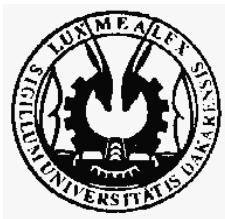


UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
Faculté des Sciences et Techniques



THESE DE DOCTORAT D'ETAT

OPTION : BIOLOGIE-ECOLOGIE ANIMALE
SPECIALITE : ENTOMOLOGIE MEDICALE

Pour obtenir le grade de *Docteur ès Sciences*

Présentée par

DABIRE Kounbobr Roch

Sujet de la thèse :

**LE PALUDISME DANS LES SAVANES AFRICAINES: BIO-ECOLOGIE;
TRANSMISSION ET RESISTANCE DES VECTEURS AUX INSECTICIDES AU
BURKINA FASO (AFRIQUE DE L'OUEST)**

Date prévisionnelle de soutenance **le 24 Mai 2008**

Jury prévisionnel:

Bhen Sikina Toguebaye, Professeur Fac Sciences UCAD,	Président
Ousmane Faye, UCAD, Professeur, Fac Sciences, UCAD,	Directeur de thèse
Robert T. Guiguemdé, Professeur, Fac Médecine, UPB	Examineur
Omar Gaye, Professeur, Faculté de Médecine, UCAD	Examineur
Jean-Marc Hougard, Directeur de Recherche, IRD	Examineur
Ngor Faye, Maître de Conférence, Fac Sciences, UCAD	Examineur
Thierry Baldet, Chargé de Recherche, CIRAD/IRD,	Rapporteur

AVANT-PROPOS

Ce travail est la synthèse de plusieurs années de travaux entièrement réalisés au Laboratoire de Parasitologie-Entomologie du Centre Muraz/IRSS entre 2000 et 2006. C'est le fruit d'une collaboration et d'un partenariat soutenus entre plusieurs équipes avec l'apport financier du Programme Pal+ du Ministère français de la Recherche, du Multilateral Initiative on Malaria (MIM) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), du Centers for Disease Control and Prevention CDC à Atlanta (USA), de l'Institut français de Recherche pour le développement (IRD) et des Ministères de la Santé et de la Recherche Scientifique du Burkina Faso que je tiens à remercier.

Je remercie la Direction du Centre Muraz notamment le Directeur Général, Dr Serge Diabougou qui a mis à ma disposition les moyens techniques et logistiques pour la conduite des activités de recherche.

Je remercie vivement le Professeur Guiguemdé T. Robert, responsable de l'Unité de Parasitologie-Entomologie pour m'avoir d'office accepté et accordé sa confiance qui a contribué à mon intégration totale dans son équipe. Toute ma motivation tire sa source dans vos qualités exceptionnelles de scientifique cherchant le résultat dans la rigueur et le respect du plus petit. Cette considération du plus petit a semé la bonne ambiance qui a régné durant toutes ces années de travail dans votre équipe.

Au Professeur Jean-Bosco Ouédraogo, Directeur Régional de l'IRSS, j'adresse mes sincères remerciements pour avoir facilité mon affectation à la Direction Régionale de l'Ouest. Cette affectation à l'IRSS a été le début de ma mutation en entomologiste médical, moi qui étais arrivé dans vos locaux drapé de Nématologie. Trouvez en ce travail le fruit de la collaboration entre les deux instituts Centre Muraz et IRSS, exemple de collaboration et de vision pour l'avenir scientifique d'un pays, le Burkina Faso!

A Thierry Baldet, actuellement entomologiste médical au CIRAD, Montpellier. Tu as sans doute été le précurseur de ce travail que tu as animé avec sincérité et amitié. Plus qu'un ami, tu m'as montré des signes forts de fraternité et tu as voulu me laisser là où tu étais avant de partir pour le CIRAD. C'est avec un grand enthousiasme que je te témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir accordé toute ta confiance et intégré dans le pool

d'entomologistes du Centre Muraz. Ce sentiment de sincérité et de confiance a voulu que j'aie de l'avant. Puisse ce modeste travail traduire toute notre amitié et nous relancer sur d'autres voies de collaboration.

A Abdoulaye Diabaté, entomologiste médical à IRSS/Centre Muraz, actuellement postdoctorant au NIH/USA. Tu es celui qui a sans doute jeté les bases scientifiques de ma mutation en entomologiste et surtout qui a donné l'exemple de la collaboration saine. Avec toi j'ai appris la sincérité et le goût du travail en équipe. Je te remercie de tout cœur pour cette fraternité et cette symbiose dans le travail.

A MM Jean-Marc Hougard et Didier Fontenille, ancien et actuel directeurs de l'UR016 de l'IRD. Vous avez su poser les bases d'une active collaboration entre l'UR016/IRD et notre équipe. Ce travail est l'un des fruits de notre collaboration. Je vous remercie pour tous les efforts personnels et les moyens mis par moments à ma disposition pour la réalisation de certaines activités dans vos laboratoires au LIN/Montpellier et au CREC à Cotonou. Mes remerciements vont particulièrement au Dr Jean-Marc dont la plupart des travaux sur la résistance a été réalisée en collaboration avec son équipe. Toute ma gratitude pour avoir consacré beaucoup de votre temps pour la correction de travail.

A Ousmane Faye, Professeur, entomologiste médical au Département de Biologie animale à l'UCAD. Vous m'avez vivement encouragé à poursuivre une thèse d'état. Malgré vos multiples tâches au poste d'entomologiste médical à l'OMS, vous avez toujours su garder un contact permanent avec moi ce qui a favorisé mon engagement dans ce travail. Travailler avec vous signifie rester en famille, travailler avec un grand frère que je connais depuis plus d'une décennie. Ce cadre fraternel a su m'inspirer et me redonner confiance dans les moments douteux. Veuillez trouver toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Au Professeur Bhen Sikina Toguebaye. Merci d'avoir facilité mon inscription en thèse d'état. Malgré vos occupations multiples vous avez accepté de lire ce travail et de présider le jury qui va juger ce travail. Je vous exprime toute ma reconnaissance.

A Mr Ngor Faye, Maître de Conférences à la Faculté de Sciences (UCAD). Merci de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et d'avoir accepté de participer au jury. Veuillez trouver toute ma reconnaissance.

A Mme Paré-Toé Léa. Ton assistance, tes conseils et tes encouragements au quotidien dans la gestion des activités et la bonne marche du laboratoire ont été d'un apport essentiel dans la finalisation de ce travail. Je te témoigne toute ma reconnaissance.

A MM Pierre Kengne, Frédéric Simard, Carlo Costantini, Clément Gouagna, chercheurs à l'IRD. Les discussions et échanges scientifiques que nous avons eus tout au long de ces cinq années ont permis d'améliorer la qualité de ce document à travers certains articles proposés. Mes remerciements vont particulièrement à Pierre Kengne qui s'est investi pleinement dans ce travail. Je lui traduis toute ma reconnaissance.

A Ouari Ali, Guel Hyacinthe, Ouattara Abdoulaye, Zoungrana Sougrinoma, Sanou Mamourou, Ouédraogo Ali, Kabéro Tahirou, Millogo Niama, Sanou Souleymane, Ilboudo Séni, Tamboula Souleymane. Votre participation active à la réalisation des travaux de terrain et à certaines analyses de laboratoire ont constitué un pilier à la réalisation de cette œuvre. Veuillez trouver toute l'expression de ma reconnaissance.

A tous mes collègues et aînés du laboratoire, Tinto Halidou, Traoré Maminata, Drabo Maxime, Valéa Innocent, Zéba Augustin, Zékiba Tarnada, Zongo Issiaka, Sorgho Herman, Diallo Hama, El hadj Tamboula, Major Bakary, Odile Zampa, Louis Sanou et Traoré Natogoma Brigitte. Pour toute la bonne ambiance et ces moments merveilleux passés ensemble.

A tous les collègues de la thématique VIH/Tuberculose pour avoir mis à notre disposition votre plateau technique.

Je remercie de vive voix tous les ressortissants de la Vallée du Kou et de Soumousso pour leur collaboration sans faille dans le déroulement des activités de terrain. Au jour d'aujourd'hui, on pourrait croire qu ces deux sites sont une extension de notre laboratoire.

A toute ma famille, mes frères et sœurs. A tous, je dis merci

Enfin tous ceux de près ou de loin qui ont participé à ce travail. Veuillez trouver toute ma profonde gratitude.

« C'est dans la précipitation que ma mère est morte »
a dit le caméléon, pour justifier son rythme lent et
assurant !

Proverbe dagara

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1: PRESENTATION DE L'ETUDE - MATERIELS ET METHODES	6
1.1. Cadre de l'étude	6
1.1.1. Le climat	8
1.1.2. La végétation	10
1.1.3. Les pratiques agricoles	10
1.2. Sites d'étude	13
1.3. Méthodes d'échantillonnage des anophèles	13
1.3.1. Capture sur appât humain	13
1.3.2. Capture par les pièges CDC	14
1.3.3. Capture à l'aide de filet	15
1.3.4. Capture par pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des maisons	15
1.3.5. Capture à l'aide d'un aspirateur manuel (ou électrique)	16
1.3.6. Collecte des larves	16
1.4. Identifications morphologique, moléculaire et cytogénétique	18
1.5. Taux d'infection et origine du repas de sang des femelles	20
1.6. Bio-essais et caractérisation moléculaire des gènes de résistance	22
CHAPITRE 2: BIO-ECOLOGIE DES VECTEURS DU PALUDISME	25
2.1. Le complexe <i>Anopheles gambiae</i>	26
2.2. Le cycle de développement des anophèles	31
2.3. De la barrière génétique entre les deux formes moléculaires M et S	33
2.3.1. Hypothèse d'isolement reproductif pré-copulatoire	35
2.3.2. Hypothèse d'isolement reproductif post-copulatoire	37
2.4. Le groupe <i>funestus</i>	38
2.4.1. Distribution des espèces du groupe <i>funestus</i>	39
2.4.2. Distribution des formes chromosomiques Kiribina et Folonzo	41
2.5. Les autres vecteurs	44
2.6. La distribution des vecteurs au Burkina Faso	45

CHAPITRE 3: LA TRANSMISSION DU PALUDISME	50
3.1. Les <i>Plasmodium</i>	50
3.2. Les cycles de développement du <i>Plasmodium</i>	52
3.3. La mesure de la transmission	55
3.4. La typologie du paludisme - Les stratifications de la transmission	58
3.4.1. Notion de faciès épidémiologiques primaires	58
3.4.2. Quelques exemples de transmission	62
<i>Faciès équatorial</i>	62
<i>Faciès tropical</i>	64
- Cas des savanes humides à l'Ouest du Burkina Faso	65
<i>Faciès sahélien</i>	67
- Cas du sahel Burkinabé: Dori	69
3.4.3. Faciès épidémiologiques secondaires ou locaux	70
<i>En milieu rizicole</i>	71
- Cas de la plaine rizicole de la Vallée du Kou au Burkina Faso	76
<i>En milieu urbain</i>	76
- Cas de la ville de Ouagadougou au Burkina Faso	83
CHAPITRE 4: LA RESISTANCE DES VECTEURS AUX INSECTICIDES - CONSEQUENCES SUR LES STRATEGIES DE LUTTE ANTIVECTORIELLE	88
4.1. Historique de la lutte contre le paludisme	88
4.2. La lutte antivectorielle	91
4.2.1. La lutte anti-larvaire	92
4.2.2. La lutte contre les stades adultes et les méthodes de protection	94
4.3. Les Moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII)	98
4.4. Les insecticides utilisés	99
4.4.1. Les organochlorés	99
4.4.2. Les organophosphorés	100
4.4.3. Les carbamates	101
4.4.4. Les pyréthriinoïdes	101
4.4.5. Autres insecticides	102
<i>Les régulateurs de croissance</i>	102
<i>Les bio-larvicides</i>	102
<i>Les répulsifs</i>	103

4.5. Les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides	103
4.5.1. La résistance métabolique	103
4.5.2. La résistance par modification de la cible	104
<i>L'acétylcholinestérase (AChE)</i>	105
<i>Le canal sodium dépendant (CNaVdp) et les mutations kdr</i>	105
4.5.3. Les mécanismes secondaires de la résistance	106
4.6. La résistance des vecteurs aux insecticides en Afrique	107
4.6.1. La résistance aux pyréthrinoïdes	107
<i>En Afrique de l'Ouest</i>	107
<i>En Afrique Centrale, de l'Est et du Sud</i>	110
4.6.2. La résistance aux carbamates et aux organophosphorés	114
4.7. La résistance des vecteurs aux insecticides au Burkina Faso	116
4.8. Quelques perspectives de lutte	123
4.8.1. Les LLINs et les nouvelles combinaisons d'insecticides	123
- Efficacité des LLINs au Burkina Faso	124
4.8.2. Les ITPS	125
- Efficacité des ITPS au Burkina Faso	125
4.8.3. La lutte génétique	128
- Utilisation des éléments transposables au Burkina Faso	130
CONCLUSION	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139
ANNEXES	160
SELECTION D'ARTICLES	169

SELECTION D'ARTICLES

1. Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccoloni D., Duchemin J-B., Rajaonarivelo V., **Dabiré K. R.**, Adja-Akré M., Ceainu C., Le Goff G., Simard F. (2003). Systématique et biologie des Anophèles vecteurs de *Plasmodium* en Afrique, données récentes. *Rev. Med. Trop.*, 63: 247-253.
2. Diabaté A., Brengues C., Baldet, T., **Dabiré K.R.**, Hougard J.M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J., Chandre F. (2004). The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop. Med. Int. Health*, 9 (12): 1267-1273.
3. **Dabiré K.R.**, Fournet F. Ouari A., Cussac M, Pierre Meyer (2007). Persistence of larval habitats during dry period in urban areas of Ouagadougou, Burkina Faso. *J. Vect. Ecol.* (soumis).
4. **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Agostinho F., Alves F., Faye O., Manga L., Baldet T. (2008) Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (*kdr*) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 101(2): 119-123.
5. **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Djogbenou L., Baldet T., Ouari A., N'Guessan R., Ouédraogo J.B., Costantini C., Hougard J.M., Chandre F. (2007). Dynamics of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and occurrence of *ace.1* mutation in Vallée de Kou, a rice growing area from Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (soumis).
6. **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Namountougou M., Kengne P., Simard F., Costantini C., Chandre F., Hougard J.M., Baldet T. (2007). Distribution of pyrethroid-DDT cross resistance and high inlands spreading of *kdr* mutation among the M molecular form of *Anopheles gambiae* s.s. from Burkina Faso (West Africa). *Malaria Journal* (soumis).

7. Diabaté A., **Dabiré K.R.**, Kengne P., Brengues C., Ouari A., Simard F., Lehmann T. (2006). Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J. Med. Entomol.*, 43: 480-483.
8. **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Kengne P., Ouari A., Baldet T., Costantini C., Simard F., Fontenille D., Gabriella G. (2008). Seasonal dynamic of swarming and mating events between molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* in sympatric areas from Burkina Faso. *Med.Vet. Entomol* (soumis).
9. Diabaté A., **Dabiré K.R.**, Kim E.H., Dalton R., Millogo N., Baldet T., Simard F., Gimnig J.E., Hawley W.A., Lehmann T. (2005). Larval development of the molecular forms of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae) in Different Habitats: a transplantation experiment. *J. Med. Entomol.*, 42 (4): 548-553.
10. Diabaté A., **Dabiré K.R.**, Heidenberger K., Crawford J., William L., Culler L., Lehmann T., (2008). Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC, Evolutionary Biology* 2008, **8**:5 doi:10.1186/1471-2148-8-5.
11. **Dabiré K.R.**, Baldet T., Diabaté A., Dia I., Costantini C., Cohuet A., Guiguemdé T.R., Fontenille D. (2007). *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticides resistance status and role in malaria transmission. *J. Med. Entomol.*, 44 (6): 990-997.
12. **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Paré-Toé L., Rouamba J., Ouari A., Fontenille D., Baldet T. (2008). Year to year and seasonal variations in vectors bionomics and malaria transmission in a humid savannah village in West Burkina Faso (Lena). *Journal of Vector Ecology*, 33 (1) (sous presse).
13. **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Kengne P., Brengues C., Gouagna L.C., Hougard J.M., Chandre F., Baldet T. (2008). The distribution of insensitive acetylcholinesterase (*ace.1*) in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa). *Acta Tropica* (soumis).

14. Djogbenou L, **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Kengne P., Akogbeto M., Hougard J-M, Chandre F. (2008). Identification and Geographic Distribution of the *Ace.I* Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(2): 298-302.
15. **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Baldet T., Paré L., Guiguemdé T.R., Ouédraogo J.B., Skovmand O. (2006). Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *Anopheles gambiae* s.s. resistance to pyrethroids. *Malaria Journal*, 5-12 doi: 10.1186/1475-2875-5-12.
16. Diabaté A., Chandre F., Rowland M., N'Guessan R., Duchon S., **Dabiré K.R.**, Hougard J.M. (2006). The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors. *Trop. Med. Int. Health*, 5 (11): 597-603.
17. Penetier C., Costantini C., Corbel V., Licciardi S., **Dabiré KR**, Lapied B., Chandre F., Hougard J-M (2008). A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae*. *Emerging Infectious Diseases* (soumis).
18. Esnault C., Boulesteix M., Duchemin J.B., Koffi A., Chandre F., **Dabiré K.R.**, Robert V., Simard F., Fontenille D., Biémont C. (2008). High genetic differentiation between molecular forms of *Anopheles gambiae* in Africa. *PLoS One* 3(4): e1968. doi:10.1371/journal.pone.0001968.

INTRODUCTION

Le paludisme, connu et décrit depuis la fin du 19^e siècle comme maladie parasitaire fébrile à transmission vectorielle, continue de tuer au 21^e siècle. Il est une des principales maladies mortelles touchant chaque année plus de 500 millions d'âmes vivant dans les zones tropicales avec au moins un million de décès annuels dans les zones de transmission endémique (Sachs & Malaney, 2002). L'OMS estime que 90% des décès liés au paludisme surviennent en Afrique subsaharienne où également il tue chaque année, 20% des enfants âgés de moins de 5 ans. Depuis la découverte de la transmission de l'agent pathogène par la femelle d'anophèle en 1898 par Ronald Ross, la lutte contre le paludisme connut des périodes difficiles. Le premier combat contre le paludisme fut dirigé vers l'assainissement de l'environnement qui consista à éliminer les gîtes larvaires, source de développement du moustique. Il a été relayé quelques décennies plus tard par l'utilisation d'extraits de plantes à activités insecticides notamment les extraits des pyrèthres (*Chrysanthemum cinariaefolium*) et surtout par l'utilisation à grande échelle du Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane (DDT) dont les propriétés insecticides ont été découvertes à la faveur de la deuxième guerre mondiale (Muller, 1955). Les succès fulgurants des premières heures enregistrés avec le DDT conduisirent au concept d'éradication totale du vecteur, slogan des grands programmes de lutte contre le paludisme à l'époque (OMS, 1957). Cependant ce concept fut très vite abandonné car si l'éradication totale du vecteur a été réalisée avec succès dans certaines régions en Europe et aux USA, elle connut des échecs dans les savanes tropicales d'Afrique (Cavalié & Mouchet, 1961; Mouchet & Hamon, 1963). Les raisons de cet échec ont été attribuées en partie à l'émergence de la résistance du vecteur au DDT (Choumara *et al.*, 1959, Cavalié & Mouchet, 1961). Mais elles seraient aussi à chercher dans le peu de connaissance sur la biologie et l'écologie des vecteurs ayant conduit à une mise en place de stratégies de lutte inappropriées et aussi et surtout à des ressources humaines quasi-inexistantes (Mouchet *et al.* 2004).

En effet, le succès de la lutte antivectorielle dépend d'une bonne connaissance de la bio-écologie des vecteurs et de la gestion de la résistance des vecteurs aux principaux insecticides utilisés et également comme nous venons de le souligner de moyens humains, techniques et financiers conséquents permettant la mise en place et la pérennisation de programmes opérationnels de lutte. De nos jours, le concept d'éradication complète ayant été abandonné, la stratégie de la lutte antivectorielle, du moins contre les vecteurs du paludisme, vise à réduire le contact homme-vecteur et donc à réduire la transmission du paludisme dans des proportions où il ne constituerait plus un problème de santé publique.

Des vecteurs du paludisme en zone tropicale, surtout en Afrique au Sud du Sahara, le complexe¹ *Anopheles gambiae* a été très tôt révélé renfermant certains des vecteurs les plus efficaces de *Plasmodium falciparum*, pathogène le plus répandu et le plus virulent du paludisme. Il s'agit d'*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*, deux espèces à large distribution géographique et qualifiées de « vecteurs majeurs » (Mouchet *et al.*, 2004). A côté de ces deux vecteurs, *An. funestus* très répandu dans les savanes africaines, joue également un rôle de vecteur majeur dans la transmission du paludisme (Robert *et al.* 1985a; Manga *et al.*, 1997; Dia *et al.*, 2003; Cohuet *et al.*, 2003).

Parmi ces vecteurs majeurs, *An. gambiae* s.s. est le plus anthropophile transmettant le paludisme sous tous les faciès épidémiologiques en Afrique subsaharienne (Fontenille & Lochouart, 1999; Cootzee *et al.* 2000). Très logiquement, il a été l'objet de nombreuses études portant sur sa capacité vectorielle, la structure de ses populations, sa bio-écologie et plus récemment son statut de résistance aux insecticides (Coluzzi *et al.*, 1985; Touré *et al.* 1998, Chandre *et al.*, 1999a&b ; Diabaté *et al.* 2002, 2004b; Tripet *et al.* 2005, 2007).

¹Un complexe d'espèces est un ensemble d'espèces jumelles morphologiquement non différenciables dont l'identification nécessite des techniques cytogénétiques, biochimiques ou moléculaires

Par ailleurs, les activités anthropiques tels que l'urbanisation et les aménagements hydro-agricoles ont changé localement les conditions environnementales contribuant à la transformation du faciès vectoriel. Cette modification de l'environnement par endroits aurait des conséquences sur la densité et la composition spécifique des vecteurs du paludisme qui peuvent se traduire par l'émergence d'espèces jadis reléguées au rang de « vecteurs secondaires » (Carnevale *et al.*, 1999; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2005). De même, dans certaines zones à écologie particulière comme c'est le cas des zones forestières et des terroirs aux abords des grands cours d'eau, l'activité de certains vecteurs secondaires est très soutenue; c'est le cas bien connu d'*An. nili* et d'*An. moucheti* au Cameroun en Afrique Centrale (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Awono *et al.*, 2004).

L'agent pathogène du paludisme a été découvert en 1880 par Lavéran comme étant un protozoaire classé plus tard dans le genre *Plasmodium*. Moins d'une décennie après, il a été démontré que les moustiques du genre *Anopheles* sont les vecteurs de ce protozoaire. A partir de ces deux événements scientifiques majeurs, les grandes lignes épidémiologiques de cette maladie étaient supposées être connues pour permettre la mise en place de grands programmes de lutte. Après de gros efforts déployés dans les années 60 pour stopper le paludisme avec l'utilisation du DDT et de la dieldrine (Hamon *et al.*, 1968), on assista à une période de laisser-aller où véritablement aucun suivi n'a pu suppléer les programmes mis en place avant les indépendances. Un ensemble de difficultés liées à l'absence de dépistage précoce et de traitement rapide de la maladie auquel s'ajoutent la résistance des vecteurs aux insecticides et le changement de l'environnement a favorisé la résurgence du paludisme.

En l'absence de vaccin, le traitement du paludisme a été longtemps basé sur la prise de la chloroquine sans véritables nouveaux traitements de rechange accessibles aux populations. Ceci a conduit à l'émergence de la chimiorésistance liée à la résistance des parasites à la chloroquine.

Dans un contexte d'absence de programme stratégique, la lutte antivectorielle fit cependant quelques progrès avec le lancement de la moustiquaire imprégnée d'insecticide en l'occurrence de pyréthrinoïdes vers la fin des années 80 (Carnevale *et al.*, 1988a). Le rôle principal de cet outil est de réduire le contact homme-vecteur, maillon essentiel de la transmission du paludisme. L'efficacité de la moustiquaire imprégnée d'insecticide avec son double avantage associant barrières physique et chimique fut prouvée au début des années 90 par des études en Gambie et en Tanzanie (d'Alessandro *et al.*, 1995). Mais sa vulgarisation à grande échelle s'est heurtée à de nombreux obstacles (WHO, 2002). En effet, l'accessibilité et le coût de la moustiquaire imprégnée, auxquels il faut associer le problème de la ré-imprégnation ont constitué un frein à son utilisation comme outil générique de lutte contre le paludisme. L'avènement des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action ou Long Lasting Impregnated Nets (LLINs) au cours des années 90 a permis de résoudre les problèmes liés à la ré-imprégnation. Mais l'accessibilité, le coût élevé et l'acceptabilité de ces LLINs par les populations liée à certaines pesanteurs socioculturelles constituent autant d'obstacles quant à leur utilisation à grande échelle. Un important travail d'éducation et de sensibilisation des populations reste donc à faire pour une large vulgarisation de cet outil. Quoique ces moustiquaires imprégnées d'insecticide (classiques ou LLINs) conservent leur efficacité en zones de résistance des vecteurs, une baisse de leur efficacité s'est déjà amorcée dans certains pays (N'Guessan *et al.*, 2007). Dans ce contexte d'émergence de la résistance du vecteur aux insecticides et d'augmentation des densités vectorielles à la faveur de certains changements du milieu notamment les aménagements, la lutte antivectorielle reste toujours complexe. Mais le combat doit continuer vers cette lutte effrénée pour la réduction de la transmission à un niveau où peut-être un jour le paludisme ne sera plus un problème de santé publique.

Dans ce travail, seront abordés trois grands chapitres i) la bio-écologie des vecteurs et le comportement de reproduction du vecteur majeur du paludisme, *An. gambiae* s.s. ii) la transmission du paludisme dans les savanes africaines avec des particularités importantes suivant certaines zones écologiques et enfin iii) la résistance des vecteurs aux insecticides avec les conséquences sur la lutte antivectorielle.

