensité de l'infection. Le nombre moyen d'oocystes par estomac est donc corrélé à la gamétoctémie ($p = 0,05$). Mais l'effet de la gamétoctémie est différent selon la densité larvaire, cette dernière influence probablement la sensibilité à l'infection.

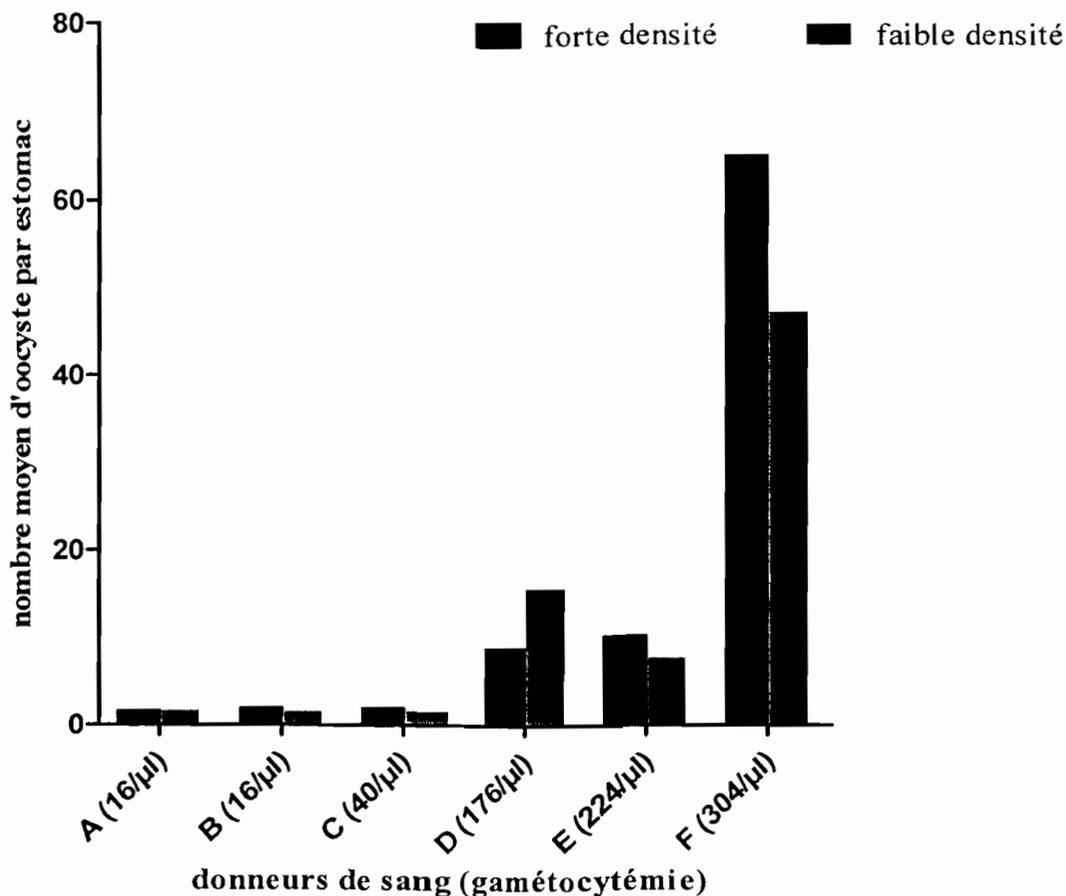


Figure 10 : Nombre moyen d'oocyste (ES) en fonction de la gamétoctémie

Blanc : faible densité Gris : forte densité.

La figure 4 illustre l'interaction gam*dens. Pour l'infection D (176 gamétocytes/ μ l), le nombre moyen d'oocyste est plus élevé pour la faible densité que pour la forte densité larvaire. Par contre l'effet inverse est observé pour l'infection F (304 gamétocytes/ μ l), ou la forte densité présente un nombre moyen d'oocystes élevé. Pour les infections A, B, C et E, le nombre moyen d'oocystes n'est pas significativement différent entre les densités larvaires.

5. Discussion

L'objectif de notre étude était de voir si la présence de l'allèle de résistance « *kdr* » avait un impact sur la compétence vectorielle d'*An gambiaes.s* vis-à-vis de *P. falciparum*, ceci dans différentes conditions environnementales.