Ces chapitres font la synthèse d'études portant sur la transmission et la lutte contre les vecteurs du paludisme au Burkina Faso étayée par les articles proposés dans la seconde partie, le tout, rattaché au grand contexte du paludisme en Afrique.

Ces travaux réactualisent, à la faveur des progrès de la biologie moléculaire, d'éminents travaux déjà réalisés en la matière au Burkina Faso (Robert, 1989; Costantini *et al.*, 1999; Diabaté, 2003). Enfin à l'ère de la génomique avec le séquençage complet du génome d'*An. gambiae* (Holt *et al.* 2002) et dans un contexte où la résistance des vecteurs aux insecticides se généralise, quelques pistes de recherche sont proposées sur l'écologie génétique et la gestion de la résistance pendant que les débats sur la re-introduction du DDT dans la lutte contre les vecteurs du paludisme refont surface (Rogan & Chen, 2005).

CHAPITRE 1 : PRESENTATION DE L'ETUDE - MATERIELS ET METHODES

La plupart des études présentées dans ce document ont été entièrement réalisées au Burkina Faso ou en partie à partir d'échantillons collectés dans des sites du Burkina Faso (figure 1).



Figure 1: position géographique du Burkina Faso

1.1. Cadre de l'étude

Le Burkina Faso est un pays soudano-sahélien et continental totalement enclavé au cœur de l'Afrique de l'Ouest. Il couvre une superficie de 274 000km². Il est à l'intérieur de la boucle du fleuve Niger entre 10° et 15° de latitude Nord et entre 2° de longitude Est et 5°30' de longitude Ouest. En 2003, sa population était estimée à plus de 12 millions d'habitants inégalement repartis avec une densité maximale dans le plateau central (figure 2). Le Burkina Faso dans son ensemble est un pays plat. L'altitude moyenne ne dépasse pas 400 mètres et la moitié du pays se situe entre 250 et 350 mètres avec quelques variations locales (figure 3). Quoique relativement peu arrosé, le Burkina Faso a un réseau hydrique assez important avec trois grands bassins : bassin de la Volta, de la Comoé et du Niger. Chaque bassin est parsemé de petits cours d'eau permanents à semi permanents qui permettent de maintenir les activités agro-pastorales.

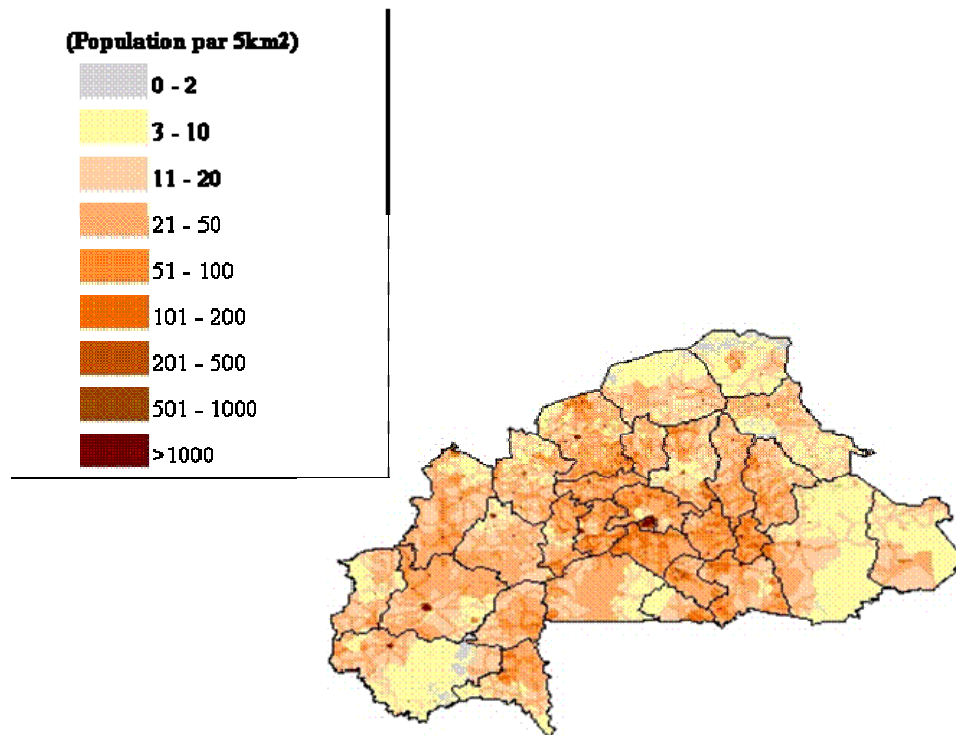


Figure 2: situation démographique (habitant par 5km²)

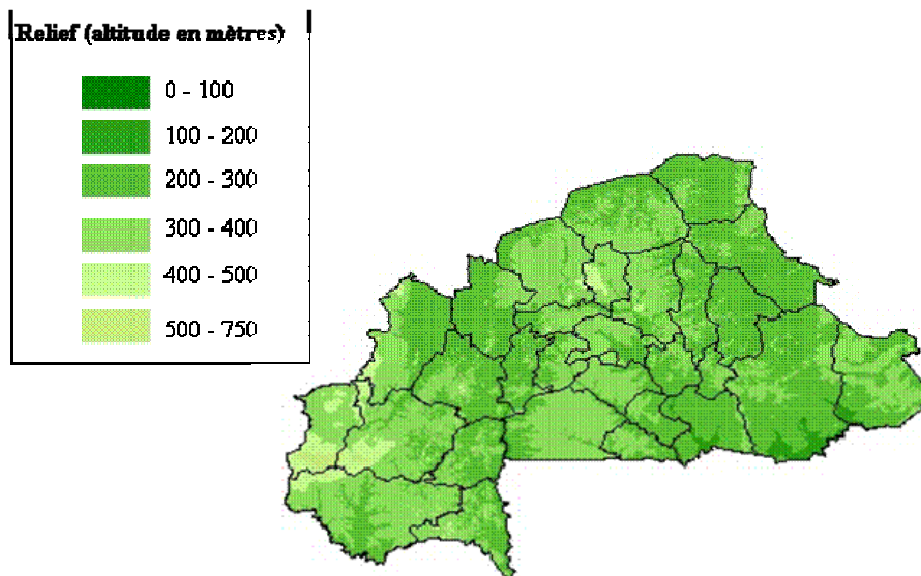


Figure 3: relief du Burkina Faso (altitude en mètre)

1.1.1. Le climat

Le Burkina Faso situé au cœur du sahel possède dans son ensemble un climat de type sahélien caractérisé par deux saisons : une saison sèche et une saison des pluies ou hivernage. La durée de la saison sèche qui peut s'étaler de 6 à 8 mois est caractéristique des 3 zones climatiques que connaît le pays et couvre en moyenne d'Octobre à Avril. Cette saison sèche est dominée par les vents secs d'harmattan qui touchent toute l'étendue du territoire avec une transition vers la saison des pluies qui s'amorce en Avril avec l'arrivée de la mousson. La saison des pluies va de Mai à Septembre, le mois d'Août étant le mois le plus pluvieux.

En fonction des isohyètes, on distingue trois zones climatiques (figures 4 et 5):

La zone sahélienne: elle s'étend au Nord du pays entre les latitudes 13°5'N à 15°3'N. Elle est caractérisée par une pluviométrie faible de moins de 600mm, des températures élevées > 30°C et une végétation d'arbustes épineux qui en fait une zone d'élevage par excellence. La saison sèche dure souvent plus de 8 mois.

La zone soudano-sahélienne: elle est située entre 11°3'N et 13°5' N. Elle connaît une pluviométrie moyenne de 750mm avec des températures relativement élevées autour de 30°C. La durée de la saison sèche varie entre 6 et 7 mois. Cette zone soudano-sahélienne est l'aire géographique la plus vaste du Burkina s'étendant du Nord Ouest à l'Est et couvrant tout le plateau central du pays.

La zone soudano-guinéenne: elle est située entre les latitudes 9°3' et 11°3'N. Elle est caractérisée par des pluies relativement abondantes en moyenne >900mm et des températures plus douces comparées à celles des régions précédentes. Elle couvre la partie Ouest et Sud-Ouest du pays. La saison des pluies dure plus de 6 mois toutefois avec quelques variations à l'intérieur de la même zone.

La pluviométrie annuelle connaît des variations importantes à l'intérieur de chaque zone climatique mais aussi au cours des années ce qui modifie continuellement la limite des isohyètes. Il est aussi noté une tendance globale à l'accroissement des températures due au réchauffement climatique à l'instar de ce qui est observé au niveau mondial.

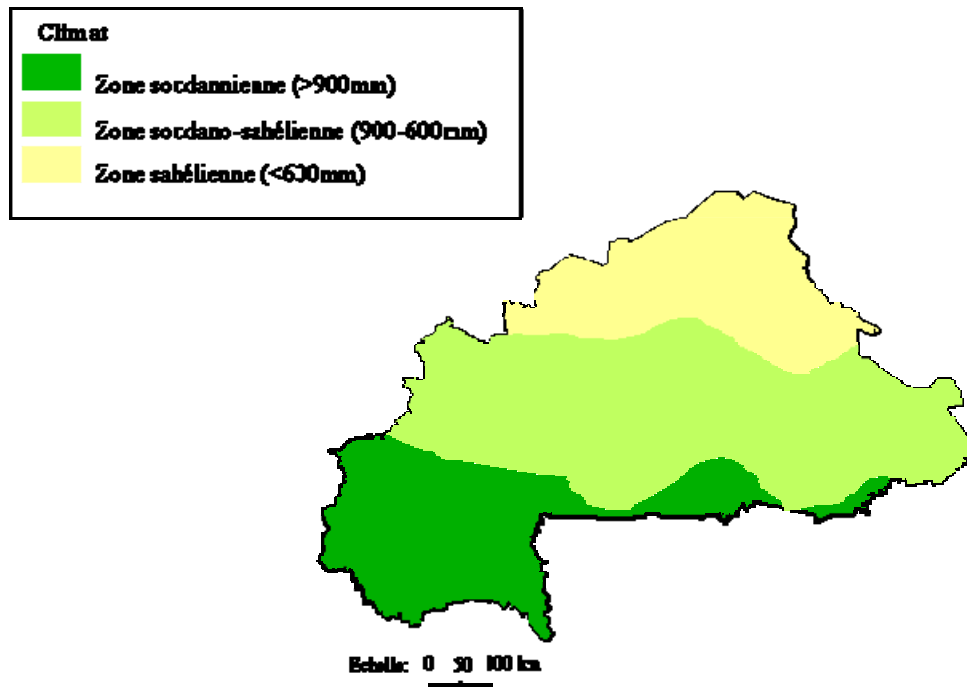


Figure 4: régions climatiques du Burkina Faso

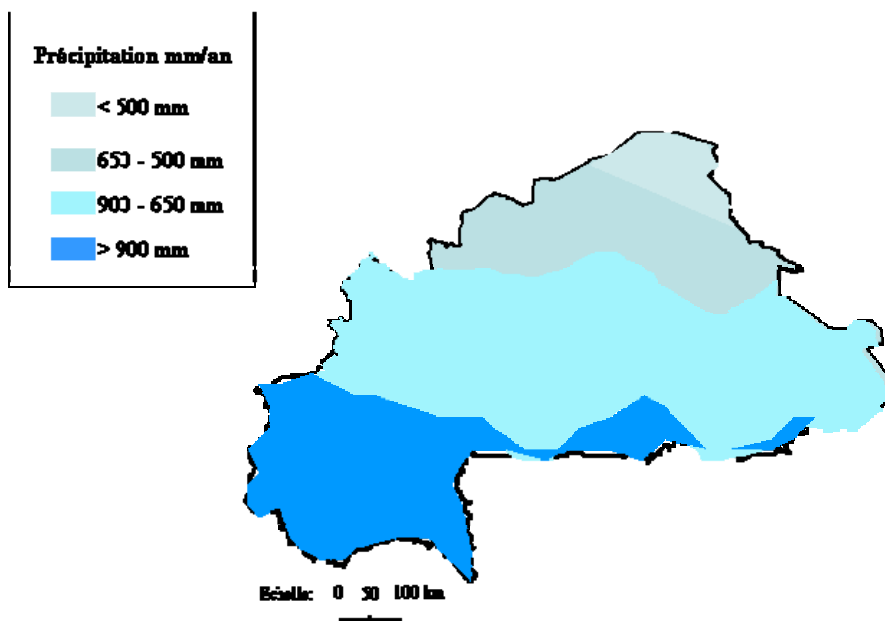


Figure 5: précipitations annuelles moyennes

1.1.2. La végétation

La végétation est typique des trois zones climatiques du pays (figure 6).

Dans la zone sahélienne stricte, on y rencontre la steppe arbustive dominée par les épineux parsemées de quelques arbres et arbustes sillonnée de galeries forestières minces.

Dans la zone sahélo-soudanienne, les espèces végétales sahéliennes et soudaniennes y interfèrent avec cependant une allure générale dominée par les espèces sahéliennes herbacées donnant une apparence de fourrés à allure de brousse tigrée.

La zone soudanienne à soudano-guinéenne est le secteur de grandes savanes à faciès multiples parsemées de reliques de forêts façonnées par les feux de brousse et d'intenses activités agricoles et pastorales. On y rencontre quelques forêts classées et les « bois sacrés » qui sont encore préservés par endroits tout le long des cours d'eau permanents. C'est la zone de grands marécages surtout dans sa partie Sud-Ouest. L'abondance relative des pluies maintient encore des savanes humides et boisées très sollicitées par les activités agro-pastorales. Quelques rares aires de forêts sont encore rencontrées à l'extrême Ouest du pays.

1.1.3. Les pratiques agricoles

On distingue deux grandes pratiques agricoles: les cultures vivrières ou/et en rotation avec les cultures de rente que sont le coton, l'arachide et le sésame. Le coton est cultivé essentiellement à l'Ouest du pays qui constitue depuis plus de 40 ans le bassin cotonnier du Burkina Faso. Avec la relance de cette filière, de nouvelles aires ont été emblavées surtout à l'Est et centre Est du pays constituant la seconde zone cotonnière depuis 1990. A cette zone classique, s'ajoute la région extrême du Sud-Ouest réputée jadis pour sa production de tubercules et jusqu'alors épargnée par le coton qu'elle expérimente depuis 1996.

A côté de ces cultures liées à la pluviométrie, l'installation des hydro-aménagements soutient essentiellement la production de riz qui devrait connaître un accroissement de rendement avec deux récoltes par an (figure 7). Depuis l'an 2000, l'ensemble du pays en particulier les zones à potentiel hydrique favorable, connaît un essor des cultures de contre-saison en en l'occurrence la production de maïs et d'arachide à la faveur d'un grand programme gouvernemental dénommé « la petite irrigation ». Ce programme qui vise à vulgariser cette pratique a mis en place de petits aménagements par la création de points d'eau provenant des cours d'eau déjà existants. Toute cette modification du milieu (augmentation et aménagement des aires cotonnières et des hydro-aménagements) a un impact sur la bio-écologie des vecteurs et leur résistance aux insecticides et par conséquent sur la transmission du paludisme et sur les stratégies de lutte antivectorielle.

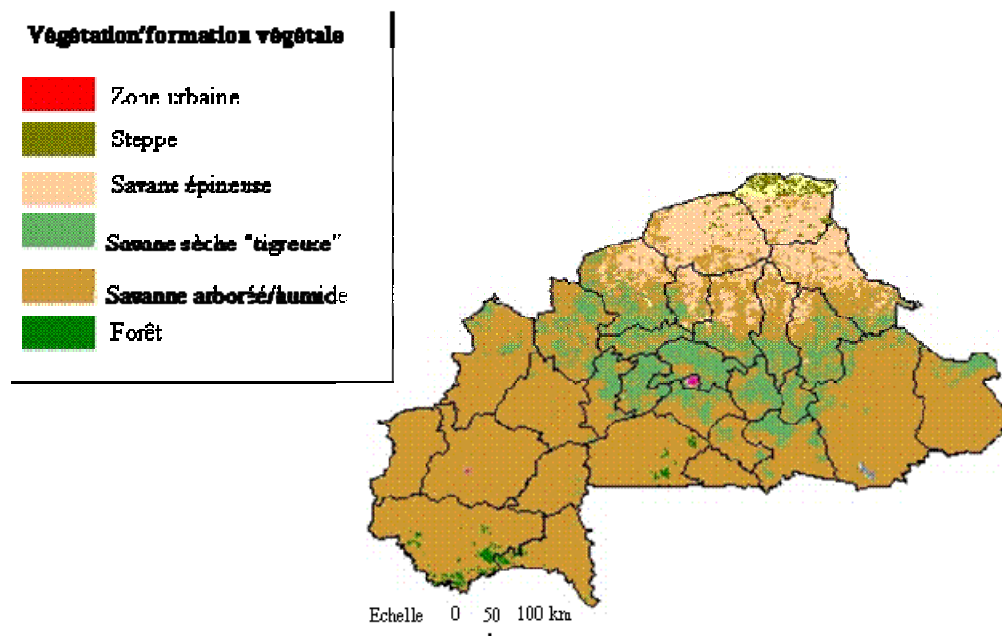


Figure 6: carte de la végétation

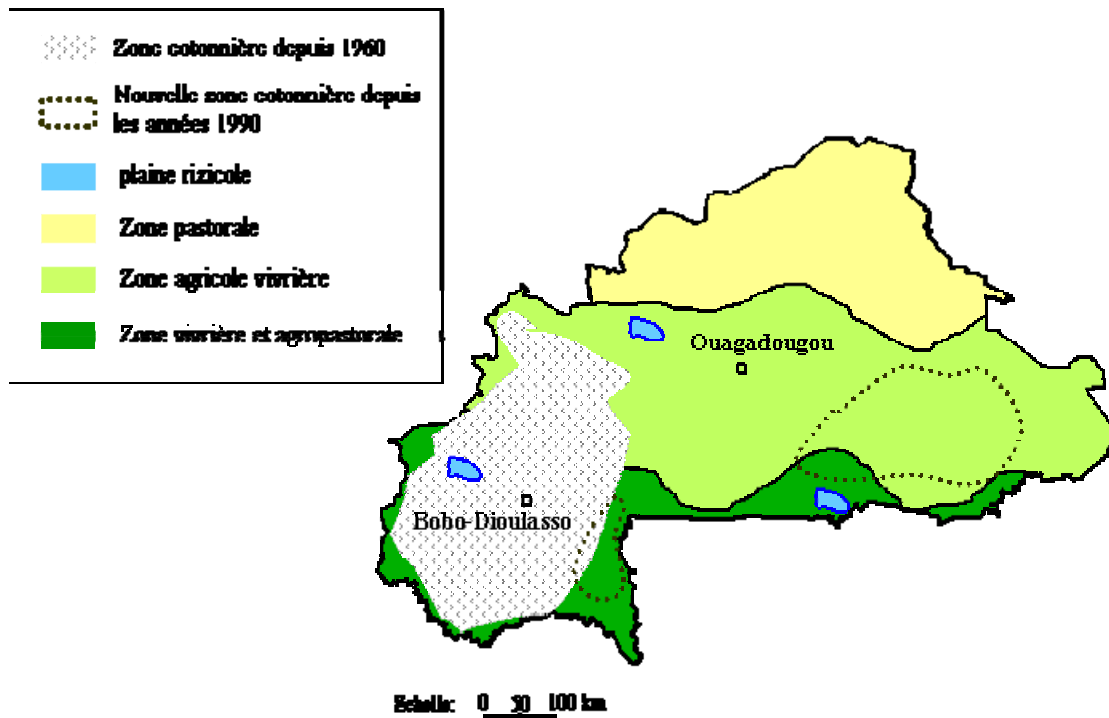


Figure 7: principales pratiques agricoles dans les grandes régions climatiques

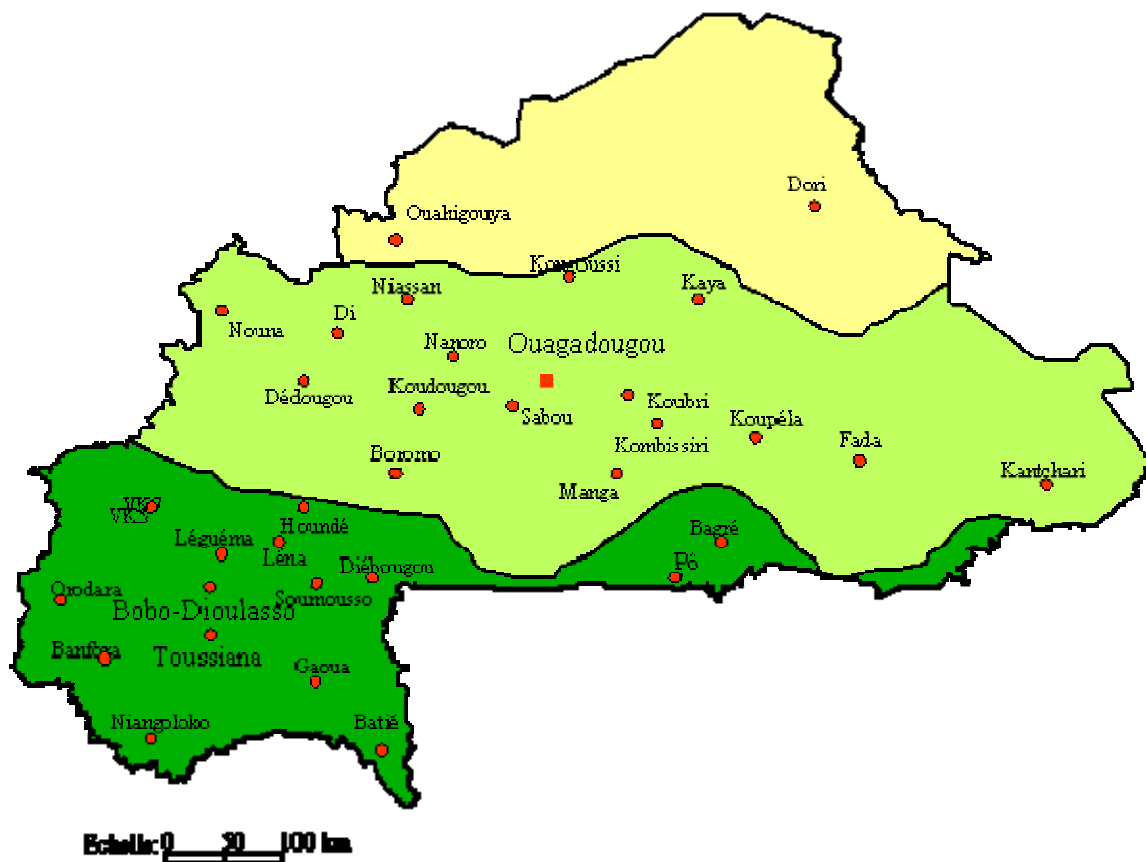


Figure 8: répartition géographique des sites d'étude sur le territoire national

1.2. Sites d'étude

Toutes les études sur la transmission du paludisme présentées dans ce document ont été pour la plupart menées dans la partie ouest du pays qui coïncide avec la zone soudanienne caractérisée par une saison de pluies relativement longue allant de Mai à Octobre. Cette saison de pluie qui couvre plus de 6 mois et qui correspond à la période intensive de la transmission du paludisme en a fait un faciès endémique où la transmission du paludisme est stable. Il s'agit des sites de Soumouso, de la Vallée du Kou et de Léna, tous situés dans la partie Ouest du pays. A ceci s'ajoutent les sites pilotes du Programme National de Lutte contre le paludisme (PNLP) comprenant Gaoua en zone soudanienne, Nanoro en zone soudano-sahélienne et Dori en zone sahélienne. Les études sur la bio-écologie des vecteurs en saison sèche ont été réalisées à Ouagadougou en Avril 2006 tandis que celles portant sur le comportement de reproduction d'*An. gambiae* s.s. à travers les essaims ont été menées à Bama (VK7) et à Soumouso à l'Ouest du pays.

Par contre les études menées sur la distribution des gènes de résistance ont concerné l'ensemble du pays allant de l'Ouest au Nord et ont porté sur 26 sites échantillonnés entre Juillet et Octobre 2006. Leur localisation au niveau national et leur coordonnées géographiques sont reportées respectivement dans la figure 8 et dans le tableau I.

1.3. Méthodes d'échantillonnage des anophèles

Cet échantillonnage a été fait suivant différentes techniques et en fonction du type d'étude.

1.3.1. Capture sur appât humain

Cette méthode a permis de capturer les spécimens ayant servi à de mesurer l'agressivité des moustiques vis-à-vis de l'homme ou taux de piqûre lequel paramètre est utilisé pour le calcul du taux de transmission palustre. Ces captures nocturnes se déroulent entre 19h et 6h.

Les volontaires ou «captureurs» jouant le rôle d'appât humain, munis de torche, capturent les moustiques qui se posent sur les jambes dénudées avant que ceux-ci ne les piquent, à l'aide de tubes à hémolyse (Illustration 1). Les spécimens collectés sont référencés et regroupés en fonction de certaines informations que sont la localité, la date, l'heure de capture, la maison et le lieu de capture (à l'intérieur ou à l'extérieur des maisons). Ces caractéristiques permettent outre le taux de piqûre de déterminer le comportement (endophagie/exophagie) ainsi que les rythmes d'activité. Chaque poste de capture est assuré par deux captureurs qui se relayent l'un entre 19h et 0h et l'autre de 0h à 6h. Avant de les enrôler, chaque captureur est informé des procédures de capture et en cas de consentement, une prophylaxie est fournie suivant les recommandations de l'OMS tenant compte du contexte local de chimiosensibilité des parasites. Les ovaires des spécimens capturés sont ensuite disséqués pour la lecture de la parité (âge physiologique des femelles). La recherche des parasites (sporozoïtes) qui se faisant auparavant par dissection des glandes salivaires et détection microscopique se réalise dorénavant au laboratoire à l'aide de la technique ELISA – CSP pratiquée sur la tête et le thorax des femelles à analyser, ce qui permet d'évaluer le taux d'infection des femelles (Burkot *et al.*, 1984). Cette méthode de capture a été principalement utilisée pour la mesure du taux d'inoculation entomologique (TIE, voir chapitre 3 pour les détails de la formule du TIE) dans les études de la transmission à l'Ouest du pays. Mais pour des raisons essentiellement éthiques, cette technique d'échantillonnage tend vers un abandon progressif favorisant l'utilisation des pièges lumineux tels que les pièges CDC.