En l'absence d'insecticide, les insectes porteurs d'allèles de résistance sont généralement défavorisés par rapport aux individus sensibles. C'est ce qu'on appelle le « coût génétique » de la résistance. Nous avons essayé de déterminer s'il existait un tel coût associé à l'allèle « *kdr* » sur la sensibilité à l'infection en comparant la prévalence et l'intensité de l'infection de la souche sensible de référence Kisumu et la souche KdrKis résistante aux PYT/DDT, en l'absence d'insecticide. Afin d'avoir un aperçu global du coût génétique en l'absence d'insecticide, nous avons également évalué le rôle des interactions compétitives et de la densité larvaire entre les souches sensibles et résistance sur la proportion de moustiques infectés et l'intensité de l'infection.

Pour cela nous avons utilisé deux souches à fonds génétique commun, excepté pour l'allèle de résistance, de sorte que les différences observées soient imputables uniquement au gène « *kdr* ». Le système d'infection expérimentale utilisé a permis de contrôler un maximum de paramètres. Nous avons englobé le plus de variables explicatives possibles afin de contrôler les observations éventuelles pour la taille, la densité de gamécyte ainsi que pour la variabilité due au sang obtenu de différents donneurs ; mais aussi de la densité larvaire.

Nous avons obtenu un effet significatif des différents donneurs (effet aléatoire) sur la proportion de moustiques infectés ainsi que sur l'intensité de l'infection. Ce qui suggère que la nature du sang des donneurs a une influence importante sur l'ineffectivité des femelles d'*Anopheles s.s.*

Sangaré *et al.*, 2014 avaient émis également l'hypothèse de l'effet donneur sur la survie et la fécondité des femelles donc indirectement sur la capacité vectorielle. En effet, en plus de la compétence vectorielle, la longévité du vecteur au stade imago est une condition *sine qua non* de la transmission du plasmodium : plus le moustique vit longtemps, plus le parasite a une chance d'effectuer son développement complet et donc d'être transmis.

Parmi les variables à effets fixes utilisées, seule la gamétoctémie prise isolément a eu un effet significatif sur la proportion de moustiques infectés et l'intensité de l'infection. Ce qui souligne son rôle très important dans la probabilité du moustique à s'infecter, héberger et à transmettre le parasite. La gamétoctémie fait partie intégrante du donneur mais elle n'est

pas le seul facteur qui peut influencer l'infection. Des facteurs comme la qualité des gamétocytes (stade de maturation), le sex ratio des gamétocytes, les facteurs sanguins tel le trait drépanocytaire (Gouagna *et al.*, 2010) et les génotypes du parasite sont autant de facteurs qui influencent de façons diverses, l'infection des anophèles. Ces paramètres ont été indirectement pris en compte en incluant l'effet donneur en variable aléatoires.

Nous avons observé dans notre étude que sur la proportion de moustiques infectés était modulée par l'interaction entre le génotype et la gamétocytemie ce qui signifie que la densité des gamétocytes influence différemment la prévalence au niveau de chaque souche. Le succès d'une infection à *P. falciparum* chez les moustiques est le résultat de processus complexes. En effet les systèmes de défense du moustique sont activés dès l'infection et un ensemble de mécanismes génétiquement contrôlé est mis en place pour bloquer ou réduire le développement et la transmission, comme les dommages cellulaires (Vlachou *et al.*, 2004, Hurd and Carter, 2004) et l'activation de la réponse immunitaire (Dong *et al.*, 2006, Mendes *et al.*, 2008). La plus grande perte de parasite chez le moustique a lieu lors des premières heures après le repas de sang (Vaughan, 2007) et est en partie sous le contrôle de facteurs génétiques.

Les mécanismes de résistance aux insecticides peuvent avoir une influence directe ou indirecte sur l'activation du système immunitaire conduisant à des variations du développement du parasite (Rivero *et al.*, 2010). Dans la résistance métabolique, des études ont montré qu'il existerait une relation entre la sécrétion d'enzymes de détoxification, la réponse du moustique à l'invasion plasmodiale ainsi que la résistance aux pyréthrinoïdes. Le cytochrome *CYP6M2* est induit en réponse à l'invasion de l'estomac par le parasite (Rute *et al.*, 2010). Il est également connu pour être impliqué dans la résistance aux pyréthrinoïdes ou il est particulièrement régulé au niveau des souches résistantes (Djouaka *et al.*, 2008). Cette observation ainsi que la régulation d'autres gènes, tels que les transporteurs ABC membranaires impliqués dans l'élimination des xénobiotiques, nous amènent à supposer qu'il pourrait y avoir une association entre la réponse à l'infection à *Plasmodium* et la résistance aux insecticides (Rute *et al.*, 2010). Pour la mutation *ace-1* on a observé chez les moustiques résistants une réduction de la durée de vie, un développement larvaire plus lent, un risque plus accru à la prédation, une sensibilité plus accrue aux infections par des bactéries endocellulaires de type *Wolbachia* dans un environnement sans insecticides (Bourguet *et al.*, 2004, Weill *et al.*, 2003, Djogbénu *et al.*, 2010, Berticat *et al.*, 2002, 2004).

Il a été démontré qu'un repas de sang infecté par des bactéries pouvait réduire la prévalence et l'intensité de l'infection du paludisme chez le moustique. Cette réduction est

une conséquence de la stimulation du système immunitaire du moustique qui agit sur le stade zygote et sur les ookinètes (Sinden, 2002). Si les gènes responsables de cette stimulation sont différemment exprimés en présence de la mutation « *kdr* », cela pourrait conduire à des modifications de la compétence vectorielle au niveau des souches résistantes.

Nous avons également montré qu'il existe une différence entre sur la proportion de moustiques infectés des souches résistantes KdrKis et sensibles Kisumu vis-à-vis de *P. falciparum* selon la densité ou la présence de compétition. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les mécanismes immunitaires mis en place par les individus résistants ont plus ou moins contrôlé le développement du parasite du stade gamétoocyte au stade oocyste mais aussi que les facteurs écologiques (tels que la densité larvaire et la compétition interspécifique) y ont une grande influence.

Il faut noter que les conditions dans lesquelles les expériences ont été menées sont différentes des conditions environnementales naturelles. En effet, plusieurs études décrivent des densités inférieures chez les populations naturelles, notamment en Afrique de l'Est, de l'ordre de 0,13 larve/cm² (Gimnig *et al.*, 2002).

Dans cette étude, le protocole mis en place n'a pas permis de mesurer la quantité de sang ingéré par les moustiques. Or il s'agit d'un paramètre important qui peut également influencer les résultats d'infection. En effet, plusieurs études ont démontré une corrélation entre la taille du moustique, la quantité de sang ingéré, la prévalence et l'intensité de l'infection en ce sens que les plus gros ingèrent davantage de sang à chaque repas et développent donc plus de parasites (Robert and Boudin, 2002). Cependant, nous posons l'hypothèse que ce paramètre a peu influencé nos données car nous avons gardé uniquement les femelles complètement gorgées et nous avons contrôlé par la taille des femelles.

Nous avons aussi analysé l'effet des interactions compétitives entre les souches sensibles (Kisumu), et résistantes (KdrKis), afin de mieux cerner le rôle de l'allèle « *kdr* » sur la transmission de *P. falciparum*. Il s'agissait pour nous d'étudier l'effet de la compétition larvaire pour l'exploitation des ressources alimentaires entre les souches sensibles et résistantes. La simple exploitation d'une ressource par les individus d'une souche conduit à la réduction de sa disponibilité pour les autres concurrents. La limitation en ressources alimentaires du milieu de développement larvaire induit une limitation des réserves énergétiques chez l'adulte (Briegel, 2003) et peut par conséquent, avoir un impact indirect sur la compétence vectorielle. En effet, une compétition en faveur de l'une ou de l'autre souche pourrait entraîner une modification de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de défense. L'étude des interactions biotiques auxquelles les systèmes vectoriels sont exposés

est relativement importante afin d'appréhender leur potentiel épidémiologique en fonction des contextes environnementaux. Les conséquences de ces interactions compétitives jouent un rôle non négligeable en matière de santé publique. Elles peuvent, par exemple, avoir une influence sur l'épidémiologie des maladies vectorielles en modulant les traits d'histoire de vie des moustiques responsables de la transmission.

Dans notre cas, on a observé que la proportion de moustiques infectés a été modulée par l'interaction « génotype*compétition ». Ce résultat indique que la différence de prévalence de l'infection entre souches est dépendante de la compétition.

Il est possible que notre protocole expérimental n'ait pas assez généré de compétition. Afin de la simuler davantage, il aurait peut-être fallu utiliser différents degrés de compétition, en introduisant, pour une souche donnée, l'autre souche à des pourcentages croissants. Aussi, nous avons utilisé une quantité de nourriture fixe sur les différentes densités, pour également stimuler la compétition. Faire varier la quantité de nourriture sur une densité larvaire fixe aurait éventuellement pu mettre en évidence un effet compétition plus fort.