1.3.2. Capture par les pièges CDC

La capture sur homme a été remplacée par les captures à l'aide des pièges CDC pour l'étude de la bio-écologie des vecteurs dans la ville de Ouagadougou en avril 2006 (Illustration 2).

Cette méthode consiste à placer un piège lumineux CDC à côté d'un dormeur couché sous une moustiquaire non traitée aux insecticides. Les moustiques agressifs qui cherchent à piquer sont déviés vers le piège. La suite du protocole (tranche horaire, référence des tubes par date, localité etc) reste inchangé.

1.3.3. Capture à l'aide de filet

Cette méthode a été essentiellement utilisée pour collecter les moustiques dans les essaims dans le cadre des études du comportement de reproduction d'*An. gambiae* s.s. sur le terrain. Elle a l'avantage de prendre plusieurs centaines de moustiques à chaque fauchage incluant aussi bien les mâles que les femelles (Illustration 3). L'identification des moustiques se fait comme dans les autres protocoles (identification morphologique puis moléculaire, cf chapitres 3 et 4 pour les détails).

1.3.4. Capture par pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des maisons

Cette méthode permet seulement la collecte de spécimens qui sont au repos dans les habitations dénommée encore faune résiduelle (Illustration 4). Elle consiste à étaler des draps blancs dans les chambres qui sont après fermées et à pulvériser de l'insecticide à base de pyréthrinoloïde non rémanent dans la pièce en insistant au niveau des issues et des points de cachette (toit, portes, fenêtres, dessous des couchettes) pour «dénicher» les moustiques et éviter au maximum leur sortie. Au bout d'un quart d'heure, les moustiques en général tombent, morts ou assommés, sur le drap et sont ensuite collectés. Seuls les anophèles sont conservés. Cette technique permet de collecter surtout les femelles à différents niveaux de réplétion (gorgées, semi-gravides et gravides). En fonction de l'objectif de l'étude et de l'heure de capture, il est possible d'obtenir un effectif satisfaisant de femelles semi-gravides chez lesquelles les chromosomes polythènes des ovaires peuvent être facilement visibles

(dans le cadre de nos travaux portant sur la caractérisation des formes chromosomiques d'*An. funestus* selon l'algorithme de Costantini *et al.*, 1999). Les spécimens qui n'auront pas totalement digéré le sang peuvent servir pour déterminer l'origine de leur repas de sang par la technique d'ELISA-RS (Beier *et al.*, 1988) au même titre que la technique d'ELISA –CSP.

1.3.5. Capture à l'aide d'un aspirateur manuel (ou électrique)

Cette méthode permet de collecter des spécimens qui sont au repos dans des habitations et dans des gîtes de repos ne facilitant pas la pulvérisation d'insecticide (illustration 5). Elle a aussi l'avantage de collecter des spécimens vivants qui peuvent servir plus tard par exemple dans le cas des femelles gravides à effectuer des pontes individuelles indispensables pour monter des colonies homogènes en insectarium. Cette méthode permet de regrouper des larves (isolarves) de même forme moléculaire issues de ponte individuelle de femelles préalablement identifiées par PCR. Elle a permis dans nos travaux, la production des larves des deux formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. qui ont servi aux études de transplantation larvaire sur le terrain.

1.3.6. Collecte des larves

Les larves sont recherchées dans des gîtes larvaires productifs à l'aide de louches et de cuvettes avec lesquelles on les récolte rapidement à la surface de l'eau (Illustration 6). Cette méthode permet de collecter des spécimens vivants identifiés morphologiquement au stade larvaire et peuvent être ensuite élevés à l'insectarium jusqu'à émergence. Les adultes peuvent servir en particulier pour les tests d'insecticide (bio-essais) en fonction de leur provenance (localité) et de la saison (saison des pluies, saison sèche) en comparant leur sensibilité à la souche de référence *An. gambiae* «Kisumu» maintenue à l'insectarium.



Illustration 1: capture de moustiques sur appât humain



Illustration 2: capture de moustiques par piégeage CDC



Illustration 3: capture de moustiques par les filets



Illustration 4: collecte de moustiques après pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide non rémanent



Illustration 5: capture intradomiciliaire de moustique par aspiration à bouche



Illustration 6: collecte de larves dans une collection d'eau temporaire

1.4. Identifications morphologique, moléculaire et cytogénétique

- Identification morphologique des spécimens collectés

Après les sessions de collecte de moustiques adultes (toutes espèces confondues) par les différentes méthode de capture que nous venons de voir, les spécimens sont identifiés morphologiquement à l'aide de la clé d'identification de Gillies et de Meillon (1968) et de Gillies et Coetzee (1987). Celles-ci permettent de distinguer les espèces d'anophèles vecteurs et de les séparer des autres anophèles et autres culicidés qui ne sont pas forcément pris en compte dans les études de transmission du paludisme.

- Identification moléculaire des espèces et formes moléculaires

Après ce premier tri, les spécimens sont en général identifiés par PCR pour caractériser les membres des complexes d'espèces et les formes moléculaires à partir d'ADN extrait sur quelques pattes de moustique détachées des spécimens à analyser. La plupart des espèces d'*An. gambiae* s.l. ont été identifiées grâce au protocole de Scott *et al.* (1993) et les formes moléculaires au sein de l'espèce *An. gambiae* s.s. par le protocole de Favia *et al.* (2001). Les principaux membres du groupe *funestus* ont été identifiés selon le protocole de Koekemoer *et al.* (2002) modifié par Cohuet *et al.* (2003). Les détails des protocoles peuvent être consultés en annexe 1.

- Identification cytogénétique

Seule l'identification cytogénétique permet de distinguer les formes chromosomiques «Kiribina» et «Folonzo» au sein des populations d'*An. funestus* s.s. Pour ce faire, les ovaires sont disséqués des femelles semi-gravides issues des captures d'anophèles adultes en particulier par pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide non rémanent ou par aspiration à bouche à l'intérieur des maisons (voir techniques précédemment décrites).

Les ovaires sont ensuite conservés dans du carnoy qui est un mélange d'acide acétique glacial et d'éthanol (3:1).

Les inversions chromosomiques caractéristiques de chaque forme sont identifiées sur les chromosomes polythènes des ovaires sous microscope à contraste de phase (Illustration 7) en appliquant l'algorithme de Costantini *et al.* (1999) [voir détail et figure 10 dans le paragraphe 4.2. du chapitre 2].

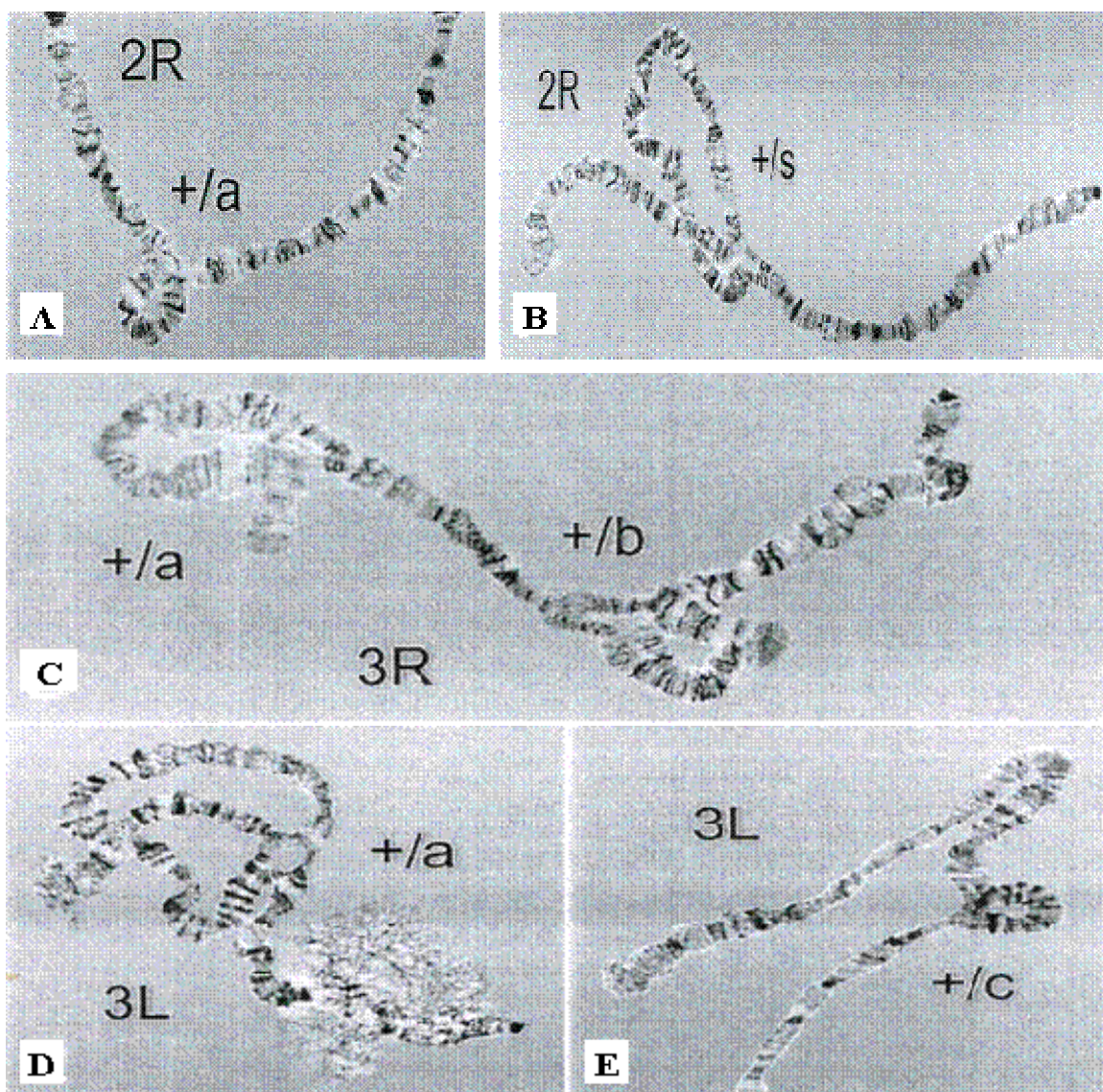


Illustration 7: inversions chromosomiques majeures caractéristiques chez *An. funestus* s.s.

1.5. Taux d'infection et origine du repas de sang des femelles (ELISA CSP et RS)

- ELISA-CSP

Pour déterminer le taux d'infection des femelles d'anophèles au *Plasmodium*, la technique Elisa (Enzym Linked Immunosorbent Assay) a été utilisée (Illustration 8). C'est une technique colorimétrique qui consiste à rechercher les anticorps des protéines membranaires du parasite (circumsporozoite protein ou CSP en anglais) dans la tête et le thorax du moustique déjà identifié par PCR. Ce procédé à base immunologique basé sur la réaction anticorps-antigène est un test *a priori* qualitatif qui permet de détecter la présence du parasite (au stade sporozoïtique) chez le moustique (Burkot *et al.*, 1984, Wirtz *et al.*, 1987). Il est précis et permet de distinguer à l'aide d'anticorps spécifique les différentes espèces de *Plasmodium* en cas d'infection mixte. Le détail du protocole peut être consulté en annexe 2.

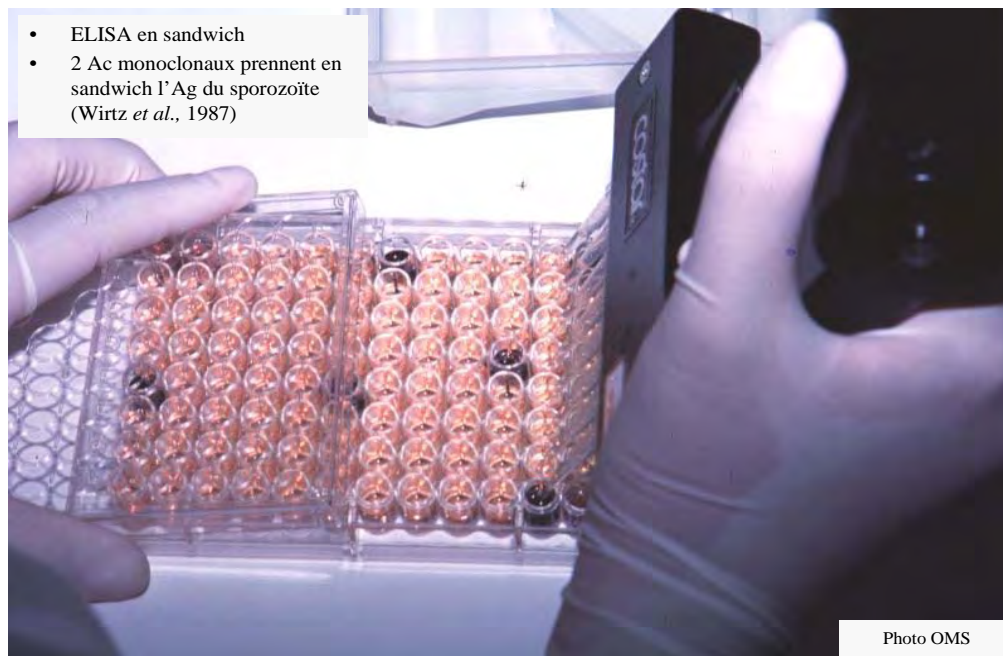


Illustration 8: détermination du taux d'infection par la technique d'Elisa-CSP

(Wirtz *et al.*, 1987)

- ELISA-RS

L'origine du repas de sang pris par les femelles lors de la piqûre peut être déterminée à l'aide de la technique ELISA- repas de sang (RS). A l'instar des ELISA-CSP, cette technique utilise des anticorps provenant de plusieurs sources de sang (homme, bœuf, mouton, chèvre, porc, âne, poulet etc). Elle consiste à déterminer l'origine du sang trouvé dans l'abdomen du moustique gorgé en l'occurrence les femelles prises au repos (soit par pulvérisation d'insecticide soit par aspiration à bouche) qui n'auront pas totalement digéré le sang grâce à la réaction immunologique à partir des anticorps que nous venons de mentionner (Illustration 9). Elle permet de savoir si le moustique s'est gorgé sur un sujet humain ou plutôt sur animal ou sur les deux à la fois (en cas de repas mixte) et ainsi de déduire les préférences trophiques des différentes espèces (Beier *et al.* 1988). Le détail du protocole peut être consulté en annexe 2.

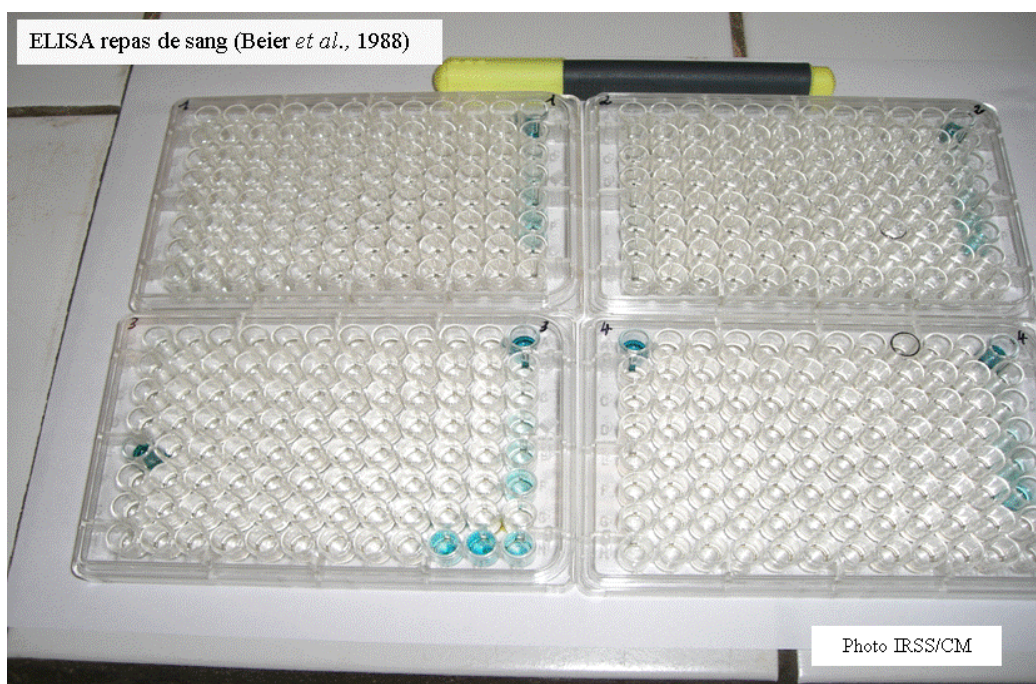


Illustration 9: analyse de l'origine des repas de sang par la technique d'Elisa-RS
(Beier *et al.*, 1988)

1.6. Bio-essais et caractérisation moléculaire des gènes de résistance

- Bio-essais en tubes OMS

Pour tester le statut de résistance des vecteurs aux insecticides, le test de sensibilité en tube OMS a été utilisé (Illustration 10). Il consiste à mettre des moustiques à jeun âgés de 2-3 jours en contact du papier imprégné de l'insecticide qu'on veut tester et à lire la mortalité qui en résulte 24h après le contact. Deux paramètres importants sont pris en compte dans cette analyse: le taux de mortalité des moustiques (exprimé en pourcentage des moustiques morts) et le temps de KD (knock-down en anglais qui signifie paralysé sous l'effet de l'insecticide). Le temps de KD exprime le temps qui correspond à une proportion donnée de moustiques tombés sous l'effet de l'insecticide. Mais dans la pratique seuls les KD_{50} et KD_{95} qui correspondent respectivement au temps où 50% et 95% de l'effectif testé est tombé sont pris en compte. Ce paramètre qui n'exprime pas en réalité la mortalité permet cependant de déceler des signes de tolérance de la souche testée à l'insecticide et à la dose à laquelle elle est exposée. La mortalité proprement dite est exprimée en taux de mortalité correspondant au pourcentage de moustiques effectivement tués par l'insecticide rapporté 24 heures après l'exposition de la dite souche à l'insecticide. Le seuil de sensibilité est fixé à 95% de mortalité pour la perméthrine 1% et la deltaméthrine 0.05% et de 90% pour le DDT4%. Ce test est validé par une comparaison des résultats avec ceux de la souche sensible de référence, *An. gambiae* «Kisumu». La souche est dite résistance si son taux de mortalité en fonction de l'insecticide testé se situe dessous du seuil défini. La souche testée peut provenir de moustiques issus de collecte directe de larves sur le terrain et mises en élevage à l'insectarium, soit d'une colonie issue de ponte individuelle de femelles capturées sur le terrain (voir différentes méthodes de capture de femelles vivantes et de larves). Mais pour des contraintes de terrain, le bio-essai peut être réalisé directement sur des moustiques adultes (préférentiellement à jeun) directement capturés sur le terrain par aspiration à bouche.

C'est le cas précis des zones qui ne disposent pas d'insectarium pour un élevage approprié de moustiques ou difficile d'accès telles que les zones inondées ne permettant pas une prospection larvaire. Après la lecture de la mortalité, les spécimens sont conservés sur du silicagel dans des tubes référencés suivant le statut de sensibilité (morts ou vivants), la date du test, l'insecticide testé, la localité et stockés à -20°C. Ils pourront après être identifiés (si la souche n'a pas été identifiée auparavant) par PCR pour déterminer l'espèce et/ou les formes moléculaires et éventuellement caractériser les gènes de résistance.

- Caractérisation moléculaire des gènes de résistance (*kdr* et *ace.1*)

Après l'identification morphologique et spécifique par PCR pour déterminer les espèces d'*An. gambiae* s.l. et d'*An. funestus* s.l. et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. et en fonction des objectifs de chaque étude, les gènes de résistance tels que les mutations *kdr* Leu-Phe et *ace.1* G119S peuvent être ensuite détectés respectivement selon les protocoles de Martinez-Torres *et al.* (1998) et de Weill *et al.* (2004). Ces analyses peuvent être effectuées de façon indépendante sur des moustiques directement collectés sur le terrain (adultes ou larves) ou au contraire destinées à compléter les résultats du bio-essai en précisant le mécanisme et la fréquence des gènes de résistance des souches testées.

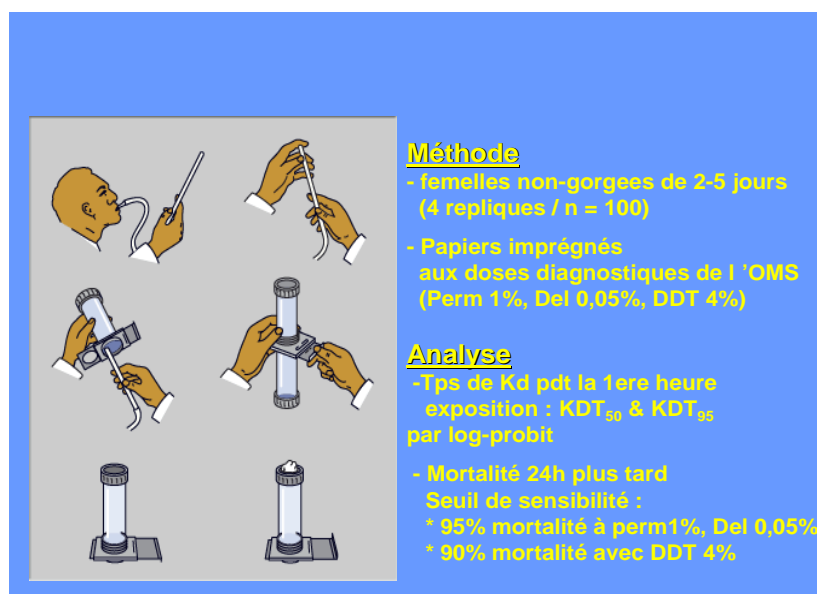


Illustration 10: schéma du bio-essai en tube OMS

Tableau I: coordonnées géographiques, zone climatique et principale production agricole des sites d'étude

	Site	Longitude	Latitude	Zone climatique	Environnement	Production agricole
1	Bama centre VK5	4.2442 W	11.2314 N	Soudanien	Rural	Riz
2	Bama périphérie VK7	4.2459 W	11.2410 N	Soudanien	Rural	Riz/coton
3	Léna	3.5343 W	11.1817 N	Soudanien	Rural	Coton
4	Soumouso	4.0243 W	11.0054 N	Soudanien	Rural	Coton
5	Léguéma	4.1018 W	11.1409 N	Soudanien	Rural	Maraîcher/coton
6	Toussiana	4.3754 W	10.4926 N	Soudanien	Rural	Vivrière/coton
7	Bagré	0.2834 W	11.3209 N	Soudanien	Rural	Riz/maraîcher
8	Di	3.0410 W	13.0410 N	Soudano-sahélien	Rural	Riz/maraîcher
9	Niassan	3.0410 W	13.0935 N	Soudano-sahélien	Rural	Vivrière
10	Dori	0.0134 W	14.0258 N	Sahélien	Rural	Vivrière
11	Gaoua	3.1025 W	10.1929 N	Soudanien	sub-urbain	Vivrière
12	Banfora	4.4528 W	10.3736 N	Soudanien	sub-urbain	Canne/coton
13	Batié	9. 270 W	24.55 N	Soudanien	Rural	Vivrière/coton
14	Orodara	4.5429 W	10.5825 N	Soudanien	Rural	Fruitier/coton
15	Pô	1.0807 W	11.1007 N	Soudanien	Rural	Vivrière
16	Houndé	3.3120 W	11.2935 N	Soudanien	Rural	Vivrière
17	Boromo	2.5519 W	11.4444 N	Soudano-sahélien	Rural	Coton
18	Dédougou	3.2739 W	12.2527 N	Soudano-sahélien	Rural	Coton
19	Nouna	3.335 W	12.37N	Soudano-sahélien	Rural	Coton
20	Sabou	2.1329 W	12.0341 N	Soudano-sahélien	Rural	Vivrière/maraîcher
21	Koudougou	2.2150 W	12.1455 N	Soudano-sahélien	sub-urbain	Vivrière/maraîcher
22	Nanoro	1.2683 W	18.167 N	Soudano-sahélien	Rural	Vivrière
23	Kaya	1.0516 W	13.0515 N	Soudano-sahélien	Rural	Vivrière
24	Koupela	0.2115 W	12.1052 N	Soudano-sahélien	Rural	Vivrière
25	Manga	1.140 W	10.5N	Soudano-sahélien	Sub-urbain	Vivrière/coton
26	Koubri	1.2163 W	13.886 N	Soudano-sahélien	Rural	Vivrière/maraîcher
27	Kombissiri	1.204 W	12.1 N	Soudano-sahélien	rural	Vivrière/coton
28	Fada-N'Gourma	0.2139 E	12.0317 N	Soudano-sahélien	sub-urbain	Vivrière
29	Kantchari	1.3118 E	12.2843 N	Soudano-sahélien	rural	Vivrière
30	Ouahigouya	2.2501 W	13.3409 N	Soudano-sahélien	sub-urbain	vivrière/maraîcher
31	Bobo-Dioulasso	4.1730 W	11.1041 N	Soudanien	Urbain	Maraîcher-
32	Ouagadougou	1.3040 W	12.2008 N	Soudano-sahélien	Urbain	Maraîcher

Vivrière : culture vivrière

Maraîcher: culture maraîchère

CHAPITRE 2: BIO-ÉCOLOGIE DES VECTEURS DU PALUDISME

Les vecteurs du paludisme sont des anophèles appartenant à la sous famille des *Anophelinae* (Diptera : Culicidae) et tous regroupés dans le genre *Anopheles*. Ce genre est l'un des plus importants en santé publique et regroupe près de 400 espèces dispersées dans le monde dont 70 sont des vecteurs de maladies humaines tels que le paludisme et les filarioses lymphatiques (Bruce-Chwatt, 1987). Si dans les savanes d'Afrique subsaharienne plusieurs espèces d'anophèles sont recensées, quatre qualifiées de « vecteurs majeurs » sont formellement reconnues comme assurant la quasi-totalité de la transmission du paludisme: *An. gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles, *An. nili* Theobald (Gillies & Coetzee, 1987; Coetzee *et al.*, 2000). A celles-ci s'ajoute *An. moucheti* dans les zones de forêts d'Afrique Centrale assurant la transmission du paludisme dans les zones de grands cours d'eau (Antonio *et al.*, 2002; **[article 1]**).

Certains vecteurs dits secondaires² assurent localement la transmission du paludisme aux côtés des vecteurs majeurs³ surtout sur le littoral et le milieu insulaire tels *An. melas* sur les côtes lagunaires d'Afrique de l'Ouest, *An. merus* et *An. mascarensis* à Madagascar (Fontenille & Campbell, 1992; Pock Tsy *et al.*, 2003).

Cette diversité en Afrique intertropicale (où la plupart de ces vecteurs vivent en sympatrie) donne lieu à une certaine complexité dans la plupart des faciès de transmission du paludisme tant dans son intensité que dans sa dynamique. Ceci rend ainsi plus spécifique l'approche de la réduction du contact homme-vecteur (Mouchet *et al.*, 1993; Fontenille & Lochouarn, 1999).

²Un vecteur secondaire assure la transmission du paludisme à côté d'un vecteur majeur mais ne peut à lui seul assurer la pérennité de cette transmission

³Un vecteur majeur assure la transmission du paludisme durant toute la saison de la transmission assurant ainsi à lui seul la pérennité de la transmission

Des études menées sur le comportement trophique et de repos dans le complexe *An. gambiae* ont permis de démanteler ce dernier en 6 (White, 1974) puis plus récemment en 7 espèces jumelles (Hunt *et al.*, 1998). A la lumière des techniques cytogénétiques, isoenzymatiques et moléculaires, de nombreuses études ont permis de réévaluer les entités taxonomiques au sein de ces vecteurs. Elles ont mis en évidence un certain niveau d'hétérogénéité génétique au sein de ces taxons aboutissant par endroits à des phénomènes de spéciation (Bryan *et al.*, 1987; Coluzzi *et al.*, 1985; Costantini *et al.*, 1999; Awono *et al.*, 2004). Ces résultats ont permis de mieux hiérarchiser le rôle vectoriel des nouvelles entités qui en ont résulté. En Afrique tropicale, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont les principaux vecteurs du complexe *An. gambiae*, *An. funestus* s.s. du groupe *funestus* et *An. nili* du groupe *nili* ayant également avec les deux précédentes espèces un rôle de vecteur majeur (Gillies & Coetzee, 1987; Harbach *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 1998; Awono *et al.*, 2004; Cohuet *et al.*, 2004).

2.1. Le complexe *Anopheles gambiae*

Jadis considéré comme un seul taxon, l'accumulation d'évidences concernant un certain degré de polymorphismes morphologiques et d'hétérogénéités comportementales en ont fait un complexe de sept espèces jumelles réparties de façon hétérogène à travers toute l'Afrique subsaharienne (Hunt *et al.*, 1998), des savanes aux forêts, des côtes au désert renfermant les meilleurs vecteurs du paludisme au monde. Ce sont:

- *Anopheles gambiae* s.s. Giles, 1902
- *Anopheles arabiensis* Patton, 1904
- *Anopheles melas* Theobald, 1903
- *Anopheles merus* Doenitz, 1902
- *Anopheles bwambae* White, 1985

- *Anopheles quadriannulatus* A Theobald, 1911

- *Anopheles quadriannulatus* B, Hunt *et al.*, 1998

En général, la répartition de ces vecteurs suit certaines caractéristiques éco-climatiques. Ainsi *An. gambiae* s.s. est plus fréquemment rencontré en zone de forêt et de savane humide (Coluzzi, 1993; Wondji *et al.*, 2002) mais aussi dans les savanes sèches ouest-africaines s'étendant du Sénégal au Burkina Faso (Touré *et al.*, 1998; Dia *et al.*, 2003; Diabaté *et al.* 2004b; [article 2]). Elle vit en sympatrie dans la presque totalité des savanes afro-tropicales avec *An. arabiensis* qui se retrouve quasi seul dans les zones sahéliennes et désertiques où il montre des orientations zoophiles et exophiles. Leurs gîtes de prédilection sont des collections d'eaux douces stagnantes ensoleillées, peu profondes et faiblement chargées de matières organiques. Mais avec l'anthropisation du milieu à la faveur de l'urbanisme, on assiste à une colonisation de gîtes atypiques pollués (mares temporelles, déchets de civilisation, caves de briques) chargés de matières organiques denses surtout dans les banlieues de quelques agglomérations urbaines (Trape *et al.*, 1987; Vercruyssen *et al.*, 1983, Robert *et al.*, 1998). Ces gîtes traversent de façon extraordinaire la longue saison sèche. Une prospection de l'habitat larvaire en avril 2006 dans les banlieues de Ouagadougou a révélé la productivité de la quasi-totalité des gîtes remplis de matières organiques polluées. L'identification spécifique de ces larves a montré qu'elles étaient composées d'*An. arabiensis* (72%), d'*An. gambiae* forme M (37%) et d'*An. gambiae* forme S (3%) [article 3]. Ce cas particulier d'adaptation et la colonisation des grandes villes par les vecteurs du paludisme pose la problématique du paludisme urbain (Robert *et al.*, 2003).

An. melas et *An. merus*, deux espèces «côtières» dont le stade larvaire se déroule en eau saumâtre, occupent respectivement le littoral de l'Afrique de l'Ouest allant du Bénin au Sénégal (Akogbeto *et al.*, 1999a; Diop *et al.*, 2002; [article 4]), et les côtes de l'Afrique de l'Est et de Madagascar (Pock Tsy *et al.*, 2003).

Dans ces zones, ces deux espèces dites halophiles jouent un rôle de vecteur secondaire du paludisme aux côtés d'*An. gambiae* s.s.

Les deux espèces d'*An. quadriannulatus* sont rencontrées en Ethiopie et dans la partie orientale de l'Afrique méridionale où les larves vivent en eau douce. Enfin, *An. bwambae* a une répartition géographique plus circonscrite puisque ses larves se développent dans les sources d'eau minérale de la forêt de Semliki en Ouganda (White, 1985). Les trois dernières espèces à comportement de piqûre zoophile ne sont pas vectrices de paludisme.

An. melas, *An. merus*, *An. quadriannulatus* A et B et *An. bwambae* vivent en sympatrie avec *An. gambiae* s.s. et/ou *An. arabiensis* mais sont allopatriques entre elles (Bryan *et al.*, 1987).

Ces espèces sont isolées entre elles par de robustes mécanismes d'isolement reproductif non encore formellement élucidés mais qui pourraient être basés sur des différences de comportements pré-copulatoires (Coluzzi *et al.*, 1985). De toutes, *An. gambiae* s.s. est le vecteur le plus important dans la transmission du paludisme (Coetzee *et al.*, 2000).

Le taxon *An. gambiae* s.s., lui-même issu du démantèlement du complexe *An. gambiae*, a été très tôt soupçonné de présenter certaines hétérogénéités génétiques suggérant un certain niveau d'isolement reproductif. En effet, en Afrique de l'Ouest, des analyses cytogénétiques basées sur les arrangements des inversions chromosomiques en particulier les inversions sur le bras chromosomique 2 (2R) ont montré un grand polymorphisme au sein de cette espèce. Les inversions les plus exprimées sont les 2Rbc, 2Ru, 2Rd qui ont permis de subdiviser ce taxon en 5 formes chromosomiques plus ou moins génétiquement isolées.

Ces caryotypes ont été rarement trouvés en équilibre de Hardy-Weinberg⁴ avec un déficit systématique d'hybrides (Coluzzi *et al.*, 1985; Petrarca *et al.*, 1987; Touré *et al.*, 1994; Coluzzi *et al.*, 2002). Ces formes chromosomiques ou cytotypes que sont «Mopti», «Savane», «Bissau», «Bamako» et «Forêt», considérées déjà comme des espèces « naissantes » ou incipientes⁵ (Coluzzi *et al.*, 1985; Touré *et al.*, 1994; 1998), sont réparties en Afrique de l'Ouest suivant les divers faciès environnementaux. Mais si dans la nature la barrière génétique a été plus évidente, au laboratoire des hybrides viables et fertiles (Di Deco *et al.*, 1980; Persiani *et al.*, 1986) ont été obtenus ce qui suscita des débats sur leur degré de spéciation. Ces arrangements confèreraient une adaptation au milieu plutôt qu'un isolement reproductif entre formes. La forme Mopti avec les inversions 2Rbc aurait l'avantage de survivre en conditions sèches en toutes saisons tandis que la Mopti Rbu s'adapte mieux à la saison pluvieuse où elle entre en compétition avec la forme Savane Rb qui y est inféodée (Robert, 1989; Touré *et al.*, 1998). Cette adaptation à l'environnement aurait favorisé une structuration de ces deux formes chromosomiques en fonction de la variation du milieu qui serait à la base d'un début de spéciation au Mali et au Burkina Faso (Caputo *et al.*, 2007). Les analyses moléculaires ont permis de regrouper ces cinq formes chromosomiques en deux formes moléculaires nommées forme M et S. L'identification moléculaire de ces formes est basée sur un test PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) à partir de la séquence des nucléotides des espaces intergéniques (IGS) et de l'espace intérieur transcrit (ITS) de l'ADN ribosomal (Favia *et al.*, 1997; 2001). Ces deux formes moléculaires, quoique conduisant à des hybrides M/S au laboratoire, semblent génétiquement plus isolées que les formes chromosomiques. Elles sont ainsi considérées comme deux entités en voie de spéciation (della Torre *et al.*, 2001, 2002).

⁴Une population est dite en équilibre de Hardy-Weinberg quand elle est stable (grande taille, reproduction sexuée, diploïde, peu influencée par la sélection naturelle et la mutation, fermée)

⁵Des espèces incipientes ou espèces « naissantes » sont des espèces en voie de spéciation mais ne sont pas encore des entités taxonomiques complètes

Faisant toujours la relation entre formes chromosomique et moléculaire, aucun chevauchement parfait n'est observé entre elles, à l'exception du Burkina Faso et du Mali. Au Burkina Faso en effet, deux formes chromosomiques «Mopti» et «Savane» sont rencontrées et correspondent respectivement aux formes moléculaires M et S. Elles vivent en sympatrie à des fréquences variables suivant les conditions du milieu (Robert, 1989; Diabaté *et al.*, 2004b; della Torre *et al.*, 2005). La forme M est rencontrée en forte proportion dans les zones sèches du Nord et du Centre mais aussi dans les aménagements hydro-agricoles (illustration 11A) sur toute l'étendue du territoire [articles 2 & 5]. La forme S est plutôt fréquemment rencontrée dans toute la partie Ouest et Sud-Ouest du pays dans les savanes humides [articles 2 & 6] où elle colonise les gîtes liés à la saison des pluies (illustration 11B). Mais ailleurs en Afrique, surtout dans les faciès de forêt, les traits de correspondance entre formes chromosomique et moléculaire n'ont pas souvent été clairement identifiés, des formes chromosomiques «Savane» et «Forêt» pouvant être identifiées comme des formes moléculaires S ou M (della Torre *et al.*, 2001; Wondji *et al.*, 2002).

Le gène *kdr* conférant la résistance croisée aux pyréthrinoïdes et au DDT à *An. gambiae* s.l. [nous le présenterons en détail dans le chapitre consacré à la résistance des vecteurs aux insecticides] a été aussi perçu comme un marqueur génétique entre les deux formes chromosomiques/moléculaires M et S (Diabaté *et al.*, 2003b; Awolola *et al.*, 2005). La mutation *kdr* serait un marqueur de la forme S, son passage dans la forme moléculaire M étant attribuée au phénomène d'introgession de ce gène de la forme S vers la M (Weill *et al.*, 2000). Mais toutes ces différenciations moléculaires ne seraient peut-être qu'une faiblesse d'un outil expérimental basé sur l'analyse de quelques séquences d'un génome qui est en réalité plus complexe. Le progrès en génomique pourrait, à court terme, permettre de mieux préciser la différenciation génétique entre ces deux formes à partir d'analyses plus détaillées des séquences.

2.2. Le cycle de développement des anophèles

Le cycle de développement comprend une phase pré-imaginale aquatique qui débute par la ponte d'oeufs (par centaines) dans une collection d'eau stagnante (figure 9). De ces œufs sortiront des larves de premier stade qui évolueront en stades L2, L3 et L4 avant de se transformer en nymphes. La durée du développement larvaire est très variable. Pour *An. gambiae*, elle est de moins de 10 jours dans les collections d'eau stagnante, temporaires, peu profondes, ensoleillées, faiblement chargées en matières organiques et où la température de l'eau dépasse 30°C (Christie, 1959).

La phase aérienne débute donc par l'émergence d'un moustique adulte ailé à partir de la nymphe. Cette phase aérienne est orientée avant tout vers la fonction de reproduction. La fécondation a lieu dans les heures ou les premiers jours qui suivent l'émergence. Les mâles forment des essaims dans lesquels les femelles de la même espèce viennent se faire féconder. Les femelles qui ont une durée de vie plus longue pouvant atteindre un mois ne sont en principe fécondées qu'une seule fois dans leur vie. Les femelles fécondées disposent donc à vie d'un stock de spermatozoïdes dans un organe spécialisé, la spermathèque. Les mâles peuvent s'accoupler plusieurs fois (Craig, 1963). Après fécondation, les femelles hématophages, cherchent pendant la nuit à se nourrir sur un hôte vertébré en fonction de leur préférence trophique. Le repas de sang est un facteur essentiel assurant l'apport protéinique permettant la maturation des ovocytes qui se termine par la ponte des œufs. Le cycle gonotrophique désigne l'intervalle de temps entre deux repas sanguins. La durée de ce cycle est de 1 à 5 jours en fonction des espèces et des conditions abiotiques. Pour *An. gambiae* s.l., ce cycle dure en moyenne de 2 à 3 jours.

Les mâles se nourrissent exclusivement de jus sucré pour assurer l'apport glucidique énergétique et ont une longévité plus réduite (de l'ordre de 10 jours à 2 semaines) avec une capacité de dispersion plus limitée. Le cycle de développement varie cependant suivant les espèces et les conditions abiotiques. Il est de l'ordre de 10 à 12 jours pour *An. gambiae* s.l. et peut durer environ 21 jours pour *An. funestus* (Gillies & De Meillon, 1968).

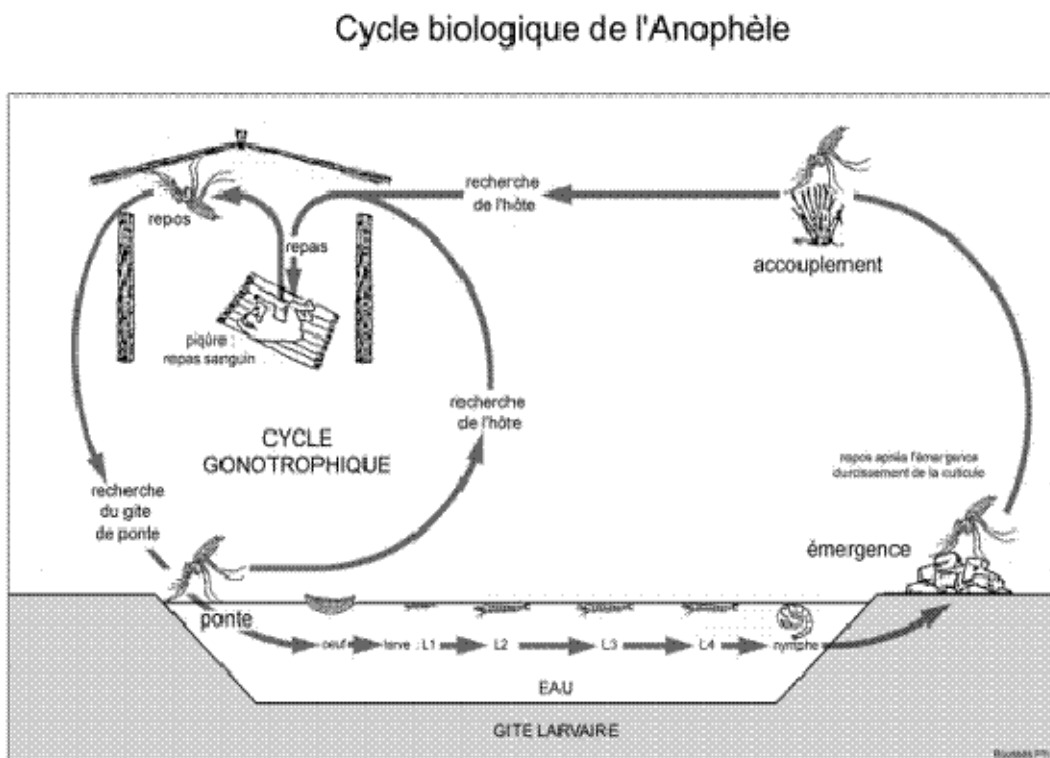


Figure 9 : Cycle de développement de l'anophèle d'après Philippe Boussés [UR016/IRD]



Illustration 11A: gîte typique à *An. gambiae* forme M (casier rizicole, mise en eau et repiquage de riz)



Illustration 11B: gîte typique à *An. gambiae* forme S (empreintes de pas d'animaux et fossés d'emprunt de briques)

2.3. De la barrière génétique entre les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*

Si toutes les études ont mis en évidence une forte barrière de reproduction entre ces deux formes moléculaires avec des hypothèses d'isolements pré-copulatoires plausibles, comment fonctionne donc cet isolement? La problématique de l'isolement reproductif entre M et S a été longuement et fait l'objet de nombreuses études (Coluzzi *et al.*, 2002; della Torre *et al.*, 2002; Fanello *et al.*, 2003). A l'instar de bons nombres d'espèces d'insectes, l'accouplement chez les anophèles et notamment *An. gambiae* a lieu dans des essaims aériens (illustration 12) qui fonctionnent comme un lieu de rencontre des partenaires sexuels (Sullivan, 1981). Pour la plupart des espèces dont les essaims précèdent l'accouplement, ceux-ci sont composés typiquement de mâles, les femelles y sont attirées, s'y introduisent, s'accouplent et les couples quittent l'essaim *in copula* (Cooter, 1989). La voie du comportement sexuel conduisant au choix du partenaire sexuel a été alors prospecté comme une des pistes pouvant élucider clairement l'isolement de reproduction pré-copulatoire entre ces deux formes moléculaires. Charlwood *et al.* (1979, 2002), par des travaux au laboratoire et plus tard par des observations en conditions naturelles en zone de sympatrie, ont montré qu'*An. gambiae*, afin d'éviter tout contact de reproduction avec les autres partenaires sexuels des autres espèces du complexe, essaieraient séparément à différentes hauteurs et à différentes heures.

Ceci lui évitait une éventuelle hybridation avec les autres espèces jumelles et explique le taux très faible d'hybrides observés sur le terrain. Cette hypothèse fut confirmée quelques décennies plus tard au sein des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. par Tripet *et al.* (2001) qui ont observé des accouplements sélectifs entre les deux formes sur le terrain. Ceci suggérait alors que la reconnaissance et l'attraction entre individus d'une même forme pouvaient reposer sur des stimuli tels que le bruit et la fréquence du battement alaire.

La morphologie sélective de l'armature génitale et les sécrétions des glandes sexuelles entre ces deux formes pourraient aussi être impliquées dans cette barrière pré-copulatoire. Les deux hypothèses basées sur la différence de bruit et de fréquence du battement alaire d'une part et sur la structure des organes et phéromones sexuels d'autre part, n'ont pu être vérifiées par la suite (Tripet *et al.*, 2001, 2003, 2004, 2005). Mais ces travaux ont confirmé l'existence d'une forte barrière pré-copulatoire quoique les mécanismes d'action conduisant au choix du partenaire sexuel restent encore à élucider.

Toutes ces hypothèses aussi pertinentes soient-elles n'ont été élaborées qu'à partir d'études de laboratoire ou sur des échantillons d'*An. gambiae* s.s. collectés en faune résiduelle (Tripet *et al.*, 2001, 2003, 2005). Les observations directes d'essaims d'*An. gambiae* s.s. ont été faites à Sao- Tomé par Charlwood *et al.* (2002) mais ils n'ont pu donner de détails sur les formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. Les premières observations en la matière furent réalisées par Diabaté *et al.* (2003a) dans une zone rizicole du Sud-Ouest du Burkina Faso dominée par la forme moléculaire M. Très logiquement ils n'ont pu observer et décrire que des essaims homogènes de la forme M ce qui ne pouvait élucider l'hypothèse d'évitement de partenaires sexuels d'espèce ou de formes différentes.

2.3.1. Hypothèse de l'isolement reproductif pré-copulatoire : Etude du comportement de reproduction des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* dans des essais en conditions naturelles à l'Ouest du Burkina Faso (cf. articles 7 et 8)

A la faveur d'une investigation poussée, nous avons observé, pour la première fois, des essais mixtes des deux formes dans une zone de sympatrie en savane humide de l'Ouest du Burkina Faso [article 7]. Quoique ces essais mixtes aient été rencontrés, l'analyse de la faune résiduelle collectée à la même période ne révélait pas la présence d'hybride M/S. Ceci renforçait l'hypothèse d'accouplement assortatif entre ces deux formes et donc d'un certain degré d'isolement reproductif [article 8].

Partant d'une série d'échantillonnages plus étoffée à l'Ouest du Burkina Faso, nous avons observé des essais mixtes en 2006 et 2007 dans la même zone de savane mais aussi dans le site rizicole où ils n'avaient été observés auparavant que des essais de la forme M. Ils ont été observés à une fréquence plus élevée qu'on ne s'y attendait avec des variations spatio-temporelles de la fréquence respective des deux formes. Des couples des deux formes ont été aussi collectés au sein des essais mixtes avec parmi eux quelques couples mixtes (mâle et femelle accouplées de formes différentes). Mais l'analyse du sperme contenu dans les spermathèques aussi bien des femelles prises *in copula* que celles prises en faune résiduelle a montré que celles-ci, même prises en accouplement mixte, étaient inséminées par des mâles de la même forme. Ces résultats confirment de toute évidence l'isolement reproductif et suggèrent l'existence de mécanisme spécifique de reconnaissance interne au sein d'un même essaim aboutissant au choix du partenaire sexuel de la même forme [article 8] et au-delà, des mécanismes empêchant la fécondation par une forme différente dans le cas rare des accouplements mixtes.

Ceci ouvre des perspectives de recherche sur les mécanismes biochimiques (protéines et phéromones) et/ou génétiques soutenant l'isolement reproductif entre ces deux formes moléculaires. En effet l'analyse des hydrocarbures cuticulaires a révélé une différence quoique non significative dans la composition de ces protéines au niveau des deux formes M et S provenant du Burkina Faso (Caputo *et al.*, 2007). Cette exploration pourrait être étendue au niveau des protéines et des phéromones sexuelles et surtout de leur fonction discriminative au sein des deux formes.



Illustration 12: essaim d'*An. gambiae* forme M au crépuscule dans le village rizicole de la Vallée du Kou (VK7)

Au niveau moléculaire, il a été montré que le comportement sexuel est sous le contrôle de gènes localisés dans le chromosome X (Yamamoto *et al.*, 1997). Les gènes *cac* (*cacophony*) et *per* (*period*) contrôlant le son ont pu être identifiés chez la drosophile variant entre espèces de drosophiles et de phlébotomes et seraient à la base de l'isolement reproductif dans le groupe de la Drosophile (Schilcher, 1977; Hall, 1994; Yamamoto *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2001; Lins *et al.*, 2002). Cette piste ouvre des voies de recherche sur les gènes homologues de reproduction au sein des deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*.

Si *a priori* aucune différence n'avait été trouvée dans les fréquences des battements alaires entre M et S (Tripet *et al.*, 2004), cette expérience ayant été réalisée dans des conditions très strictement expérimentales, une investigation plus poussée mérite d'être menée sur le terrain.

Bien que bon nombre d'études convergent à soutenir le caractère pré-copulatoire de l'isolement reproductif entre ces deux formes moléculaires, quelques travaux ont porté sur une différence d'adaptation ou de colonisation du milieu par l'une ou l'autre des formes donnant lieu à une répartition spatiale de l'exploitation des gîtes et donc du comportement de reproduction post-copulatoire (Touré *et al.*, 1998; Sagnon *et al.*, 2000).

2.3.2. Hypothèse d'isolement reproductif post-copulatoire: étude de la transplantation larvaire au Burkina Faso (cf. articles 9 et 10)

Pour vérifier l'hypothèse d'exploitation différentielle des gîtes larvaires par les deux formes moléculaires (écologie larvaire) nous avons initié une expérience de transplantation larvaire que nous avons conduite dans la zone de Bobo-Dioulasso. La transplantation a été réalisée dans un gîte lié à la saison des pluies (favorable à la forme S) et dans un casier rizicole (favorable à la forme M). Elle a montré, quel que soit le milieu de transplantation, qu'aucune différence notable n'était observée entre interaction du milieu et forme moléculaire. En d'autres termes, le milieu (favorable à M ou à S) n'a pas favorisé le développement sélectif de l'une ou de l'autre forme même quand elle se retrouvait dans un milieu qui n'était pas naturellement celui de sa prédilection [**article 9**]. Les conclusions de cette étude laissent croire que la barrière de reproduction serait pré-copulatoire. Mais des travaux très récents ont montré que dans les gîtes naturels, des prédateurs modulaient la répartition des populations de ces deux formes agissant ainsi comme un facteur d'isolement post-copulatoire des deux formes.