Ces mêmes hypothèses peuvent expliquer l'absence d'effet significatif génotype* taille. Ce résultat semble indiquer que la taille n'influence ni la proportion de moustiques infectés, ni l'intensité de l'infection au niveau des deux souches. Plusieurs auteurs ont pourtant montré que la disponibilité des ressources alimentaires dans les gîtes larvaires détermine le nombre d'adultes émergents, la survie (Gimnig *et al.*, 2002) et la taille et influencent donc probablement la compétence vectorielle.

Dans un contexte où la prévalence des souches PYT/DDT résistantes s'accroît, il est plus qu'important d'en estimer l'impact sur la transmission de plasmodium. L'effet génotype étroitement lié aux conditions environnementales que nous avons observé confirme le fait que la connaissance de la bio-écologie de ces « nouvelles » souches demeure un impératif pour la lutte antivectorielle composante essentielle de la lutte contre le paludisme. Ainsi le contrôle de cette maladie devrait intégrer toute modification susceptible d'influer la transmission du parasite. La compréhension des caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques associées à cette résistance, permettra la mise en place de meilleures stratégies d'utilisation des insecticides chimiques dont on sait que l'usage abusif conduira inévitablement à de nouveaux échecs. La gestion de la résistance en sera peut être améliorée.

6. Conclusion et perspectives

Notre étude est une contribution à la connaissance du rôle de l'allèle de résistance « *kdr* » dans la transmission de *P. falciparum* malgré les limites soulignées de notre protocole. En utilisant un système d'infections expérimentales sur les souches Kisumu et KdrKis on a pu mettre en évidence un coût associé à l'allèle de résistance sur la proportion de moustiques infectés à *P. falciparum*. Mais cet effet du génotype a été influencé par des facteurs biologiques (gamétocytémie) et écologiques (densité larvaire, compétition larvaire). La gamétocytémie a influencé différemment la prévalence et l'intensité de l'infection au niveau de chaque souche. En fonction de la densité larvaire ou de la présence de compétitions on a observé un effet différent du génotype sur la proportion de moustiques infectés.

Le lien étroit entre l'effet génotype et les conditions écologiques laisse penser que les conditions environnementales jouent un rôle important dans la modulation des traits d'histoire de vie de ces vecteurs du paludisme. Des études complémentaires devront ainsi être menées pour évaluer le coût de cet allèle sur les traits d'histoire de vie et indirectement, sur la compétence vectorielle. Ainsi on pourrait étayer davantage les résultats auxquels nous sommes parvenus. Dans l'optique d'une meilleure gestion de la résistance, il s'avère également intéressant de mener d'autres investigations pour estimer le rôle d'autres mécanismes de résistance en association avec l'allèle « *kdr* » sur la bio-écologie des vecteurs du paludisme.

7. Références Bibliographiques

1. ALOUT, H. (2009) Evolution de la résistance aux insecticides au locus ace-1 chez les moustiques. *Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences, Environnement*. Thèse doctorat UNIVERSITE MONTPELLIER II, pp. 10-12.
2. BARRERA, R. (1996) Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecol Entomol* 21: 117-127
3. BAYOH, M. N. & LINDSAY, S. W. (2003) Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Bul. Ent. Res.* 93: 375-381.
4. BERTICAT, C., DURON, O., HEYSE, D. & RAYMOND, M. (2004) Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genet Res*, 83: 189-196.
5. BERTICAT, C., ROUSSET, F., RAYMOND, M., BERTHOMIEU, A. & WEILL, M. (2002) High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes *Proc Biol Sci*, 269:1413-1416.
6. BOURGUET, D., GUILLEMAUD, T., CHEVILLON, C. & RAYMOND, M. (2004) Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, 58:128-135.
7. BRIEGEL, H. (2003) Physiological bases of mosquito ecology. *J. Vector Ecol*, 28: 1-11.
8. CARNEVALE, P., ROBERT, V., MANGUIN, S., CORBEL, V., FONTENILLE, D., GARROS, C. & ROGIER, C. (2009) Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD Editions, collection didactiques. Marseille, 2009, pp.16, 18, 24.
9. CHANDRE, F., DARRIET, F., DUCHON, S., FINOT, L., MANGUIN, S., CARNEVALE, P., GUILLET, P. (2000) Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol* 14:81-88.
10. CHANDRE, F., MANGUIN, S., BRENGUES, C., DOSSOU, Y., J., DARRIET, D., DIABATE, B., CARNEVALE, P. & GUILLET, P. (1999) Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* 41:319-22.

11. CLEMENTS (1992a) Development, nutrition and reproduction. *New York: Chapman & Hall.* London.
12. COETZEE, M., HUNT, R. H., WILKERSON, R., DELLA TORRE, A., COULIBALY, M. B., NORA, J. & BESANSKY, N. J. (2013) *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *ZOOTAXA*, 0: 1-29.
13. COLUZZI, M., PETRARCA, V. & DI DECO, M. A. (1985) Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bollettino Di Zoologia* 52:45-63.
14. CORBEL, V., RAYMOND, M., CHANDRE, F., DARRIET, F., HOUGARD, J. M. (2004a) Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates. *Pest Manag Sci* 60: 375-80.
15. COSTANTINI, C., AYALA, D., GUELBEOGO, W., POMBI, M., SOME, C., BASSOLE, I., OSE, K., FOTSING, J.-M., SAGNON, N. F., FONTENILLE, D., BESANSKY, N. & SIMARD, F. (2009) Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecology* 9:16.
16. DABIRÉ, K. R., DIABATÉ, A., NAMOUNTOUGOU, M., DJOGBENOU, L., WONDJI, C., F. CHANDRE, SIMARD, F., OUÉDRAOGO, J.-B., MARTIN, T., WEILL, M. & BALDET, T. (2012) Trends in Insecticide Resistance in Natural Populations of Malaria Vectors in Burkina Faso, West Africa: 10 Years' Surveys. *Pest Engineering*.
17. DARRIET, F., THO VIEN, N., ROBERT, V. & CARNEVALE, P. (1984) In: Evaluation of the efficacy of permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vectors of malaria. *WHO*, p 20.
18. DAY, J. F., EBERT, K. M. & EDMAN, J. D. (1983) Feeding patterns of mosquitoes (Diptera : *culicidae*) simultaneously exposed to malarious and healthy mice, including a method for separating blood meals from conspecific hosts *J. Med. Entomol* 20 :120-127.
19. DELLA TORRE, A., COSTANTINI, C., BESANSKY, N. J., CACCONE, A., PETRARCA, V., POWELL, J. R. & COLUZZI, M (2002) Speciation within *Anopheles gambiae*: the glass is half full. *Science* 298:115-117.

20. DELLA TORRE, A., FANELLO, C., AKOGBETO, M., DOSSOU-YOVO, J., FAVIA, G., PETRARCA, V. & COLUZZI, M. (2001) Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 10:9-18.
21. DIABATÉ, A. (1999) Evaluation de la résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrethrinoides au Burkina Faso. Université de Ouagadougou. Thèse de 3^e cycle. pp-29.
22. DIABATE.A., BALDE. T., CHANDRE. F., DABIRE. K, R., KENGNE. P., GUIGUEMDE.T, R., SIMARD. F., GUILLET. P., HEMINGWAY .J., AND HOUGARD JEAN MARC (2003) KDR Mutation, a Genetic Marker to Assess Events of Introgression Between the Molecular M and S Forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the Tropical Savannah Area of West Africa. *J. Med. Entomol.* 40(2): 195-198 (2003).
23. DJOGBÉNOU, L., NOE.V & AGNEW.P (2010) Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar J*, 9(12):83-8.
24. DJOGBENOU, L. S. (2008) Dynamique des mécanismes de résistance aux insecticides liés à la modification de cibles dans les populations naturelles d'*Anopheles gambiae* s.l. d'Afrique de l'Ouest. Thèse doctorat UNIVERSITE MONTPELLIER II pp 12.
25. DJOUAKA. R, F., BAKARE. A, A., COULIBALY. O, N., AKOGBETO. M, C., RANSON. H, J, H. & STRODE. C (2008) Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 2008 9:538.
26. DONG, Y., AGUILAR, R., XI, Z., WARR, E., MONGIN, E. & DIMOPOULOS, G. (2006) *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog*, 2(6):e52.
27. EICHNER, M., DIEBNER, H. H., MOLINEAUX, L., COLLINS, W. E., JEFFERY, G. M. & ., D. (2001) Geneis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malaria therapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 497-501.
28. FAVIA, G., LANFRANCOTTI, A., SPANOS, L., SIDEN-KIAMOS, I. & LOUIS, C. (2001) Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms

- discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 10:19-23.
29. FÉLIX, R. C., MÜLLER, P., RIBEIRO, V., RANSON, H. & H., S. (2010) *Plasmodium* infection alters *Anopheles gambiae* detoxification gene expression. *BMC Genomics* 11:312.
 30. FENZ, Z., HOFFMANN, N. R., NUSSENZWEIG, R. S., TSUJI, M., FUJIOKA, H., LENSEN, T., PONNUDURAI, T. & C., P. L. (1993) Pfs 2400 can mediate antibody dependent malaria transmission inhibition and may be the Pfl1.1 gene product *J. Exp. Med* 177:273-281.
 31. FERNANDES, L. & BRIEGEL, H. (2005) Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol*, 30:11-26.
 32. FIGTREE, M., LEE, R., BAIN, L., KENNEDY, T., MACKERTICH, S., URBAN, M., CHENG, Q., HUDSON, B. & (2010) *Plasmodium knowlesi* in Human, Indonesian Borneo. *Emerg Infect Dis*, 16(4) 672-4.
 33. FONTENILLE, D. & SIMARD, F. (2004) Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vectors populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27:357-375.
 34. FOURNIER, D. & MUTERO, A. (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol* 108C:19-31
 35. GARNHAM, P. (1966) Malaria Parasites and other haemosporidia. *Blackwell Scientific publications*, pp1114.
 36. GIMNIG, J. E., OMBOK. M, OTIENO. S, KAUFMAN.M, G., VULULE. J, M. & WALKER.E, D. (2002) Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera : *Culicidae*) larvae in artificial habitats. *J Med Entomol* 39:162-172.
 37. GOUAGNA, L. C., BANCONE, G., YAO, F., YAMEOGO, B., DABIRÉ, K. R., COSTANTINI, C., SIMPORÉ, J., OUEDRAOGO, J. B. & MODIANO, D. (2010) Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nature genetics*.
 38. GOUAGNA, L. C., FERGUSON, H. M., OKECH, B. A., KILLEN, G. F., BEIER, J. C., GITHURE, J. I. (2004) *Plasmodium falciparum* disease manifestations in human and transmission to *Anopheles gambiae*: A field study in Western Kenya. *Parasitology* 128:235-243.
 39. GRAVES, P. M., BURKOT, T. R., CARTER, R., CATTANI, J. A., LAGOG, M., PARKER, J., BRABIN, B. J., GIBSON, F. D., BRADLEY, D. J. & Alpers, M. P.,

- (1988) Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area Papua, New Guinea. *Parasitology* 96:251-263.
40. GUILLET, P., ALNWICK, D., CHAM, M. K., NEIRA, M., ZAIM, M., HEYMANN, D. & MUKELABAI, K. (2001) Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. *Bull World Health Organ*, 79:998.
41. HARBACH, R. E. (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*, 94: 537-553.
42. HARGREAVES, K., KOEKEMOER, L. L., BROOKE, B. D., HUNT, R., H., MTHEMBU, J. & COETZEE, M. (2000) *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* 14:181-189.
43. HEMINGWAY, J., HAWKES, N. J., MCCARROLL, L. & RANSON, H. (2004) the molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-65.
44. HOGH, B., GAMAGE-MENDIS, A., BUTCHER, G. A., THOMPSON, R., BEGTRUP, K., MENDIS, C., ENOSSE, S. M., DGEDGE, M., BARRETO, J., ELING, W. & SINDEN., R. (1998) The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *Am J Trop Med Hyg* 58:176 - 182.
45. HUN, R. H., COETZEE, M. & FETTENE, M. (1998) The *Anopheles gambiae* complex: a new species from ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 231-235.
46. HURD, H. & CARTER, V. (2004) The role of programmed cell death in Plasmodium-mosquito interactions. *Int J Parasitol*, 34(13-14):1459-72.
47. KLASSEN, W. (2009) Introduction: development of the sterile insect technique for African malaria vectors. *Malar J*, 8 (Suppl 2):I1, doi: 101186/1475-2875-8-S2-I1.
48. KOENRAADT, C. J. M., MAJAMBERE, S., HEMERIK, L., TAKKEN, W. & (2004) The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae* sl. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 112:125-134.
49. LENGELER, C. (2004) Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Databas Syst Rev*: CD000363.
50. LOWRIE, R. C. (1973) Effect of Competition between Larvae of *Aedes albopictus* Skuse and *A. polynesiensis* Marks. *J Med Entomol* 10:23-30.