Il en résulte que les larves de la forme S (dont le développement est prépondérant dans les flaques d'eau liées à la saison des pluies) étaient les plus capturées par ces prédateurs en milieu rizicole. Celles de la forme M s'y échappaient grâce à des mécanismes de camouflage et d'évitement d'où leur abondance dans les faciès rizicoles [article 10].

En définitive, un ensemble de barrières pré et post copulatoires agirait (i) au niveau des gîtes larvaires avec les prédateurs comme régulateurs de formes moléculaires puis (ii) au niveau des mécanismes de reconnaissance à distance précédant la formation des essaims séparés comme l'attestent le nombre et la fréquence peu élevés des essaims mixtes et finalement (iii) en cas d'essaims mixtes, des mécanismes de reconnaissance au contact entre partenaires sexuels évitant la formation des couples mixtes puis des barrières inhibant l'insémination mixte en cas d'accouplement mixte comme l'ont montré nos derniers résultats. Cet ensemble de mécanismes très complexes donne *in situ* des variations spatio-temporelles importantes au niveau de la fréquence en essaims et couples mixtes.

2.4. Le groupe *Anopheles funestus*

Le groupe *funestus* trouve son intérêt du fait qu'il renferme une espèce, *An. funestus* s.s. qui est un des vecteurs majeurs du paludisme dans bon nombre de savanes africaines au même titre qu'*An. gambiae* s.s. Il comporte 8 à 10 espèces morphologiquement très proches et dont la différenciation au stade larvaire se fait sur des critères morphologiques très discrets: *An. funestus* s.s., *An. parensis* Gillies, *An. aruni* Sobti, *An. vaneedeni* Gillies & Coetzee, *An. rivulorum* Leeson, *An. brucei* Service, *An. confusus* Evan & Leeson, *An. fuscivenosus* Leeson, *An. lesoni* Evans et *An. fluviatilis* James selon la classification de Gillies et Coetzee (1987). La classification basée sur les critères de Harbach (1994) exclut *An. lesoni* et *An. fluviatilis* de ce groupe en les renvoyant dans le groupe *Minimus* qui comporte les espèces asiatiques.

Mais, du fait de sa présence dans les savanes africaines, *An. lesoni* a toujours été, dans les publications majeures en la matière, logiquement classé parmi les espèces africaines à la différence d'*An. fluviatilis* qui reste dans le groupe *Minimus* du fait de sa présence uniquement dans la péninsule arabique (Arabie saoudite et Yémen). A la lumière des progrès en biologie moléculaire, leur identification a été rendue possible et distincte à tous les stades de développement à partir d'une PCR multiplex (Koekemoer *et al.*, 2002 ; **[article 1]**).

2.4.1. Distribution des espèces du groupe *funestus* au Burkina Faso (cf. article 11)

Nous avons entrepris des séries d'échantillonnage et d'analyses moléculaires sur des populations du groupe *funestus* prélevées dans différents sites de l'Ouest du Burkina Faso suivant le protocole de Koekemoer *et al.* (2002) adapté par Cohuet *et al.* (2003). Ces travaux nous ont permis d'identifier comme membres de ce groupe présents dans l'Ouest du pays: *An. funestus* s.s., *An. lesoni* et *An. rivulorum*-like (en voie de validation comme nouvelle espèce). *An. funestus* s.s. est répartie du centre à l'Ouest du Burkina Faso, les deux dernières étant plus localisées à l'Ouest du pays **[article 11]**.

De toutes, *An. funestus* s.s. porte un intérêt en santé publique car seule espèce du groupe qui soit vecteur majeur du paludisme avec *An. rivulorum* qui lui n'a qu'un rôle très secondaire dans la transmission palustre (Wilkes *et al.*, 1996). Les autres espèces du groupe, plus exophiles se nourrissent sur des animaux et de ce fait ne transmettent pas les plasmodiums humains. *An. funestus* s.s. a une répartition très large s'étendant du Mali en Ethiopie, du Sénégal au Burkina Faso, du Cameroun en Afrique du Sud et de Madagascar aux Comores. Il a même été signalé à plus de 2 000m d'altitude en Ethiopie (Gillies & De Meillon, 1968).

Les larves d'*An. funestus* s.s. se développent dans des gîtes un peu plus spécifiques contrairement à *An. gambiae*, composés de retenues d'eau permanente à semi-permanente à eau claire avec une végétation haute ombrageant la surface de l'eau (illustration 13A).

Les gîtes larvaires à *An. funestus* peuvent être assez diversifiés mais les plus couramment rencontrés sont les bordures de rivières à faible débit et les mares.

A l'instar d'*An. gambiae* s.s., le polymorphisme chromosomique a été signalé par des études cytogénétiques dans les populations d'*An. funestus* par Green & Hunt (1980). Ces auteurs ont identifié et décrit les inversions sur le bras chromosomique 2R (2Ra, 2Rb, 2Rc, 2Rd), le bras chromosomique 3R (3Ra, 3Rb) et 3L (3La, 3Lb) à partir d'échantillons provenant d'Afrique du Sud, de l'Est et de l'Ouest. Si une répartition inégale des inversions avait été notée par zone, globalement elle n'avait été rattachée à aucune structuration particulière qui pouvait faire penser à un quelconque isolement reproductif de ces populations. Mais, les bases d'une éventuelle structuration génétique au sein des populations d'*An. funestus* étaient posées.

Ainsi, en 1994, au Burkina Faso et au Mali, il a été observé un fort déficit d'hétérozygotes en déséquilibre de Hardy-Weinberg⁶ et de liaison pour un certain nombre d'inversions polymorphes (2Ra, 3Ra, 3Rb, 3La) qui isolaient une forme standard d'une autre plus polymorphe. La forme standard du Burkina Faso se caractérisait par un comportement plus endophile et anthropophile avec des indices sporozoïtiques plus élevés. Ceci suggérait la coexistence de deux formes chromosomiques (Boccolini *et al.*, 1994). Quelques années plus tard, deux inversions complémentaires 2Rs et 2Rt ont été décrites au Burkina Faso (Boccolini *et al.*, 1998) et dont la première sera décisive pour la caractérisation des deux formes chromosomiques (Costantini *et al.*, 1999).

En effet, par une étude de grande envergure, Costantini *et al.* (1999) ont pu, à partir d'un algorithme (figure 10), regrouper ces inversions en deux formes chromosomiques nommées «Kiribina» et «Folonzo» confirmant l'hypothèse de coexistence de deux cytotypes. La forme «Kiribina» est principalement monomorphe avec des arrangements chromosomiques à faible fréquence caractérisée par l'inversion 2Rs.

⁶Une population est dite en équilibre de Hardy Weinberg si de grande taille, fermée i.e. sans immigration ni émigration, de reproduction sexuée, diploïde, panmictique, de générations non chevauchantes, ne subissant pas l'effet de la sélection naturelle et dans laquelle on peut ignorer les mutations

La forme «Folonzo» est plus polymorphe et caractérisée par les 3Ra, 3Rb, 3La et la 2Ra. Plus récemment, l'inversion 2Rs inféodée à la «Kiribina» a été observée à de très faibles fréquences dans la forme «Folonzo» et serait issue d'une hybridation occasionnelle avec la forme Kiribina (Guelbéogo *et al.*, 2005). La corrélation entre formes chromosomiques, la bio-écologie dont le comportement de piqûre, et la transmission du paludisme, a révélé la forme «Kiribina» plus exophile et zoophile avec un faible taux d'infection à *P. falciparum* par rapport à la forme «Folonzo». Cette étude venait donc compléter les résultats précédents mettant ainsi en évidence l'existence de deux formes chromosomiques au Burkina Faso dont la biologie et le rôle dans la transmission du paludisme pourraient différer.

2.4.2. Distribution des formes chromosomiques «Kiribina» et «Folonzo»⁷ dans les savanes à l'Ouest du Burkina Faso (cf. article 11)

Si les travaux de Costantini *et al.* (1999) et de Guelbéogo *et al.* (2005) ont permis de préciser les traits biologiques de ces formes chromosomiques, ils ont été principalement obtenus dans les zones aux alentours de Ouagadougou. Ils méritaient d'être vérifiés dans la partie Ouest du Burkina Faso avec un faciès éco-climatique plus humide. En effet, nous avons réalisé des études plus récentes entre 2001 et 2003 à l'aide de l'outil cytogénétique à l'Ouest du pays qui ont confirmé une répartition inégale de ces formes dans les différents écotypes de la zone.

La forme «Kiribina» a été trouvée exclusivement dans les aménagements hygro-agricoles de la Vallée du Kou où elle n'a presque jamais été collectée en faune résiduelle confirmant ainsi son caractère exophile. Par contre, en savane humide de Soumouso et de Lena les deux formes ont été trouvées en sympatrie toutefois avec une prédominance de la forme «Folonzo».

⁷«Kiribina» et «Folonzo» sont deux localités à l'Ouest du Burkina Faso qui ont donné leur nom aux formes chromosomiques mais la plupart des travaux se rapportant au comportement de ces deux cytotypes ont été réalisés dans la zone de Ouagadougou

Si au niveau du Burkina Faso, la structuration chromosomique permet très clairement de distinguer deux cytotypes, la situation ailleurs en Afrique de l'Ouest paraît un peu plus complexe. En effet au Sénégal, les arrangements de type Folonzo (3Ra, 3Rb et 2R) ont été trouvés quasiment seuls dans certaines localités tandis que dans d'autres, seuls les homokaryotypes (standard sur le bras 2R et 3R) ont été trouvés.

Le fait spécifique du Sénégal est qu'en plus de la forme standard (2R, 3R) correspondant à la forme «Kiribina» telle que assignée par l'algorithme, une autre forme a été trouvée dans une localité caractérisée par des inversions 3R avec la 2R quasi fixée. Ce deuxième arrangement qui correspond aussi à la forme «Kiribina» subdivisée, de ce fait, cette forme chromosomique en deux cytotypes. Mais le fait que ceux-ci n'aient pas été trouvés en sympatrie ne permet pas de valider définitivement l'existence de ces deux cytotypes. Ce qu'il faut retenir est qu'au moins les deux formes «Kiribina» et «Folonzo» rencontrées au Sénégal présenteraient de forts déficits d'hétérozygotes assez stables au cours des années (Lochouart *et al.*, 1998; Dia *et al.*, 2000).

En s'éloignant de l'Afrique de l'Ouest, les inversions chromosomiques présentent un profil moins structuré. En Afrique de l'Est et du Sud, du Kenya à Madagascar, de l'Angola au Mozambique, les inversions chromosomiques présentent aussi un polymorphisme (2Ra, 3Ra, 3Rb, 3La, 2Rh). Toutefois, aucun déséquilibre de Hardy-Weinberg n'a été mis en évidence (Kamau *et al.*, 2003; Sharakhov *et al.*, 2001; Boccolini *et al.*, 2002; 2005) ce qui rend l'application de l'algorithme présenté par Constantini confuse et non justifiée.

A l'instar de ce que fut la taxonomie chromosomique d'*An. gambiae* s.s. en Afrique de l'Ouest particulièrement au Burkina Faso et au Mali, les deux formes chromosomiques d'*An. funestus* pourraient sous-tendre un isolement reproductif entre les formes «Folonzo» et «Kiribina» déjà considérées comme deux entités en cours de spéciation.

Ce schéma n'est évidemment pas valable pour toute l'Afrique telles que l'ont montrée les études citées ci-avant.

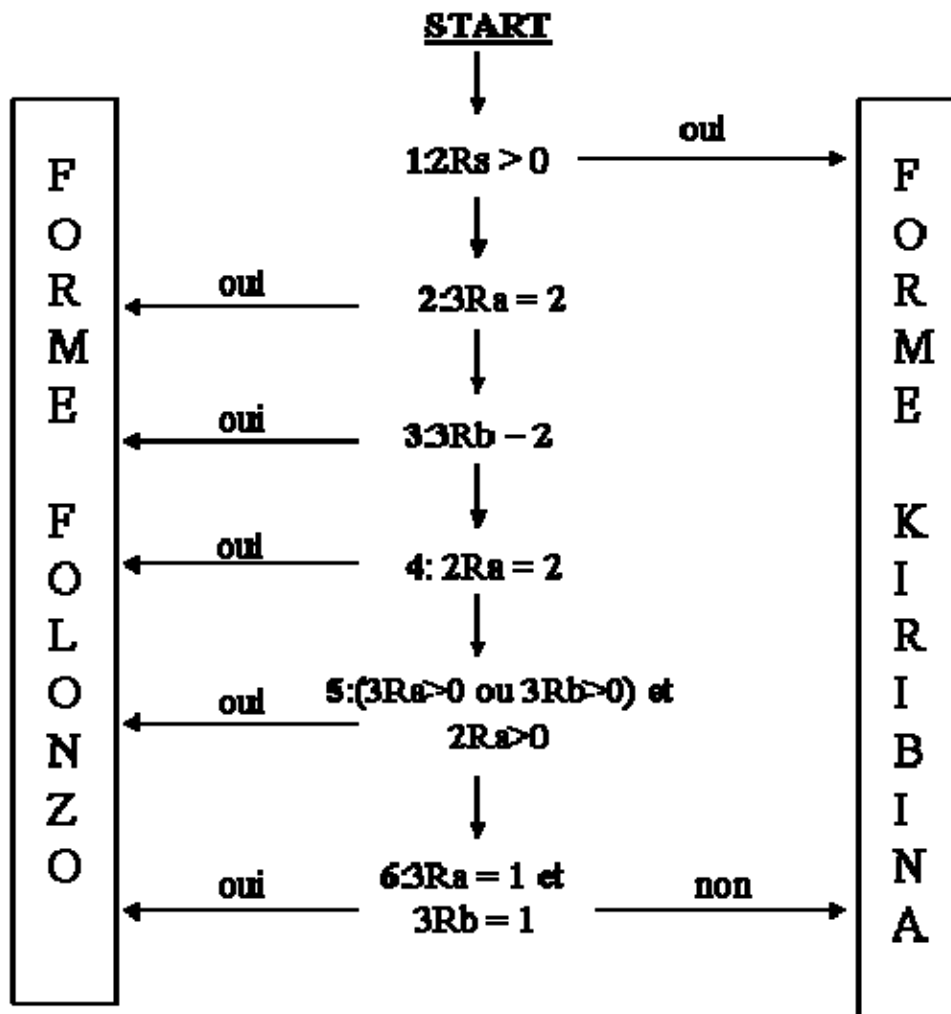


Figure 10: Diagramme de l'algorithme employé pour assigner les différentes inversions chromosomiques décrites chez *An. funestus* s.s. aux deux formes « Folonzo » et « Kiribina » selon Costantini *et al.* (1999)

2.5. Les autres vecteurs

Plusieurs espèces jouent un rôle secondaire à localement soutenu dans la transmission du paludisme en Afrique: *An. nili*, *An. moucheti*, *An. mascarensis*. *An. nili* est considéré comme un vecteur majeur dans certaines zones forestières de l'Afrique Centrale (Awono *et al.*, 2004) et de l'Ouest (Adja *et al.*, 2006) mais ne joue qu'un rôle de vecteur secondaire dans les savanes humides très boisées à l'Ouest et au Sud-Ouest du Burkina Faso [articles 11 & 12].

Des travaux récents ont décrit le rôle de vecteur majeur que pouvait assurer localement *An. moucheti* dans la transmission du paludisme au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002). *An. mascarensis* transmet le paludisme à Madagascar où elle vit en sympatrie avec *An. gambiae* s.s. et *An. merus* dans certaines localités du littoral (Fontenille & Campbell, 1992).

Au Burkina Faso, par nos travaux repris dans les articles 11 et 12, nous avons montré qu'*An. nili* était principalement localisé dans les savanes boisées et humides à l'Ouest et au Sud-Ouest du pays du fait notamment de la spécificité de ses gîtes larvaires (illustration 13B). Son rôle dans la transmission du paludisme y est très minime mais il est plus actif dans la partie sud-Ouest du pays avec des indices sporozoïtiques (IS) pouvant atteindre 30% à Gaoua.



Illustration 13A : gîte typique à *An. funestus* (mare semi-permanente couverte de végétation dressée par endroits à Soumouso (Cliché IRSS/Centre Muraz)



Illustration 13B : gîte typique à *An. nili* (bord d'un cours d'eau couvert de végétation à Soumouso (Cliché IRSS/Centre Muraz)

2.6. La distribution des vecteurs au Burkina Faso (cf. articles 2, 3, 6, 11 et 12)

Nos travaux présentés dans les articles 2 et 6 ont contribué à améliorer les connaissances sur la distribution des vecteurs à l'échelle nationale. Cette distribution peut maintenant être représentée par une cartographie. Toutefois, il est nécessaire de disposer d'une cartographie dynamique et régulièrement mise à jour car la distribution des vecteurs est sujette au changement climatique et surtout localement aux facteurs anthropiques.

Au Burkina Faso, la répartition géographique des vecteurs dans leur ensemble varie en premier lieu en fonction des faciès éco-climatiques (figure 11). Mais d'autres facteurs de second niveau notamment anthropiques en l'occurrence les aménagements hydro-agricoles et l'urbanisation modulent la répartition des ces espèces au sein de ces grands ensembles. La diversité et la complexité des vecteurs varient ainsi suivant un gradient de l'Ouest au Nord (figure 12). Le Nord correspondant à la zone sahélienne est caractérisé par *An. gambiae* s.l. avec paradoxalement une prédominance d'*An. gambiae* forme M (>95%) par rapport à *An. arabiensis* (<5%) (figure 13). Cette situation paradoxale où *An. arabiensis* devrait être présent à 95% s'explique surtout du fait des nombreux aménagements hydro-agricoles réalisés par l'Etat burkinabé dans cette zone depuis une dizaine d'années. Ceci ne traduit pas forcément un changement dans la répartition globale de ces vecteurs où logiquement *An. arabiensis* reste toujours le vecteur prépondérant dans le milieu sahélien naturel.

La zone soudano-sahélienne est caractérisée par un mélange plus ou moins équilibré des 3 espèces: *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis* et *An. funestus*. Cependant, *An. arabiensis* prédomine de l'est vers le centre. La présence d'*An. funestus* a été remarquée aux abords des petits cours d'eau et mares permanentes qui parsèment une grande partie du plateau central mossi. *An. nili* a été aussi rencontré le long de quelques cours d'eau et de quelques ruisseaux à une fréquence de moins de 5%. Localement la ville de Ouagadougou, jadis dominée par *An. gambiae* s.s. (>50%), est maintenant dominée par *An. arabiensis* (60%).

A l'Ouest, dans la zone soudanaise, *An. arabiensis* est plus rare, se rencontrant à de faibles fréquences, souvent moins de 10%. Cette partie du pays est caractérisée essentiellement par un complexe vectoriel incluant *An gambiae* s.l. (60%), *An. funestus* (37%) et *An. nili* (<5%). Cette dernière espèce est plus concentrée dans les savanes très boisées et humides du Sud-Ouest où elle a représenté 30% des anophèles pris en capture sur homme en 2003 dans la zone de Gaoua (Dabiré, obs. pers.).

Globalement, les vecteurs du paludisme sont dominés au Burkina Faso par *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* s.s. avec un rôle important aussi joué par *An. arabiensis* au centre et à l'Est et *An. nili* au Sud-Ouest (figure 12).

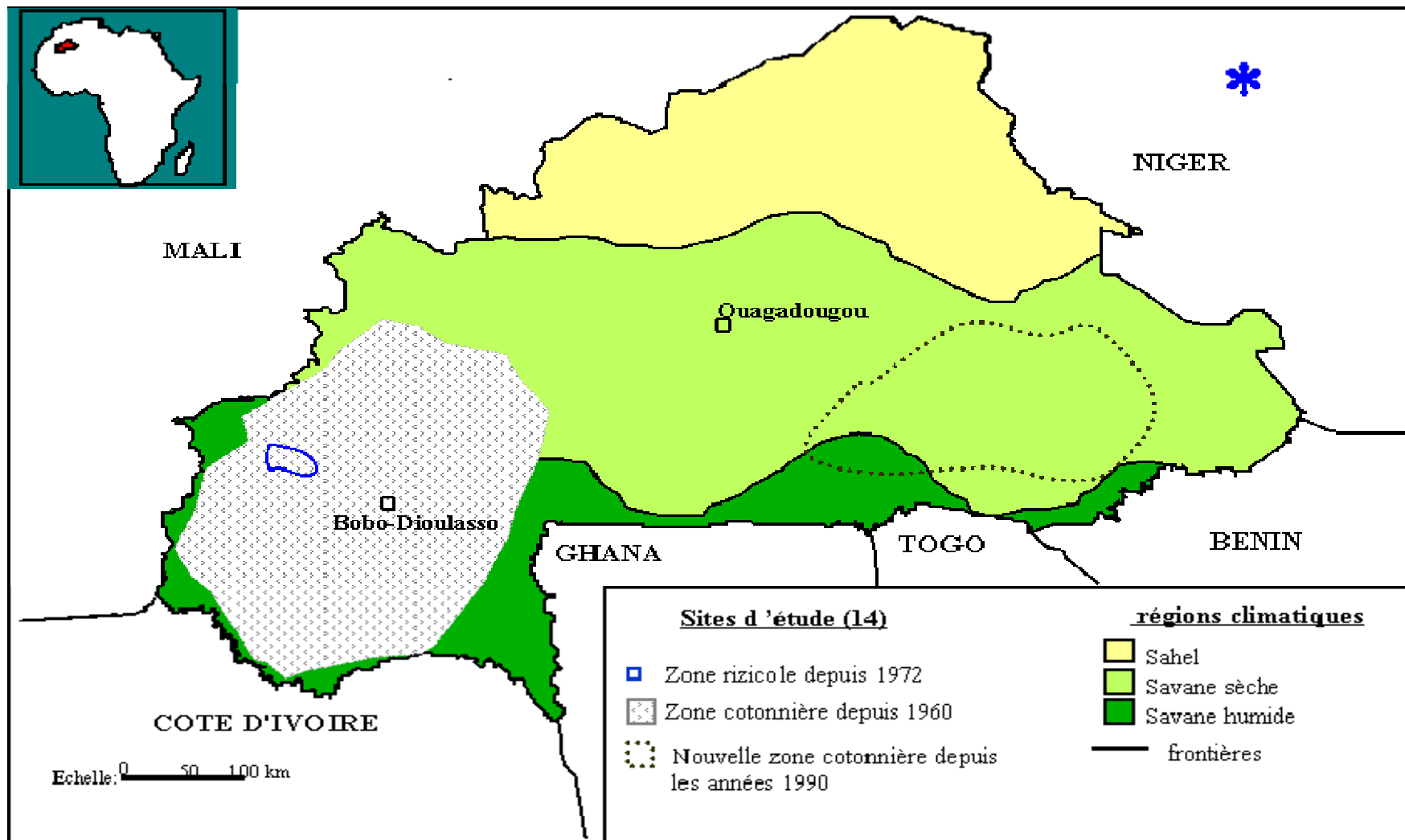


Figure 11: Cartographie du Burkina Faso représentant les grandes zones éco-climatiques où notre étude a été réalisée

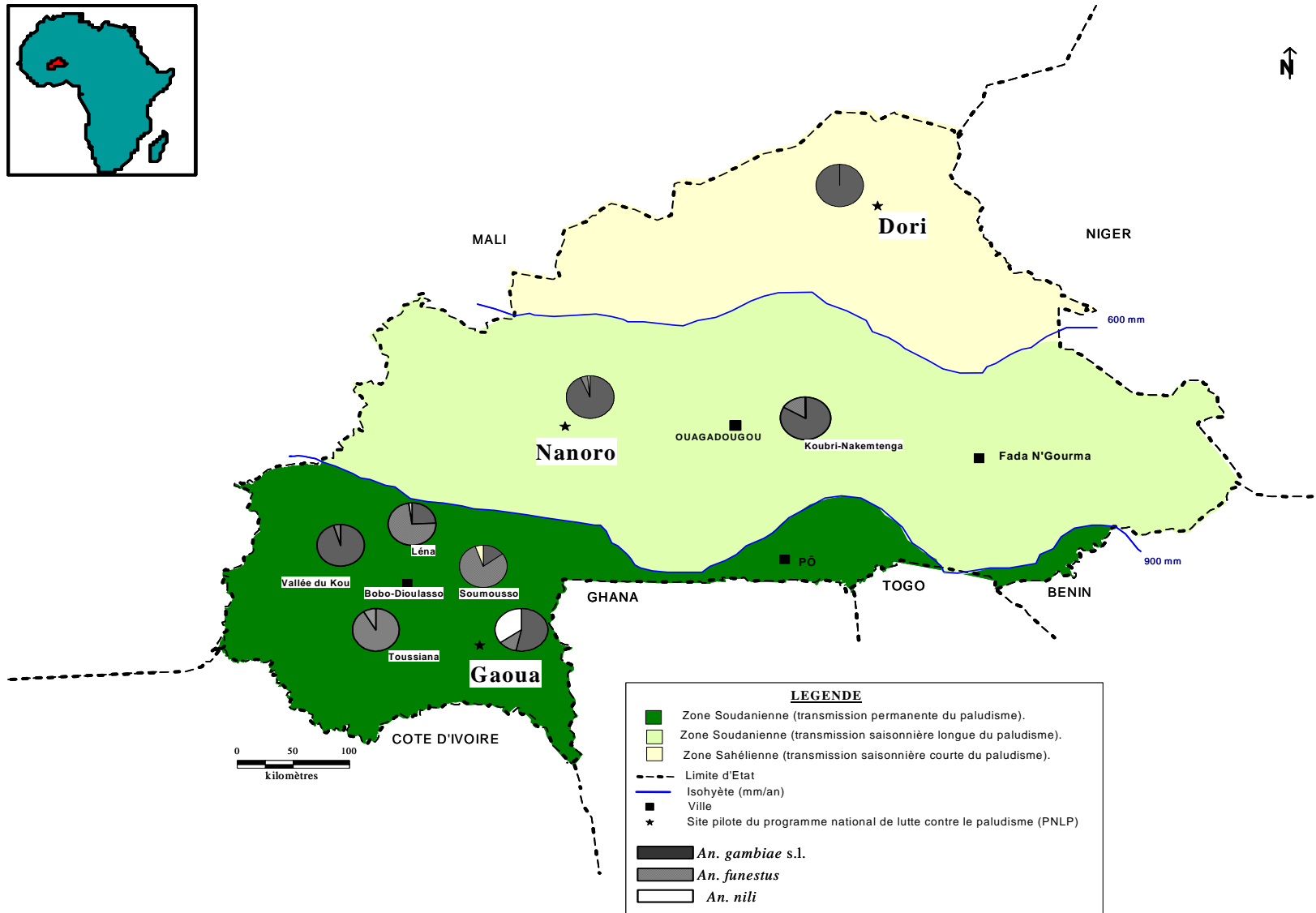


Figure 12: Répartition des vecteurs du paludisme au Burkina Faso [résultats des sites pilotes du Programme national de Lutte contre le Paludisme auxquels nous avons rajouté des données obtenues à la même période d'étude dans différents sites à l'Ouest du Burkina Faso]