51. MARTINEZ TORREZ, D., CHANDRE, F., WILLIAMSON, M. S., DARRIET, F., BERGE, J. B., DEVONSHIRE, A. L., GUILLET, P., PASTEUR, N. & PAURON, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7: 179-184.
52. MENDES, A. M., SCHLEGELMILCH, T., COHUET, A., AWONO-AMBENE, P., DE IORIO, M., FONTENILLE, D., MORLAIS, I., CHRISTOPHIDES, G. K., KAFATOS, F. C. & VLACHOU, D. (2008) Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. *PLoS Pathog*, 4(5): e1000069.
53. MORLAIS, I., PONÇON, N., SIMARD, F., COHUET, A., FONTENILLE, D. & (2004) Intraspecific nucleotide variation in *Anopheles gambiae*: new insights into the biology of malaria vectors. *Am J Trop Med Hyg* 71 (6):795-802.
54. MOUCHES, C., MAGNIN, M., BERGE, J. B., DE SILVESTRIL, M., BEYSSAT, V., PASTEUR, N. & GEORGHIOU, G. P. (1987) Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2113-6.
55. MOUCHET, J., CARNEVALE, P., COOSEMANS, M., JULVEZ, J., MANGUIN, S., RICHARD-LENOBLE, D. & SIRCOULON, J. (2004) Biodiversité du paludisme dans le monde. *John Libbey Eurotext ed.*
56. N'GUESSAN, R., CORBEL, V., AKOGBETO, M. & ROWLAND, M. (2007) Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis* 2007, 13(2):199-206.
57. NAUEN, R. (2006) Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Management Sciences* 62:690–692.
58. OMS (2011) Rapport 2010 sur le paludisme dans le monde. Organisation Mondiale de la Santé, 2010.
59. OMS (2012) Rapport 2012 sur le paludisme dans le monde. Organisation Mondiale de la Santé.
60. PAAIJMANS, K., HUIJBEN, S., GITHEKO, A., & W., T. (2009) Competitive interactions between larvae of the malaria mosquitoes *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* under semi-field conditions in western Kenya. *Acta Tropica* 109:124-130.

61. PAURON, D., BARHANIN, J., AMICHOT, M., PRALAVORIO, M., BERGÉ, J. B. & LAZDUNSKI, M. (1989) Pyrethroid receptor in insect Na⁺channel: alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies. *Biochemistry* 28:1673-167.
62. PIMENTA, P. F., TOURAY, M. & MILLER, L. (1994) The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot Microbiol*, 41(6), 608-24.
63. RIVERO, A., VÉZILIER, J., WEILL, M., READ, A. F. & GANDON, S. (2010) Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* 6.
64. ROBERT, V. & BOUDIN, C. (2002) Biologie de la transmission homme-moustique du Plasmodium. *Bull Soc Pathol Exot* 96(1):6-20.
65. ROBERT, V., TCHUIKAM, T., MULDER, B., BODO, J. M., VERHAVE, J. P., CARNEVALE, P. & NAGEL, R. L. (1996b) Effect of sickle cell trait status of gametocyte carriers of *Plasmodium falciparum* on infectivity to anopheline. *Am J Trop Med Hyg* 54:111-113.
66. SANGARE, I., MICHALAKIS, Y., YAMEOGO, B., DABIRE, R., MORLAIS, I. & ANNA COHUET (2013) Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malar J* 12:2.
67. SIMARD, F., AYALA, D., KAMDEM, G., POMBI, M., ETOUNA, J., OSE, K., FOTSING, J.-M., FONTENILLE, D., BESANSKY, N. & COSTANTINI, C. (2009) Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecology* 9:17.
68. SINDEN, R. E. (1998) Gametocytes and sexual development. In: S HERMAN Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection IW (Ed). *American Society for Microbiology Press, Washington DC* pp. 25-48.
69. SINDEN, R. E. (2002) Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cellular Microbiology*, 4(11):713-724.
70. SMALLEY, M. E. & BROWN, J. (1981) *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg* 75:316-317.
71. SNOW, R. W., BRADLEY, A. K., HAYES, R., BYASS, P. & GREENWOOD, B. M. (1987) Does woodsmoke protect against malaria? *Ann Trop Med Parasitol* 81: 449-51.

72. SODERLUND, D. M. & BLOOMQUIST, J. R. (1989) Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides *Annu. Rev. Entomol*, 34:77-96.
73. TCHUIKAM, T., MULDER, B., DECHERING, K., STOFFELS, H., VERHAVE, J. P., COT, M., CARNEVALE, P., MEUWISSEN, J. H. & ROBERT, V. (1993) Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop.Med.Parasitol* 44:271-276.
74. TENG, H. J. & APPERSON, C. S. (2000) Development and survival of immature *Aedes albopictus* and *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) in the laboratory: Effects of density, food, and competition on response to temperature. *J Med Entomol* 37:40-52.
75. UNIVERSITÉ MÉDICALE VIRTUELLE FRANCOPHONE (2010-2011) Paludisme. Support de Cours.
76. VAUGHAN, A. & HEMINGWAY, J. (1995) Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem* 270:17044-17049.
77. VAUGHAN, J. A. (2007) Population dynamics of *Plasmodium* sporogony. *Trends Parasitol*, 23(2):63-70.
78. VLACHOU, D., ZIMMERMANN, T., CANTERA, R., JANSE, C. J., WATERS, A. P. & KAFATOS, F. C. (2004) Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol*, 6(7):671-685.
79. WEILL, M., DURON, O., LABBÉ, P., ARNAUD, B., BERTHOMIEU & RAYMOND, E. M. (2003) La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides Molecular clues to the insecticide resistance of mosquitoes. *M/S: médecine sciences.*, Volume 19(12):1190-1192.
80. WHITE, G. B. (1974) *Anopheles gambiae* Complex and Disease Transmission in Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg*, 68:278-302.

8. ANNEXES

ANNEXE 1 : Extraction d'ADN au CTAB, sur moustique entier

Isabelle MORLAIS, 2003

- 1- Broyer chaque moustique dans 200 ml de CTAB 2%
- 2- Mettre au Bain-marie 65° pendant 5 minutes
- 3- Ajouter 200 ml de chloroforme – Mélanger par inversion.
- 4- Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm, à TA
- 5- Prélever la phase supérieure et la mettre dans un autre tube
- 6- Ajouter 200 ml d'Isopropanol sur ce surnageant – Bien mélanger par inversion
- 7- Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm et TA
- 8- Vider l'Isopropanol, bien égoutter et ajouter 200 ml d'Ethanol 70%
- 9- Centrifuger 5 minutes, 12 000, TA
- 10- Vider l'Ethanol
- 11- Sécher le culot 5 minutes maximum au speed-vac
- 12- Reprendre dans 20 ml d'H₂O – Ne pas vortexer – Laisser suspendre sur la paille toute la nuit (ou une 1/2 journée)

CTAB 2%

| Réactifs | Volume | Conc. finale |
|---------------------|---------|--------------|
| 1 M Tris HCl pH 8.0 | 100 ml | 100 mM |
| 0.5 M EDTA | 20 ml | 10 mM |
| NaCl | 81.8 g | 1.4 M |
| CTAB* | 20 g | 2 % |
| ddH ₂ O | QSP 1 L | |

*Cetyl trimethyl ammonium bromide
Mélanger sous agitateur magnétique.
Conserver à TA.

ANNEXE 2

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

Kdr : phénotype « Knockdown resistance »

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

Amorces

D1 ATAGATTCCTCCGACCA'G
D2 AGACAAGGATGATGAACC
D3 AATTTGCATTACTTACGACA
D4 CTGTAGTGATAGGAAATTTA

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

| Réactifs | Conc. finale | pour 1 rxs à 25 µl |
|--|------------------|--------------------|
| Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂ | 1X ; 1,5 Mm each | 2.5 µl |
| 5 mM dNTP | 0.2 mM each | 1 µl |
| Primer D1 (10 µM) | 6 pmoles | 0,6 µl |
| Primer D2 (10 µM) | 6 pmoles | 0,6 µl |
| Primer D3 (10 µM) | 20 pmoles | 2 µl |
| Primer D4 (10 µM) | 20 pmoles | 2 µl |
| Taq DNA Polym (5 U/µl) | 0.25 U | 0,05 |
| ddH ₂ O | | 14,75 µl |
| DNA template (1 à 5 ng/µl) | | 1.5 µl |

Amplification :

3' [30", 30", 10"]35c 5' @ 55°C

Taille attendue

D1/D2 : 293 bp

D1/D3 : 195 bp **Résistant**

D2/D4 : 137 bp **Sensible**