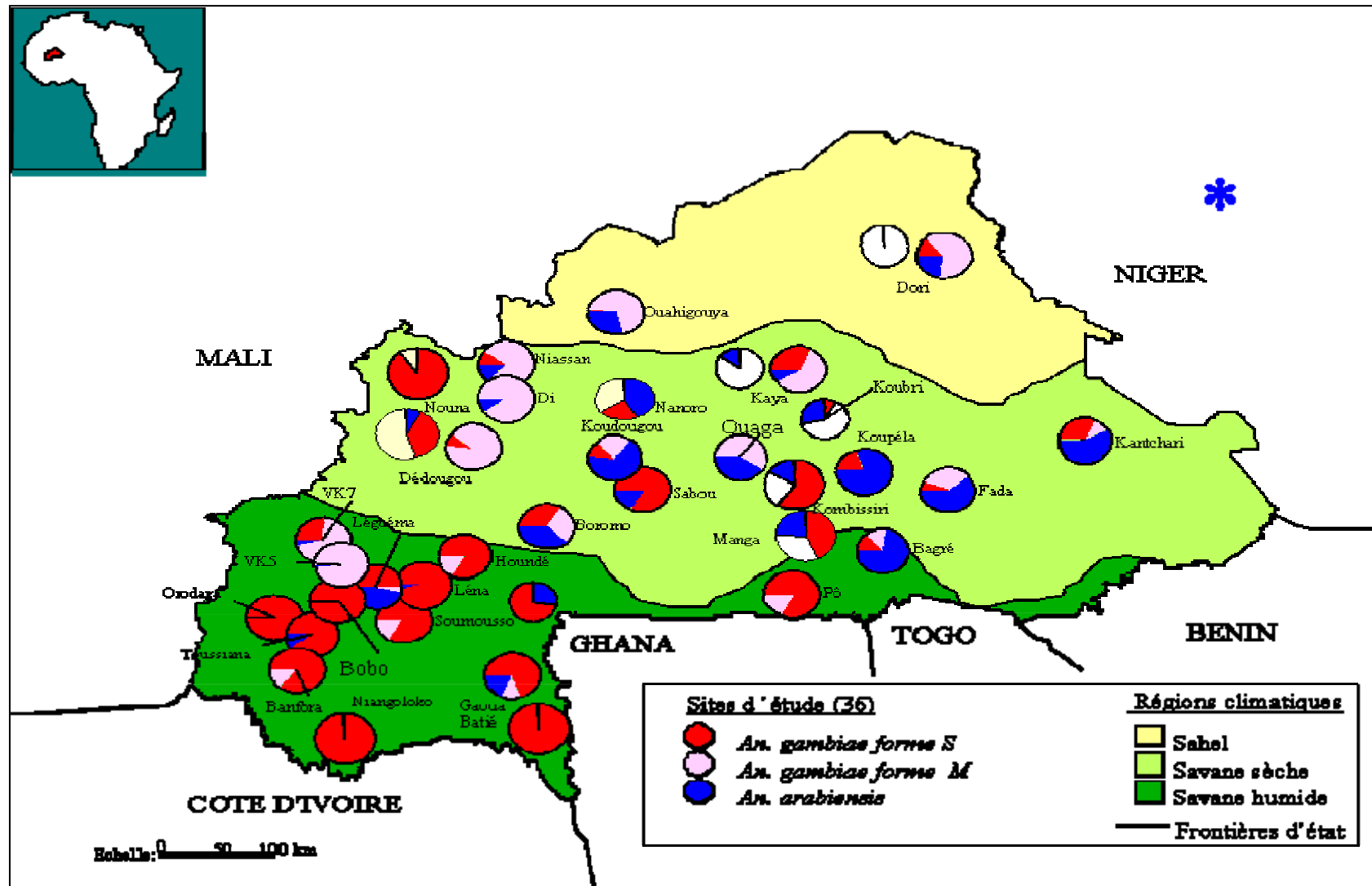


Figure 13: Répartition géographique d'*An. gambiae* s.l. et des formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s.
 [Diabaté *et al.*, 2004 réactualisé par Dabiré *et al.*, 2007 (cf. article 6)]

CHAPITRE 3: LA TRANSMISSION DU PALUDISME

La transmission du paludisme implique trois facteurs, l'homme, le parasite et le vecteur. Les facteurs « homme » et « parasite » ne sont pas limitants, l'homme étant présent sur toute la planète et le parasite pouvant infecter l'homme partout où le climat est favorable au développement de son cycle sporogonique. Seuls les vecteurs qui occupent une aire géographique bien déterminée en colonisant des gîtes particuliers liés à leur bio-écologie, déterminent le rythme, l'intensité et la durée de la transmission. Cependant l'activité de l'homme peut aussi influencer de façon notable ces facteurs de transmission du paludisme. Du fait de la diversité des vecteurs et de leur aire géographique, le paludisme présente aussi une grande biodiversité qui est bien traduite dans son épidémiologie. Quoique présent dans toutes les zones tropicales, le paludisme est plus inféodé dans les zones afro-tropicales découpées en plusieurs faciès épidémiologiques suivant les schémas de transmission.

3. 1. Les *Plasmodium*

Quatre espèces plasmodiales humaines circulent dans le monde: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. vivax*. Ce dernier ne se rencontre que dans quelques groupes ethniques d'Afrique subsaharienne notamment en Afrique de l'Est. En fait les populations noires d'Afrique et d'Amérique qui ne possèdent pas l'antigène Duffy sont naturellement réfractaires à *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976). De ce fait cette espèce plasmodiale est rencontrée en Afrique à une prévalence ne dépassant pas 1% (Mouchet *et al.*, 2004). Quoique des multi-infections soient souvent rencontrées, *P. falciparum* est la plus virulente et la plus répandue en Afrique subsaharienne (Burkot *et al.*, 1987; Anonyme, 1988).

La prévalence des gamétocytes dans la population humaine (en l'absence de tout réservoir animal) détermine fondamentalement l'intensité de la transmission du paludisme. On constate une grande variabilité de la prévalence surtout à *P. falciparum* au sein de la population humaine vivant dans les mêmes zones d'endémie comme c'est le cas en Afrique de l'Ouest (figure 14). Les gamétocytes sont le stade plasmodial ingéré par le moustique lors de sa prise de repas de sang. Le pouvoir infectieux d'un individu pour l'anophèle dépend de sa charge gamétocytaire dans le sang. Expérimentalement 300 gamétocytes par microlitre de sang sont suffisants pour obtenir une infection sur membrane à des taux régulièrement avoisinant 70% chez le moustique (Graves, 1980).

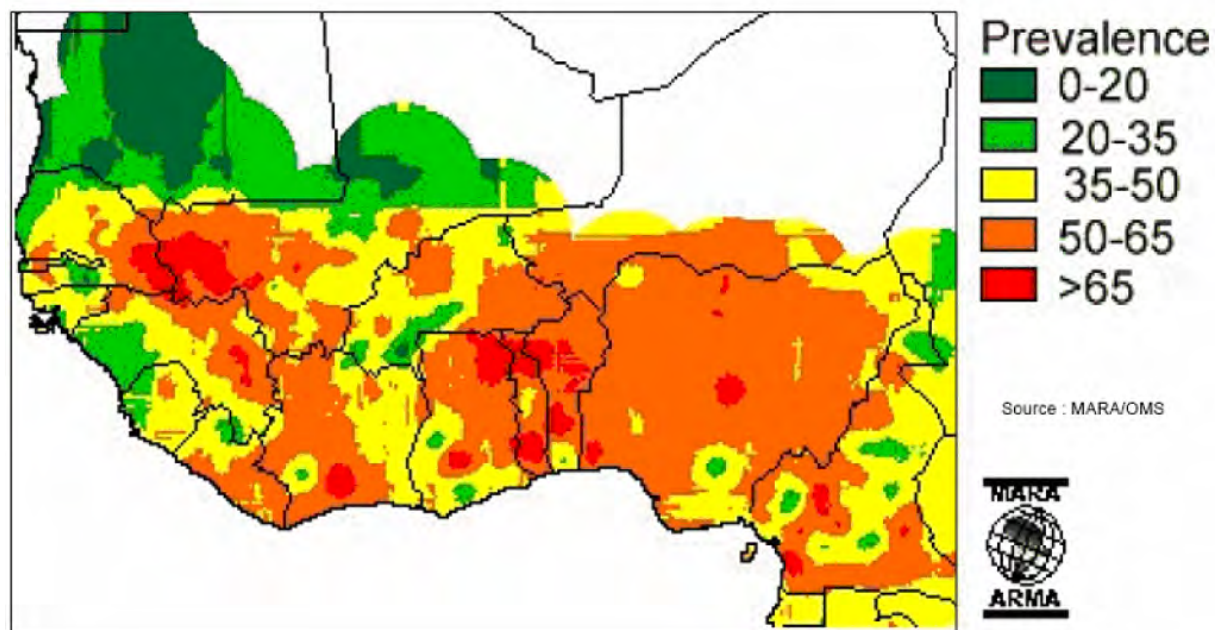


Figure 14: Prévalence de *P. falciparum* en Afrique de l'Ouest (source OMS/MARA)

3.2. Les cycles de développement du *Plasmodium*

Chez l'homme

Lors d'une piqûre infectante, le moustique injecte à son hôte le parasite qui se présente sous forme d'éléments fins uninucléés (10µm), les sporozoïtes. Après un court passage dans le sang où ils ne subissent aucune transformation, ils gagnent les cellules hépatiques dans lesquelles ils pénètrent et se multiplient par division cellulaire. Le noyau de chaque sporozoïte se divise un très grand nombre de fois et forme un schizonte géant encore appelé «corps bleu» qui contient près de 400 000 noyaux chez *P. falciparum* et de 10-15 000 pour les autres espèces. Chaque noyau s'entoure de cytoplasme. Cette phase de division cellulaire dure de 10 à 15 jours environ et constitue la durée d'incubation du paludisme: c'est la phase exoérythrocytaire.

Les hépatocytes éclatent et libèrent les schizozoïtes uninucléés encore appelés mérozoïtes qui envahissent les hématies. Notons que chez *P. vivax* et *P. ovale*, des schizontes restent en vie ralentie d'où le nom de hypnozoïtes qui leur est donné. Ils sont responsables de rechutes.

Le schizozoïte qui pénètre dans une hématie prend la forme d'un anneau, le trophozoïte qui se nourrit d'hémoglobine. La grosse vacuole nutritive du trophozoïte refoule en périphérie le cytoplasme et le noyau de celui-ci et est remplie d'hemozoïne ou pigment malarique qui est le produit de dégradation de l'hémoglobine. Une série de division nucléaire donne des noyaux qui s'entourent d'une bande cytoplasmique. On a alors un schizonte mûr ou «corps en rosace» avec de 18 à 32 schizozoïtes pour *P. falciparum*, 16-24 pour *P. vivax*, 8-16 pour *P. ovale* de 6-12 pour *P. malariae*. L'hématie parasitée éclate, les schizozoïtes ou mérozoïtes sont libérés et le pigment se déverse dans le sang: c'est l'accès palustre. Ils vont parasiter d'autres nouvelles hématies et le cycle asexué recommence.

Le temps qui s'est écoulé entre la pénétration d'un parasite dans une hématie et son éclatement est de 48 heures pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum* (fièvre tierce) et de 72h pour *P. malariae* (fièvre quarte): c'est la phase érythrocytaire.

Après plusieurs cycles asexués érythrocytaires, certains schizozoïtes au lieu d'évoluer en schizontes se transforment en gamétocytes mâles et femelles qui sont les formes sexuées du *Plasmodium*. Ceux-ci vont rester dans le sang périphérique et ne peuvent poursuivre leur évolution que chez l'anophèle vecteur. Le sujet devient alors un «réservoir de parasites».

Chez l'anophèle

Seule la femelle du genre *Anopheles* est susceptible de transmettre le paludisme à l'homme. Elle s'infecte à la faveur d'un repas de sang pris sur un sujet infesté porteur de gamétocytes. Elle absorbe différents stades du parasite. Les éléments asexués, les trophozoïtes et schizontes sont tous digérés. Seuls les gamétocytes poursuivent leur développement. La transformation des gamétocytes en gamontes survient dans le quart d'heure qui suit leur ingestion par l'anophèle femelle lors du repas de sang. Une trentaine de minutes après la prise de sang, ceux-ci évoluent rapidement en micro et macrogamètes sexués. Le cas marquant de ce cycle réside du fait que la fécondation des plasmodiums (i.e. la fusion des gamètes) qui permet la pérennisation du parasite se déroule chez le vecteur et non chez l'hôte vertébré. Il constitue de ce fait le pivot de l'épidémiologie du paludisme. La fusion des gamètes donne un zygote mobile ou ookinète qui quitte la lumière de l'estomac juste avant la formation de la membrane péritrophique. L'ookinète localisé dans la paroi externe de l'estomac du moustique s'accroît et se transforme en oocyste renfermant plusieurs sporoblastes qui évoluent en sporozoïtes immatures. Ces derniers, par les mouvements, fragilisent la membrane de l'oocyste qui cède et les libère dans l'hémolymphe.

Les sporozoïtes immatures migrent dans divers tissus du moustique mais préférentiellement dans les glandes salivaires où ils s'accumulent et acquièrent leur stade infectieux. Ils seront injectés lors de la prochaine piqûre du moustique, faisant ainsi démarrer le cycle sporogamogonique chez l'homme. Le cycle sporogonique du *Plasmodium*, chez l'anophèle, dure environ 10 à 25 jours et ce, en fonction de l'espèce plasmodiale et de la température (figures 15 et 16).

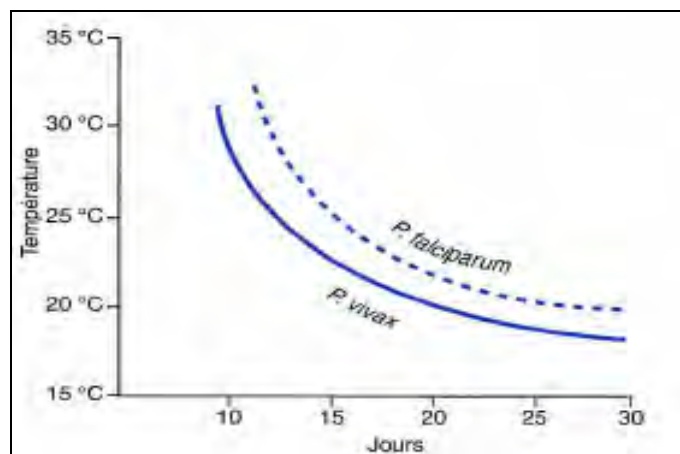


Figure 15: Durée du cycle extrinsèque de *P. falciparum* et de *P. vivax* chez les anophèles (in Mouchet *et al.*, 2004)

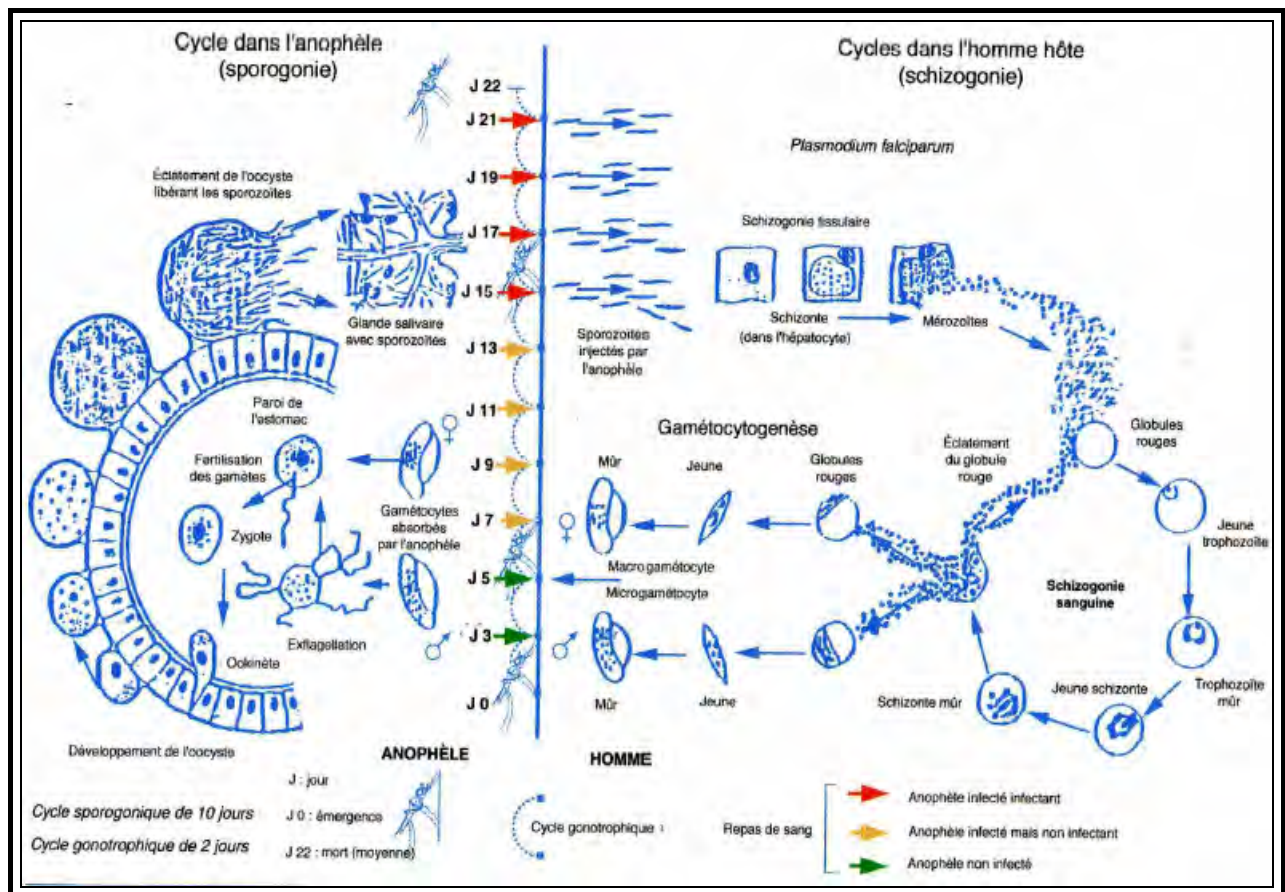


Figure 16: Cycles biologiques de *Plasmodium* (in Mouchet *et al.*, 2004)

3.3. La mesure de la transmission

La mesure de la transmission palustre repose sur le taux d'inoculation entomologique (TIE) ou «Entomological Inoculation Rate» (EIR) en anglais. Le TIE ou EIR est le nombre de piqûres d'anophèles infectés reçues par homme et par unité de temps: $h=ma.s$. Il est relativement simple d'application car faisant intervenir seulement deux paramètres: le nombre moyen d'anophèles piquant un homme par unité de temps (**ma**), et l'indice sporozoïtique (**s**) ou sporozoitic index en anglais (SI) qui est le pourcentage d'anophèles infectés (qui ont des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires). Le paramètre « ma » correspond en fait au «taux quotidien de piqûres généralement de 24h» ou «Human Biting Rate (HBR)».

On a donc dans ce paramètre « ma » à la fois la densité anophélienne (m) et l'indice d'anthropophilie (a) car seuls les moustiques se nourrissant sur l'homme sont considérés ce qui est estimé directement *in situ* par les captures sur sujets humains. Par contre pour les piégeages, il est indispensable d'introduire la notion d'indice d'anthropophilie (a).

En pratique, la mesure de ces paramètres paraît simple mais demande une extrême rigueur. La mesure de la densité se fait sur des sujets humains utilisés comme de « l'appât » humain suppléant le rôle de dormeurs qui recevraient des piqûres par unité de temps. Dans nos études, ces sujets ont toujours été mis sous prophylaxie antipalustre suivant les recommandations de la cellule locale de gestion de la chimioprophylaxie. La mesure de l'indice sporozoïtique jadis réalisée par observation au microscope de la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires est maintenant remplacée par la technique immunologique basée sur les ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbant Assay). Cette technique initialement mise au point avec *P. falciparum* (Burkot *et al.*, 1984) peut maintenant détecter les sporozoïtes de *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale* car les anticorps monoclonaux antisporozoïtes des quatre espèces plasmodiales sont disponibles et utilisés (Wirtz *et al.*, 1987; Burkot *et al.*, 1988; Beir *et al.*, 1988). Elle est sensible, spécifique de l'espèce plasmodiale et assez reproductible et possède de fait les mêmes qualités de base que la technique standard basée sur l'observation directe au microscope. Quelques cas rares de faux positifs dus à la présence d'antigènes sporozoïtiques dans les thorax de certains moustiques ont été observés en ELISA (Robert *et al.*, 1988a). Ceci ne compromet en rien la validité de cette technique reconnue comme un progrès réel pour l'entomologie médicale et qui permet alors de contourner les contraintes de la dissection des glandes salivaires.

Bien que la méthode de capture sur appâts humains soit très fiable et reproductible, elle est de plus en plus abandonnée pour des raisons d'éthique au profit de l'utilisation de pièges lumineux standardisés (Githeko *et al.*, 1994; Smith, 1995).

Le plus utilisé est le piège CDC avec ou sans adjonction de CO₂ (Mathenge *et al.*, 2004a & b). Ces pièges n'apportent pas toute la précision des captures sur sujets humains mais reflètent des tendances corrélables à la technique standard avec des résultats appréciables. Toutes ces méthodes d'échantillonnage (captures sur sujets humains ou différentes techniques de piégeage) ne sont en fait que des mesures relatives du contact homme-vecteur par unité de temps. L'essentiel est de standardiser ces méthodes et les utiliser rigoureusement afin d'aboutir à des comparaisons temporelles (même site d'échantillonnage à différents moments) et/ou spatiales (sites différents au même moment). L'indice sporozoïtique peut être aussi évalué sur la faune résiduelle par la récolte de femelles au repos le matin dans les habitations (fraction endophile de la population d'anophèles) ou dans des abris extérieurs (fraction exophile) au moyen d'aspirateurs manuels ou électriques ou par pulvérisations d'insecticides non rémanents (pyrèthre). Cependant les données ainsi obtenues doivent être ajustées aux densités, aux préférences trophiques et aux comportements de repos des populations anophéliennes.

3.4. La typologie du paludisme - Les stratifications de la transmission

3.4.1. Notion de faciès épidémiologiques primaires

L'analyse des différentes modalités de transmission du paludisme a conduit à classifier l'endémicité du paludisme en deux types: i) le type endémique à transmission permanente et (ii) le type épidémique à transmission sporadique (OMS, 1964). Entre les deux grands groupes se situent deux types de paludisme à transmission saisonnière plus ou moins longue selon que la période de transmission dure plus ou moins de 6 mois (figure 17). Cette classification est basée sur l'intensité et la saisonnalité de la transmission du paludisme en Afrique subsaharienne (figure 18) mais prend aussi en compte la notion de prémunition. En effet avec l'âge et après plusieurs contacts successifs homme-parasite, s'installe peu à peu une prémunition qui est une tolérance à l'infection faisant intervenir des mécanismes de résistance à l'infection dont l'immunité anti-parasite. On peut ainsi établir une relation entre la transmission et le paludisme-maladie. Le paludisme n'étant pas une maladie immunisante à l'instar d'un arbovirus comme la fièvre jaune, la prémunition se développe lentement et est fonction: i) du nombre de contaminations que l'on reçoit (piqûres infectées) ii) des fréquences des contaminations (saisonnalité de la transmission) et enfin iii) des facteurs génétiques. En zone de transmission élevée la prémunition est acquise vers 5-6 ans tandis qu'en zone de transmission faible elle n'est jamais acquise et même les adultes peuvent développer un paludisme grave.

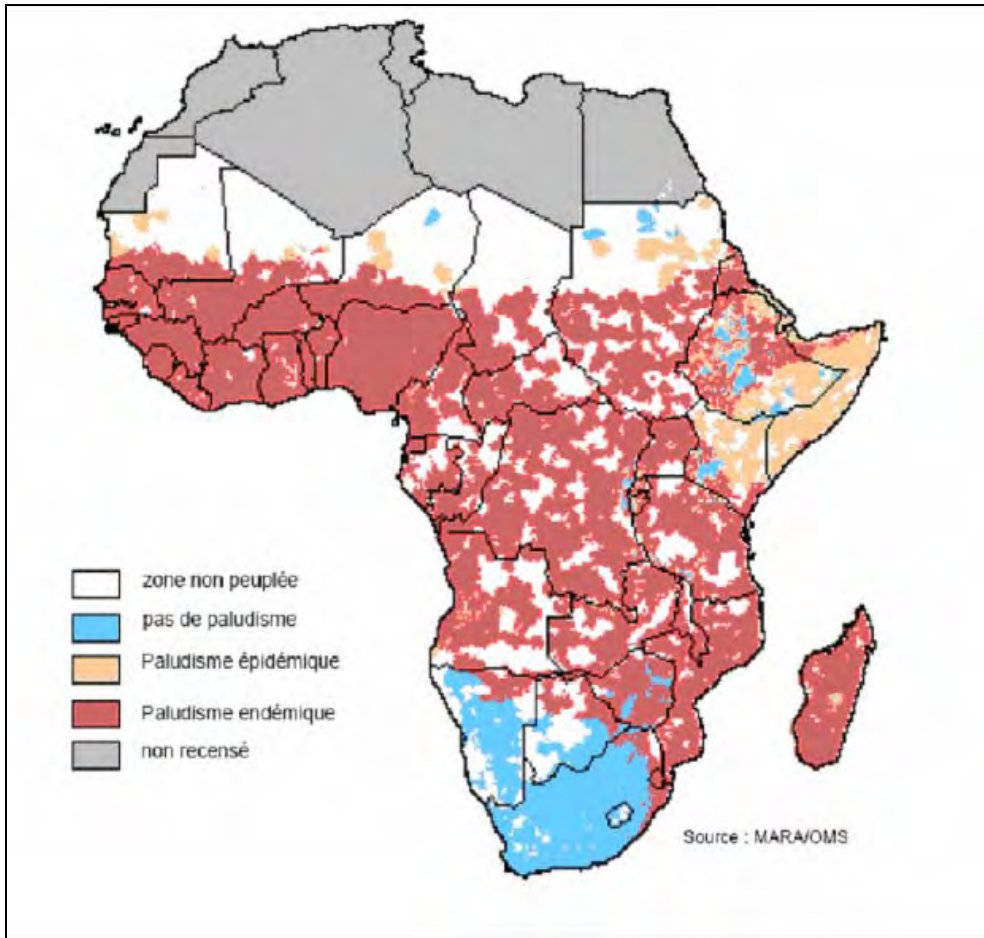


Figure 17 : Endémicité du paludisme en Afrique (Source OMS/MARA)

Dans le souci d'intégrer le caractère dynamique de la transmission en fonction de la variation du milieu (Carnevale *et al.*, 1988b), il a été introduit la notion de faciès épidémiologiques⁸ qui chevauchent des zones géographiques bien déterminées. Il a été ainsi proposé une classification des zones d'endémie du paludisme en Afrique (mais applicable aussi dans les autres parties du monde notamment en Asie) en faciès épidémiologiques primaires (figure 19) qui traduit mieux la diversité du paludisme (Mouchet *et al.*, 1993). Ces faciès primaires peuvent être groupés en strates épidémiologiques suivant l'endémicité du paludisme :

⁸Un faciès épidémiologique du paludisme est un ensemble de lieux dans lesquels le paludisme présente les mêmes caractéristiques de transmission, de développement de l'immunité et de manifestations de la maladie

• **Stable correspondant aux faciès:**

- **Equatorial** observé dans les forêts équatoriales, les forêts dégradées et les savanes humides post forestières. La transmission y est pérenne avec comme principaux vecteurs, *An. gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. La prémunition est forte et précoce dès l'âge de 5 ans. La morbidité est de 30-50% et étalée sur toute l'année.

- **Tropical** observé dans les savanes humides où la transmission est saisonnière et longue de plus de 6 mois avec une prémunition plus tardive acquise autour de 10 ans. Les principaux vecteurs sont *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. funestus* et *An. nili*. Les cas fébriles sont de 30-50% et augmentent pendant la saison humide qui correspond à la période de transmission.

• **Intermédiaire correspondant au faciès:**

- **Sahélien** observé dans les savanes sèches et les steppes des zones sahéliennes. La transmission est courte de moins de 6 mois. Les principaux vecteurs sont *An. arabiensis*, *An. gambiae* s.s. et *An. funestus*. La morbidité y est élevée de l'ordre de 70% et les cas fébriles sont notés quasiment pendant la saison des pluies (saison de transmission). La prémunition est longue à s'établir et due à la irrégularité de la transmission.

• **Instable ou épidémique correspondant aux faciès:**

- **Désertique** des steppes sahélo-sahariennes et des déserts de la corne de l'Afrique; la transmission est très courte ou aléatoire avec de grandes variations d'une année à une autre; les principaux vecteurs sont *An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s.; la prémunition est faible avec potentiellement des risques d'épidémies qui pourraient survenir dans cet écotype peu connu.

- **Austral** des plateaux du sud de l'Afrique (Afrique du Sud, Swaziland, Botswana, Namibie, Zimbabwe, Zambie, Mozambique) avec une transmission saisonnière courte interrompue par l'hiver qui prolonge la longue saison sèche. Dans ces zones le principal vecteur est *An. arabiensis* avec *An. funestus* qui joue un rôle très local; l'immunité est très précaire avec possibilité d'épidémisation.

- **Montagnard** entre 1 000-2 000m d'altitude caractérisé par une courte transmission aléatoire limitée par les basses températures et les pentes défavorables aux gîtes larvaires. On y trouve *An. funestus* et *An. arabiensis*. L'immunité est très faible voire absente avec des épidémies violentes (Burundi, Madagascar). La transmission dans ces zones est influencée par de grandes variations inter-annuelles de températures et de pluviométrie exacerbées ces dernières années par le contexte de réchauffement climatique.

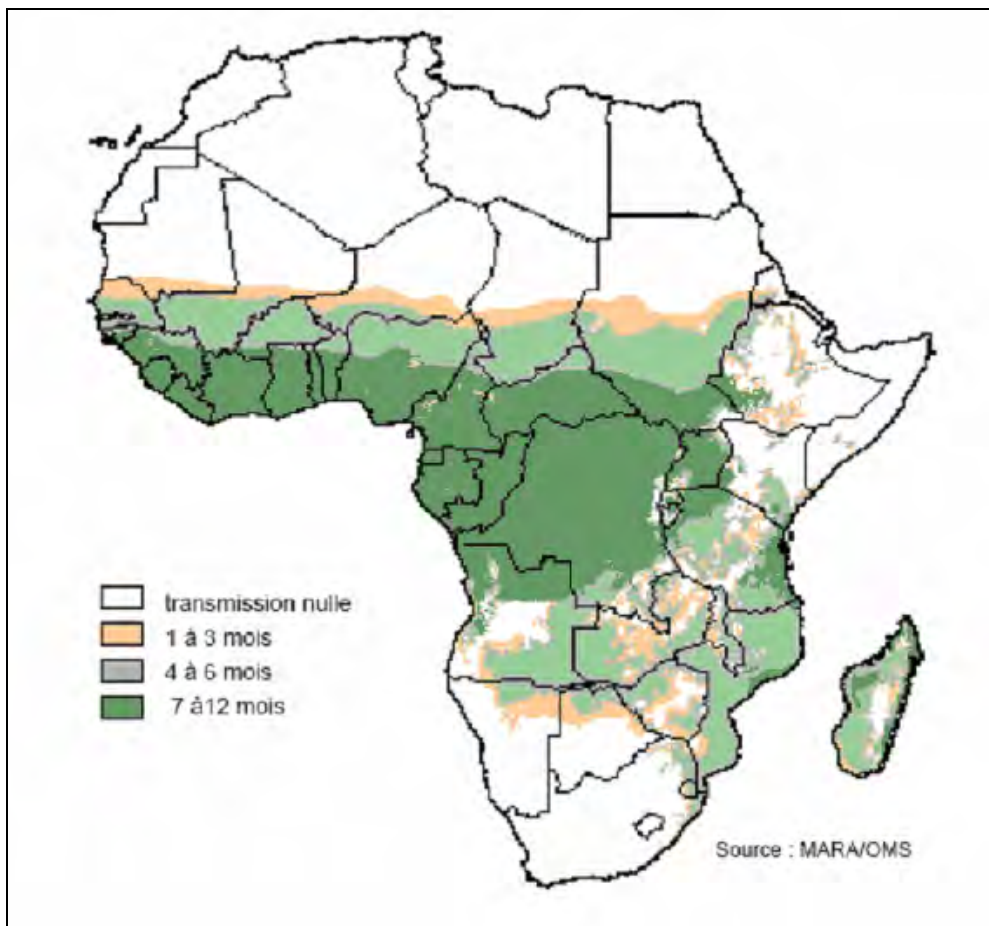


Figure 18: Transmission du paludisme en Afrique (source OMS/MARA).

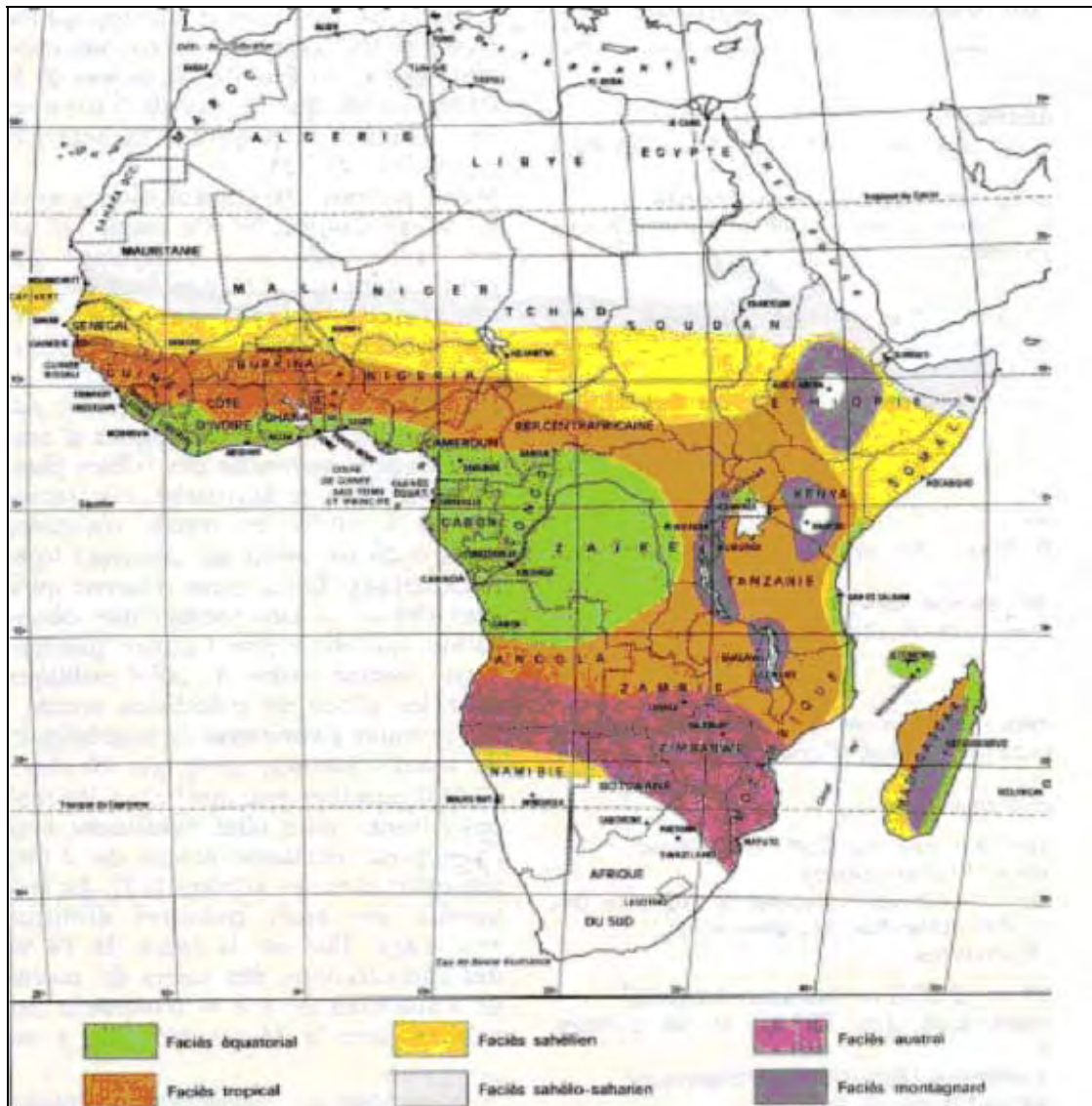


Figure 19: Faciès épidémiologiques primaires du paludisme en Afrique (Mouchet *et al.*, 1993)

3.4.2. Quelques exemples de transmission dans les faciès épidémiologiques primaires

Faciès équatorial : forêts équatoriales et savanes post-forestières

En zone de forêt équatoriale authentique, il n’y a pas véritablement de paludisme pour la simple raison qu’il n’y a pas d’anophèles vecteurs dans le sous bois. A l’exception des Pygmées, il n’y a quasiment pas de présence humaine et des vecteurs n’ont pas été récoltés dans les huttes des Pygmées (Mouchet, 1976).

En effet les Pygmées vivent en équilibre avec la forêt et ne provoquent pas de déforestation ouverte. Par contre, l'installation de communautés humaines plus sédentaires occasionne une déforestation avec l'ouverture du paysage qui entraîne l'installation du vecteur principal qui, dans cette zone, est *An. gambiae* s.s. Dans ce faciès équatorial, les conditions climatiques sont favorables à la survie des moustiques et à la production larvaire tout au long de l'année (Mouchet, 1962). La transmission y est donc pérenne. *An. funestus* a un rôle réduit dans la transmission en zone forestière d'Afrique Centrale mais peut être très actif dans les forêts dégradées en Afrique de l'Ouest (Adja *et al.*, 2006). Par ailleurs *An. moucheti* et *An. nili* considérés comme vecteurs secondaires jouent un rôle parfois prépondérant dans la transmission dans certaines localités au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006; Awono *et al.*, 2004) et en Côte d'Ivoire (Fontenille *et al.*, 2003).

En zone équatoriale caractérisée généralement par la succession de deux saisons de pluies et de deux saisons sèches, la transmission du paludisme est, comme nous l'avons déjà souligné, pérenne et son intensité suit la densité des vecteurs elle-même liée aux variations climatiques saisonnières. En effet au cours de la grande saison sèche, il a été noté une baisse de la transmission dans la forêt de Mayombe au Congo (Richard, 1983). On note également des niveaux de transmission très différents d'un village à l'autre. Coz *et al.* (1966) rapportaient dans la forêt non littorale de Côte d'Ivoire une transmission variant de 50 piqûres infectées par homme et par an à plus de 1 000 selon les localités. L'intensité de la transmission serait plus soutenue dans les forêts dégradées où il a été noté plus de 850 piqûres infectantes annuelles dans certains villages en forêt dégradée au Sud de Brazzaville (Carnevale *et al.*, 1985). En définitive, en zone équatoriale, la transmission est (i) pérenne avec une intensité variant suivant les saisons et (ii) très hétérogène suivant les localités.

Faciès tropical : savanes humides ouest-africaines

La plupart des savanes humides ouest-africaines sont caractérisées par l'alternance d'une saison sèche qui dure au moins cinq mois et d'une saison pluvieuse le reste de l'année. La transmission est dite saisonnière longue supérieure à 6 mois correspondant à la durée de la saison des pluies. La saison sèche au cours de laquelle la plupart des gîtes larvaires s'assèchent est en général défavorable au développement et à la survie des vecteurs dont les densités se réduisent de façon importante. Aussi la transmission du paludisme au cours de cette saison est dérisoire avec des taux pratiquement en deçà des valeurs décelables par la méthode entomologique classique excepté dans les hydro-aménagements rizicoles où une transmission notable existe en saison sèche (cf. nos travaux à la Vallée du Kou au Burkina Faso). Pendant la saison des pluies qui correspond à la période où les densités vectorielles sont plus élevées dues au nombre croissant de gîtes larvaires et à l'activité des moustiques dont la survie est favorisée par la température et l'hygrométrie, le nombre de piqûres annuelles infectées devient important et varie de quelques centaines à des dizaines allant des savanes les plus humides aux plus sèches. Les principaux vecteurs en savane humide sont *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* voire localement *An. nili* le long de certains cours d'eaux; *An. arabiensis* devenant le vecteur prépondérant dans les savanes plus sèches septentrionales aux dépens d'*An. gambiae* s.s. Dans les zones rurales à l'Ouest du Burkina Faso, à la fin des années 50, Hamon *et al.* (1959) ont observé une moyenne annuelle de 35 piqûres infectantes concentrées essentiellement en saison des pluies. Quelques trente années plus tard, ces données furent réactualisées dans la même zone par Robert *et al.* (1985) qui trouvèrent une moyenne annuelle presque similaire de 55 piqûres infectantes. Dans certains villages situés dans la même région mais en bordure de points d'eau stagnant une grande partie de l'année tel Karangasso la transmission était supérieure avoisinant 244 piqûres infectées par an.

Les principaux vecteurs rencontrés à l'époque étaient *An. gambiae* s.s., plus secondairement *An. arabiensis* (*An. arabiensis* n'a qu'un rôle mineur en savane humide) et *An. funestus* jouant un rôle complémentaire dans la transmission du paludisme (Robert *et al.*, 1989). En effet, la densité des vecteurs augmente très rapidement à la faveur des premières pluies, due à l'explosion d'*An. gambiae* s.s. et plus accessoirement *An. arabiensis* qui exploitent les nombreuses collections d'eaux temporaires et ensoleillées. *An. funestus* lui prend le relais vers la fin de la saison des pluies et en début de saison sèche avec l'installation de gîtes profonds et ombragés dotés d'une végétation dressée et ce jusqu'à l'assèchement de ces derniers en saison sèche (Brun, 1973; Robert *et al.*, 1988b). L'apparition tardive de cette espèce est aussi due à la durée de son développement larvaire qui est plus longue que celle d'*An. gambiae* s.l.

Données récentes sur la transmission du paludisme en zones de savanes humides à l'Ouest du Burkina Faso (cf. articles 11 & 12)

Nous avons conduit une étude sur la transmission palustre entre 2000 et 2003 dans deux villages situés en savane boisée humide à l'Ouest du Burkina: Soumousso et Léna visant à actualiser les données obtenues par Hamon *et al.* (1959) et Robert *et al.* (1985). Les résultats ont révélé une transmission importante atteignant respectivement 462 et 164 piqûres infectées/homme/an [article 11]. Les densités d'*An. gambiae* s.s. et d'*An. funestus* ont augmenté considérablement dans ces deux villages de savane (Soumousso et Léna) où la transmission est assurée majoritairement par *An. funestus*. Le fait marquant est le rôle local prépondérant d'*An. funestus* dans la transmission du paludisme dans ces deux villages jadis dominée par *An. gambiae* avec des TIE annuels de 412 et 112 respectivement à Soumousso et à Léna vs 42 et 57 pour *An. gambiae* et la quasi-disparition d'*An. nili* à Soumousso en l'espace de 25 ans.

Toutefois, il est à noter que ces valeurs ne sont pas à généraliser pour toute la zone des savanes humides car des différences importantes ont été observées d'un village à un autre, voire pour le même village d'une année à une autre dans l'intensité et le rythme de la transmission [article 12]. La variation des densités d'un village à l'autre et d'une année à l'autre a été plus marquée pour *An. funestus* que pour *An. gambiae* s.s. et serait liée à l'hétérogénéité de la pluviométrie d'une année à une autre. *An. funestus* est plus dépendante de la pluviométrie à long terme (mise en place tardive des gîtes profonds avec végétation dressée) contrairement à *An. gambiae*. Les densités vectorielles d'*An. funestus* et son rôle dans la transmission sont donc très variables d'une année sur l'autre en fonction de la pluviométrie mais aussi des activités anthropiques [article 12].

La transmission dans ces zones a connu un gain en intensité à cause de l'augmentation des densités d'*An. funestus* et d'*An. gambiae* s.s. suite au développement de ces villages ayant favorisé i) une forte concentration humaine et par conséquent un réservoir potentiel de parasites ii) des pratiques culturelles (déforestation, points d'irrigation, maraîchage) iii) une forte anthropisation (carrières de briques, points d'eau semi-temporaires) à Soumouso et à Léna. A l'inverse, cette modification du milieu a entraîné la disparition d'*An. nili* à Soumouso où jadis il représentait près de 10% des vecteurs. Dans ces deux villages, entre Août et Septembre, plus de 60% de la transmission est assurée par *An. funestus* [articles 11 & 12]. Par contre les densités d'*An. arabiensis* retrouvé régulièrement à moins de 5% de la population d'*An. gambiae* s.l. avec un rôle quasi-inexistant dans la transmission n'ont pas connu de modifications majeures.

Cette augmentation de la transmission aura certainement des conséquences sur le paludisme-maladie avec une augmentation probable de la prévalence parasitaire et de la morbidité dans la classe d'âge < 5ans. Ceci pourrait entraîner une acquisition plus précoce de la prémunition quoique ce point mérite d'être vérifié par des paludologues.

Par ailleurs, *An. nili*, reste un vecteur important dans les savanes les plus humides et les plus préservées du Sud-Ouest du Burkina Faso où il contribue à près de 30% dans la transmission palustre (Dabiré *et al.* comm pers). Son rôle dans la transmission du paludisme est aussi important dans d'autres savanes boisées et préservées en Afrique de l'Ouest (Dia *et al.*, 2003). Dans les deux faciès (équatorial et tropical avec les exemples cités ci-avant) le paludisme est stable (ou endémique) avec une transmission pérenne ou longue de plus de six mois.

Faciès sahélien : sahel ouest-africain

En zone sahélienne, les conditions climatiques sont très rudes pendant au moins les 9 mois consécutifs de la saison sèche. Les pullulations des vecteurs étant le seul fait des pluies dont la saison reste relativement courte. La transmission du paludisme est donc le plus souvent de type saisonnier courte inférieure à 6 mois caractéristique du faciès sahélien où il est à la limite de la stabilité et qualifié d'intermédiaire (Mouchet *et al.*, 1993). Le vecteur prédominant est *An. arabiensis* adapté à l'aridité et plus accessoirement *An. gambiae* forme M. On note une diminution voire une disparition d'*An. funestus* dans ces régions sahéliennes suite aux grandes sécheresses des années 70, à l'avancée des zones désertiques et aux pratiques culturelles humaines (Mouchet *et al.*, 1996). Même durant la saison humide connue en 1995, *An. funestus* n'a plus recolonisé la région sahélienne du Sénégal qui n'a ainsi connu une augmentation du paludisme (Mouchet *et al.*, 1996). Cette disparition d'*An. funestus* dans les zones sahéliennes a été notée à la fois dans les Niayes autour de Dakar (Sénégal) et dans la région du fleuve Niger autour de Niamey. On note toutefois la réapparition localisée de ce vecteur majeur en zone sahélienne suite à plusieurs années consécutives favorables en terme de pluviométrie en Afrique de l'Ouest comme cela a été révélé par Konaté *et al.* (2001) au Sénégal. Cette tendance pourrait se confirmer dans d'autres régions sahéliennes après les saisons des pluies favorables observées en Afrique de l'Ouest au cours de ces 4 dernières années, ce qui mériterait d'être étudié.

Dans le sahel sénégalais, la transmission est faible avec un TIE situé entre 1 et 7 pi/h/a étalé sur seulement trois mois et dont *An. arabiensis* est le seul vecteur. Cette faible transmission est en partie associée à la forte zoophilie de ce vecteur qui, de fait, est dévié sur le bétail abondant dans les zones agropastorales sahéliennes (Vercruysse *et al.*, 1985; Faye *et al.*, 1993, 1995). A la limite sud de la zone sahélienne sénégalaise où le paludisme tend vers la stabilité, *An. gambiae* s.s. (les formes n'ont pu être précisées à l'époque faute de l'outil moléculaire de diagnostic) est le vecteur confirmé (alors qu'on s'attendrait logiquement à *An. arabiensis* dans un tel faciès) avec des TIE plus élevés atteignant 100 pi/h/a et une transmission étalée dans le temps (Lemasson *et al.*, 1997). Au Burkina Faso, deux études avaient été menées dans le sahel, l'une dans les années 60 à Dori (Hamon *et al.*, 1965) et l'autre deux décennies plus tard au niveau de la mare d'Oursi (Gazin *et al.*, 1988). Au début des années 60 où la végétation était encore fournie, surtout autour des points d'eau, *An. gambiae* s.l. dominé par *An. arabiensis*, assurait la transmission du paludisme secondé par *An. funestus*. Lors de la deuxième enquête, *An. funestus* avait disparu suite à la grande sécheresse des années 70 comme cela avait été noté dans d'autres zones sahéliennes ouest-africaines (Mouchet *et al.*, 1996). Le complexe d'*An. gambiae* était alors entièrement dominé par *An. arabiensis* avec des indices sporozoïtiques (IS) faibles variant entre 0.04% à 0.15%. Ces faibles IS seraient liés à la forte zoophilie de ce vecteur profitant de l'abondance du bétail dans ces régions regroupé en particulier autour des rares points d'eau.

Les variations intra-annuelles et spatiales importantes des TIE et corollairement des indices parasitologiques (IP) relevées en zone sahélienne sont fonction des saisons climatiques extrêmes et de la situation géographique des sites d'étude par rapport aux rares points d'eau.

Ainsi à Oursi dans la zone de la mare, les IP étaient de 40% autour de la mare et seulement de 10% dans les maisons éloignées du point d'eau.

On note également dans le sahel des variations inter-annuelles importantes de la transmission palustre au niveau d'un même site dépendant elle-même des variations de la durée et de l'intensité de la saison pluvieuse d'une année sur l'autre.

Données récentes sur la transmission du paludisme dans le sahel Burkinabé : cas de Dori

Des données issues d'enquêtes entomologiques plus récentes que nous avons réalisées en saison des pluies 2003 dans les sites pilotes du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) au Burkina Faso incluant Dori, montrent aussi des IS (4.33%) et des TIE relativement élevés (72 pi/h/a) autour d'un barrage à l'entrée de la ville de Dori (Dabiré *et al.*, obs. pers). Le principal vecteur dominant était *An. gambiae* forme M (>80% vs 20% *An. arabiensis*), ce qui est similaire au schéma observé par Lemasson *et al.* (1997) dans le sahel sénégalais. Cette différence dans la composition vectorielle est liée à la présence de l'hydro-aménagement favorable à *An. gambiae* forme M comme nous l'avons montré précédemment alors que classiquement on devrait plutôt avoir *An. arabiensis* comme vecteur prédominant. Globalement, que nous soyons dans le sahel burkinabé ou sénégalais, la transmission du paludisme est faible et courte dans ce faciès.

Dans le faciès désertique qui ne concerne pas le Burkina Faso mais la zone sahélo-saharienne du nord du Niger et du Mali, les informations sur la transmission du paludisme sont rares. Globalement les IP mesurés (la courte durée de la transmission et la mauvaise connaissance du faciès ne permettent pas en général des mesures formelles de TIE) en région sahélo-saharienne du Niger ont montré une diminution de la prévalence du paludisme de 1922 (IP entre 62 et 87%) à 1994 (IP entre 11 et 30%) (Julvez *et al.*, 1997a). Selon ces auteurs cette baisse du paludisme serait due à la disparition d'*An. funestus* qui était un vecteur très actif et efficace jusqu'en 1970 avant la grande sécheresse du Sahel (Julvez *et al.*, 1997b).

Autour des oasis sahariens, *An. arabiensis* est souvent le seul vecteur du complexe *An. gambiae* (dont l'identification à l'époque réalisée par cytogénétique reste à être confirmée par PCR) vivant en sympatrie avec *An. gambiae* forme Mopti et d'autres anophèles non vecteurs. Le présumé vecteur des oasis, *An. sergenti* n'a pas été observé au sud du Sahara.

Dans cette zone désertique, la transmission du paludisme est courte et aléatoire avec des variations intra-annuelles très importantes de la prévalence parasitaire liées à l'irrégularité de la saison des pluies d'une année à une autre. On est véritablement en zone de paludisme instable dit épidémique (dont on a du mal cependant à retracer le processus épidémique).

La population développe peu ou pas d'immunité, et toute infection palustre se traduira par un cas clinique ce qui fait planer un risque d'épidémie. Le paludisme maladie affecterait donc toutes les tranches d'âge. Une lutte antivectorielle bien conduite permet en général d'éviter ou de maîtriser les épidémies.

3.4.3. Faciès épidémiologiques secondaires ou locaux

A l'intérieur des faciès primaires de transmission du paludisme contrôlés essentiellement par les grandes zones éco-climatiques, nous avons les faciès secondaires (faciès II) locaux car modulés par les activités humaines tels que les hydro-aménagements et l'urbanisation. Ces faciès II exercent des modifications plus ou moins profondes au sein de chaque faciès primaire mais ne modifient pas les caractéristiques globales de la strate dont elles sont issues.

L'existence et la dynamique de ces faciès II pourraient avoir des conséquences sur l'épidémiologie du paludisme localement et donc sur la mise en place de stratégie de lutte antivectorielle (LAV) si elle ne prend en compte uniquement que les faciès épidémiologiques primaires. Ces faciès secondaires qu'ils soient liés à l'hydro-aménagement ou à l'urbanisation peuvent se retrouver en zone de transmission endémique ou instable.

En milieu rizicole

Face au poids démographique, nombre de pays africains au Sud du Sahara se sont tournés vers les aménagements hydro-agricoles pour accroître leurs productions vivrières (FAO, 1987; Ijumba *et al.*, 2002a). Ces hydro-aménagements avaient pour première vocation d'accroître la production irriguée de riz (Keiser *et al.*, 2002) dont la demande ne cesse d'ailleurs de s'accroître (5,6%/an). Citons les plaines rizicoles de Nioro et de Manantanli au Mali, les plaines rizicoles du Sourou, de la Vallée du Kou et de la Kompienga au Burkina Faso, les activités de l'Agence de Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest (ADRAO) couvrant de la Côte d'Ivoire au Sénégal, les bassins du fleuve Sénégal et Niger.

A côté des aménagements de grande envergure, d'autres aménagements de moindre importance ont été réalisés dans les bas-fonds pour soutenir certaines activités agro-pastorales (Oomen *et al.*, 1994). Mais l'histoire des aménagements agricoles est étroitement liée à celle des affections parasitaires. En effet, l'évaluation de l'impact sanitaire des projets de développement hydraulique a montré que la gestion de l'eau des bas-fonds tout comme l'irrigation en Afrique de l'Ouest augmente le risque de maladies liées à l'eau pour les populations concernées notamment le paludisme et la bilharziose (Hunter *et al.*, 1993). A l'exception peut-être des zones équatoriales de forêt, on observe presque les mêmes faciès de transmission et d'évolution de ces maladies dans la plupart des plaines irriguées (de Plaen *et al.*, 2004; Sissoko *et al.*, 2004; Dolo *et al.*, 2004; Mutero *et al.*, 2004; Chimbari *et al.*, 2004; Marrama *et al.*, 2004; Sogoba *et al.*, 2007).

Les rizières constituent des gîtes larvaires très favorables au développement des anophèles en particulier *An. gambiae* s.s. en zone de savane et *An. arabiensis* en zone plus aride; leurs conséquences sur la transmission du paludisme sont répertoriées dans toutes l'Afrique subsaharienne à des degrés toutefois nuancés.

Dans les savanes ouest africaines, l'identité des espèces et formes du complexe *An. gambiae* s.l. prédominante en milieu rizicole varie suivant le contexte bioclimatique.

En savane humide dite guinéenne au centre et au nord de la Côte d'Ivoire, c'est la forme moléculaire S d'*An. gambiae* qui prédomine dans les périmètres rizicoles (Doannio *et al.*, 2002). En savane plus classique dite soudanaise, c'est la forme chromosomique Mopti ou plus globalement la forme moléculaire M d'*An. gambiae* qui y est prédominante comme c'est le cas à la Vallée du Kou au sud-ouest du Burkina Faso (Robert *et al.*, 1985; Baldet *et al.*, 2003; **[articles 2 & 5]**). Dans les zones plus arides où la forme chromosomique Mopti (ou forme moléculaire M) est absente, c'est *An. arabiensis* qui est favorisé comme dans les rizières du fleuve Sénégal (Petrarca *et al.*, 1987) en zone sahélienne d'Afrique de l'Ouest et au Kenya en Afrique de l'Est (Coosemans *et al.*, 1984; Mutero *et al.*, 2004).

En réalité, dans les rizières en Afrique de l'Ouest, la présence quasi-permanente de l'eau dans les hydro-aménagements crée des gîtes larvaires pérennes et en abondance pour les culicidés. Le mode de croissance du riz offre en plus une diversité et une alternance dans l'occupation des gîtes qui occasionne la présence d'une grande majorité d'espèces d'anophèles qui ne sont pas heureusement toutes vectrices. Les gîtes larvaires potentiels sont représentatifs des différents types de collection d'eau: casiers rizicoles, canaux d'irrigation non entretenus cimentés ou en terre, flaques résiduelles, mares sub-permanentes.

La production des différentes espèces culicidiennes s'échelonne ainsi dans le temps suivant les saisons climatiques et les phases de culture du riz (Snow, 1983; Robert *et al.*, 1988b; Baldet *et al.* 2003) suivant un schéma quasi-typique.

En saison sèche, les seuls gîtes larvaires potentiels sont le fait de l'irrigation: casiers rizicoles et canaux d'irrigation non entretenus. Dans les casiers, le cycle du riz détermine une succession larvaire caractéristique: (1) février-mars: mise en eau-repiquage/ *An. gambiae* s.l., (2) avril-mai: montaison-épiaison/*An. pharoensis*, (3) juin: maturation-récolte/*An. coustani*.

De nombreuses larves de *Culex decens* et d'*Aedes* sp se trouvent également dans les casiers repiqués et récoltés en association avec *An. gambiae* s.l. *Cx. poicilipes* et *Cx. univittatus* sont aussi trouvés dans les casiers pendant l'épiaison et la maturation. Les plus fortes densités larvaires s'observent dans les casiers repiqués et sont le fait d'*An. gambiae* s.l. Les canaux d'irrigation non entretenus, surtout en terre, sont beaucoup moins productifs que les casiers. *An. funestus* y est récolté à de faibles densités après la mise en eau (mars) en présence ou non d'autres espèces anophéliennes.

En saison des pluies, outre les casiers, s'ajoutent les gîtes classiques liés aux précipitations: les flaques résiduelles temporaires pour *An. gambiae* s.l. et plus tard les collections d'eau sub-permanente profondes avec végétation pour *An. funestus*. Ces dernières abritent également des larves de *Mansonia* (*M. africana*, *M. uniformis*). Enfin, les flaques péri-domestiques souvent polluées abritent *Cx. quinquefasciatus* durant toute la saison des pluies. *An. funestus* est généralement rencontré en faible proportion comparée à *An. gambiae* s.s. et joue un rôle très minime dans la transmission du paludisme dans ces hydro-aménagements (Robert *et al.*, 1988b; Baldet *et al.*, 2003; [article 5]. Ce constat est notamment valable dans les zones de savane ouest-africaines.

Ceci n'est pas toujours le cas car dans la zone rizicole forestière de Danané à l'Ouest de la Côte d'Ivoire il a été observé un développement plus important d'*An. funestus* jouant un rôle très actif et soutenu dans la transmission du paludisme (Briët *et al.*, 2003) ainsi qu'à Madagascar où il constitue dans ce contexte le vecteur prépondérant (Marrama *et al.*, 2004).

En principe, l'augmentation de la densité vectorielle suite à l'implantation d'une rizière devrait se traduire par une augmentation du risque de l'accès palustre et une intensification de l'endémicité (Coosemans *et al.*, 1984; Robert *et al.*, 1989).

Ceci n'est pas une règle car malgré l'explosion des populations de vecteurs dans bon nombre de plaines rizicoles en Afrique, la transmission rapportée çà et là est plutôt paradoxalement faible (Faye *et al.*, 1993, 1995; Carnevale *et al.*, 1999; Ijumba *et al.*, 2002b; Henry *et al.*, 2003; Dolo *et al.*, 2004; Mutero *et al.*, 2004).

Au Burkina Faso, la zone rizicole de la Vallée du Kou, aménagée dans les années 1970, s'étend sur une surface de 7 000 ha. L'irrigation se pratique avec l'eau détournée de la rivière Kou alimentant par gravité un réseau de canaux. La riziculture se déroule en deux récoltes annuelles: l'une en saison sèche (février à juin), l'autre en saison des pluies (août à décembre). Entre deux cycles de culture, l'irrigation est stoppée. Des études entomologiques réalisées dans ce site dans les années 80 avaient montré que les rizières étaient plus favorables au développement d'*An. gambiae* s.s. vecteur majeur de paludisme en Afrique de l'Ouest, avec une faible fréquence d'*An. funestus* (Robert, 1989). Malgré l'explosion des populations des vecteurs, le taux de transmission du paludisme était paradoxalement faible comparé à celui des villages environnants de savane classique. En réalité, les taux d'inoculation relativement faibles notés dans les hydro-aménagements rizicoles s'expliquent essentiellement par les faibles taux de survie de ces populations vectorielles. Quand les populations anophéliennes atteignent leurs pics de densité, elles sont constituées pour la plupart de femelles nullipares (Robert *et al.*, 1991) inaptes donc à assurer la transmission du paludisme. D'autres facteurs plus secondaires concourent également à ces taux de transmission relativement faibles. On peut citer l'utilisation très répandue de moustiquaires liée à la forte nuisance culicidienne et le recours fréquent à la prophylaxie médicamenteuse antipalustre essentiellement à base de chloroquine, tous deux favorisés par un certain niveau socio-économique des populations humaines résidant dans ces hydro-aménagements.

Depuis une décennie on assiste à un mauvais fonctionnement du système caractérisé par une non-synchronisation des cultures de riz et le non entretien généralisé des canaux d'irrigation. On note aussi une situation socio-économique précaire des producteurs de riz incapables de s'assurer une prise en charge adéquate du paludisme couplée à la chloroquinorésistance de plus en plus problématique dans la zone. En effet bien que les différences ne soient pas très significatives, les échecs thérapeutiques à la chloroquine *in vivo* dans ce site ont augmenté de 10% entre 1998 et 2001 (18.7% vs 29.2%) avec une progression du même ordre de la fréquence du gène de résistance à la chloroquine *pfprt* T76 chez *P. falciparum* passant de 22% à 33% entre 1998 et 2001 (Tinto *et al.*, 2005). Ce qui laisserait envisager un risque d'explosion de la transmission et du paludisme-maladie. Dans ce nouveau contexte, les données entomologiques mesurant la transmission du paludisme ont été réactualisées en 2000 (Baldet *et al.*, 2003) pour voir si la modification du milieu et la dégradation des conditions de vie des producteurs n'ont pas eu une incidence sur le niveau de transmission.

Un suivi entomologique longitudinal a été réalisé de mars 1999 à février 2000 basé sur des prospections larvaires et des captures nocturnes de moustiques adultes sur sujets humains dans deux villages représentatifs de la Vallée du Kou, VK5 situé en plein centre de la rizière et VK7 localisé en périphérie de la rizière à l'interface des champs de coton. Ces données ont été comparées à celles des années 80. Par rapport à 1984-1985, on relevait une augmentation des niveaux ($\times 10$) et des durées (+ 4 mois) de transmission, reposant à la fois sur un accroissement des densités vectrices ($\times 2$) et des indices sporozoïtiques ($\times 5$). Cet accroissement de la transmission dans une région de paludisme stable n'entraînait pas une aggravation du paludisme-maladie du fait d'une saturation des piqûres infectées et de l'immunité protectrice établie dès l'adolescence confirmant le paradoxe du paddys.

La transmission du paludisme en zone rizicole de la Vallée du Kou à l'Ouest du Burkina Faso : données réactualisées en 2005 (cf. articles 5 et 11)

Outre le fait que la transmission du paludisme en savane a porté aussi sur la zone rizicole de la Vallée du Kou [**article 11**], nous avons réactualisé la dynamique de la transmission et la fréquence relative des formes moléculaire M et S d'*An. gambiae* s.s. dans le village 7 (VK7) qui est à l'interface entre la savane environnante cotonnière et la plaine rizicole. De notre étude, il ressort que VK7 où la forme moléculaire M était encore quasi-dominante quelle que soit la période de l'année, connaît une modification dans la fréquence des formes moléculaires. En effet à partir de fin août, la forme moléculaire S fait son apparition dans ce village atteignant des proportions égales (50%) à celles de la forme M en septembre et en octobre. Quoique le niveau de transmission du paludisme reste similaire à ceux obtenus en 2005 dans la même localité, la participation accrue de la forme S dans la transmission pourrait en changer le rythme et l'intensité dans les années à venir [**article 5**]. En perspectives, des études doivent être menées pour vérifier (i) si ces tendances de l'augmentation accrue de la fréquence de la forme S dans la population anophélienne en interface entre le milieu rizicole et la savane environnante se poursuivent et (ii) étudier en détail si cette modification de la fréquence relative M/S a un impact sur la transmission du paludisme.

En milieu urbain

Le paludisme n'est pas seulement la première cause de mortalité et de morbidité mais peut constituer un facteur limitant au développement socio-économique des états surtout en Afrique sub-saharienne. Dans un contexte d'urbanisation galopante et d'exode rural sans précédent et où plus de la moitié des activités économiques de nos états sont basées en ville, le paludisme urbain africain doit être considéré comme une priorité avec des activités de recherche -interventions.

En effet la source MARA (Mapping Malaria Risk in Africa) estime à plus de 200 millions de personnes vivant actuellement en ville en Afrique dans une zone à risque de transmission du paludisme avec un TIE se situant entre 0 et 50 pi/h/a (Keiser *et al.*, 2004). Les premières études sur le paludisme urbain ont été conduites en 1930 en Afrique de l'Est (Wiseman *et al.*, 1939; Mackay, 1935; Wilson, 1936). Elles ont été suivies par d'autres études menées quelques décennies plus tard en Afrique centrale et de l'Ouest avec de nombreux challenges car la mesure des marqueurs de la transmission déjà difficile dans le contexte épidémiologique général, reste plus problématique dans le contexte urbain. En effet dans ce milieu, la transmission est le plus souvent à la limite de la détectabilité par les méthodes entomologiques usuelles (Robert *et al.*, 2003). En zones urbaines d'Afrique équatoriale et tropicale, l'étude proprement dite du paludisme urbain a commencé au début des années 80 (Bruce-Chwatt, 1983). De Brazzaville au Congo (Trape, 1986) à Pikine et Dakar au Sénégal (Vercruysse *et al.*, 1983; Trape *et al.*, 1992; Diallo *et al.*, 1998, 2000), en passant par Maradi au Niger (Le Bras *et al.*, 1986), Accra au Ghana (Appawu *et al.*, 1994), Ouagadougou (Sabatinelli *et al.*, 1986; Rossi *et al.*, 1986) et Bobo-Dioulasso (Robert *et al.*, 1986; Diabaté, 2003) au Burkina Faso, elles aboutirent toutes, à quelques exceptions près, aux mêmes conclusions: i) la transmission du paludisme est le plus souvent très faible comparée aux zones rurales environnantes avec des TIE allant du minimum mesurable à un peu plus de 20 piqûres infectantes/an (pi/h/a), ii) une transmission plus importante en périphérie que dans les centres urbanisés en raison de l'anthropisation, de la pollution et de la disparition des espaces naturels peu favorables aux anophèles favorisant plutôt l'explosion du nuisant urbain *C. quinquefasciatus*. A l'inverse en périphérie des villes, à l'interface du milieu urbain et du milieu naturel environnant, le tissu urbain est moins dense. Les densités anophéliennes et la transmission du paludisme sont plus importantes comparées au centre urbain.

Cette augmentation de la transmission et des densités vectorielles se trouve aggravée par les activités humaines péri-urbaines notamment le maraîchage, les carrières de briques, etc. favorisant la constitution de gîtes larvaires favorables aux vecteurs du paludisme. Comme exceptions à ces deux règles, on peut citer l'exemple du paludisme urbain lagunaire à Cotonou avec une transmission pérenne plus importante en ville que dans les villages environnants et celui de Niamey avec une transmission plus importante dans les quartiers du centre ville traversés par le fleuve Niger qu'en périphérie (Julvez *et al.*, 1997b).

En zone de forêt équatoriale à Brazzaville capitale du Congo, Trape *et al.* (1987) ont trouvé un TIE moyen de 22 pi/h/a inégalement reparti de la périphérie vers le centre de la ville où il était très faible. Les vecteurs rencontrés à l'époque étaient essentiellement *An. gambiae* s.s. et dans une moindre mesure *An. moucheti*. A Kinshasa, capitale de la République démocratique du Congo, l'incidence du paludisme était également faible décroissant aussi de la périphérie vers le centre de la ville avec un TIE de 0.08 à 1.07 pi/h/nuit (Coene, 1993). Les vecteurs étaient les mêmes que ceux rencontrés dans la zone forestière équatoriale : *An. gambiae* forme chromosomique « Forêt » pour plus de 90%, *An. funestus* et *An. nili*. A Yaoundé au Cameroun, toujours en zone forestière équatoriale, la transmission du paludisme a été très faible avant 1960 du fait de la typologie de la ville peu urbanisée à l'époque et donc du milieu naturel forestier préservé où il n'existait peu ou pas de vecteurs (faciès équatorial). A ceci s'ajoute également la mise en place de campagnes d'éradication des vecteurs du paludisme à base de DDT à l'époque qui avait permis de contrôler les populations d'anophèles (Livadas *et al.*, 1958). Après l'indépendance, avec l'arrêt de ces campagnes insecticides et à la faveur de l'urbanisation galopante entraînant la déforestation, le faciès de transmission a été modifiée. Ainsi des enquêtes menées au début des années 90 révélaient un risque important de paludisme urbain à Yaoundé avec des TIE relativement élevés variant suivant les quartiers entre 14 et 30 pi/h/a (Fondjo *et al.*, 1992).

L'augmentation des densités vectorielles et subséquemment de la transmission du paludisme liée essentiellement à l'anthropisation du milieu a été confirmée par des études plus récentes (Manga *et al.*, 1997; Antonio-Nkondjo *et al.*, 2005).

En Afrique de l'Ouest, nous observons globalement le même schéma de transmission avec quelques particularités. Au Bénin, avec l'extension de la ville de Cotonou vers le Nord par le comblement de la lagune, il s'est opéré le remplacement d'*An. melas*, espèce halophile jadis vecteur le plus abondant mais peu performant du fait de sa zoophilie et de son exophilie, par *An. gambiae* s.s. meilleur vecteur. Ceci s'est traduit par l'augmentation de la transmission du paludisme avec un TIE variant suivant les quartiers de 26 à 46 pi/h/a (Coluzzi, 1993). Il a été alors observé paradoxalement plus de paludisme en ville que dans les villages environnants (Akogbeto *et al.*, 1992; Akogbeto, 2000). A l'inverse, à Accra au Ghana, des études comparatives de la transmission palustre entre 1984 et 1995 ont révélé une diminution de la transmission qui est passée de 75 pi/h/a en 1984 à 28 pi/h/a en 1995 avec une réduction des densités vectorielles d'*An. gambiae* s.s., d'*An. melas* et d'*An. arabiensis* et une disparition d'*An. funestus* en raison essentiellement de l'urbanisation et de la disparition du milieu naturel (Chinery, 1984; Appawu *et al.*, 1994; Chinery, 1995). Au Sénégal, le schéma de transmission est quasi-similaire avec une diminution de la transmission de la périphérie vers le centre ville plus urbanisé. En périphérie de la ville de Dakar, dans les Niayes (dunes de sables avec de la végétation où est pratiqué du maraîchage), *An. funestus* était le vecteur majeur avec une fréquence relative de 66% vs 33% pour *An. gambiae* s.l. Suite à la sécheresse des années 70, ce vecteur a été éliminé et remplacé par *An. arabiensis* (92%). Ce dernier assure désormais avec secondairement *An. gambiae* s.s. la transmission du paludisme avec un TIE de 11 pi/h/a relevé en 1991 (Trape *et al.*, 1992).

A Pikine un autre quartier périphérique dans les Niayes, une autre étude conduite par Vercruyse *et al.* (1983) révélait un TIE similaire de 13 pi/h/a avec pour seul vecteur *An. arabiensis* dont la densité se resserrait autour des points d'eau servant de gîtes larvaires (Robert *et al.*, 1998). Par contre dans les districts Centre et Sud de Dakar ce vecteur a été trouvé à une très faible densité incapable d'assurer la transmission (Diallo *et al.*, 1998, 2000). Dans les principales agglomérations urbaines du Burkina Faso, la situation n'en est pas moins similaire. En effet à Bobo-Dioulasso, deuxième ville du pays, le taux de transmission du paludisme rapporté par Robert *et al.* (1986) était très bas avec un TIE de 0.19 au centre ville (soit une piqûre tous les 7 ans) devenant plus important dans les quartiers périphériques avec un TIE de 4.6 pi/h/a. A l'époque, *An. gambiae* (forme chromosomique «Savane» identifiée plus tard comme la forme moléculaire S) était le vecteur principal rencontré à des fréquences de 71% au centre ville et de 78% en périphérie. *An. gambiae* cytotype Mopti/forme M représentait 23% au centre ville et 17% en périphérie. *An. arabiensis* était minoritaire représentant seulement 11% du complexe. Sa fréquence relative était de 21% au centre ville le long du marigot Houet et de 3% en périphérie. Deux décennies après, une étude menée par Diabaté (2003) révélait une augmentation du TIE avec 57 pi/h/a au centre ville et 63 pi/h/a en périphérie. Si l'étude réalisée par Robert *et al.* (1986) a eu l'avantage de couvrir 3 quartiers (1 central urbanisé classique, 1 central traversé par le marigot Houet et 1 quartier périphérique), la mesure de l'indice sporozoïtique avait été effectuée à partir de la dissection des glandes salivaires suivies d'observation microscopique directe. Ceci aurait sous-estimé la valeur de l'IS. A l'inverse, l'étude de Diabaté (2003) qui a concerné seulement deux quartiers (1 central le même que celui de Robert le long du marigot Houet, 1 périphérique) a révélé des IS très élevés avec une augmentation importante en moins de 15 ans.

Conduite avec les mêmes méthodes d'échantillonnage permettant l'estimation des densités vectorielle (capture sur appât humain), cette étude plus récente a eu recours à l'utilisation de la technique d'ELISA-CSP, méthode plus sensible que l'observation microscopique des glandes salivaires. Ceci aurait permis de déceler un nombre plus élevé de moustiques infectés, ce qui expliquerait en partie les écarts relevés entre les IP. Outre cette différence de protocole dans l'estimation des IS (microscopie vs ELISA) et de l'identification du complexe d'*An. gambiae* (cytogénétique vs PCR), il est indéniable que la transmission a augmenté dans son ensemble à Bobo Dioulasso avec un gradient décroissant de la périphérie vers le centre. L'augmentation de la transmission en périphérie serait due à des raisons multiples telles que i) l'urbanisation anarchique de la ville conduisant à une extension des quartiers périphériques sans toutefois une mise en place réelle de voirie et de systèmes d'écoulement des eaux de pluie ii) une préservation du milieu naturel à l'interface entre le milieu urbain et le milieu naturel favorable au développement des anophèles et enfin iii) l'installation d'activités humaines tels le maraîchage péri-urbain et les carrières de briques qui créent de nombreux gîtes larvaires favorables et très productifs pour les anophèles. Par contre pour le centre ville de Bobo (Dioulassoba), le quartier est de type village traditionnel au contact d'un marigot permanent (le Houet) ce qui crée des similitudes avec le faciès de Niamey traversé par le fleuve Niger. Mais dans ce présent faciès soumis à la grande pression humaine, l'eau du marigot se trouve polluée et le principal vecteur, *An. gambiae* s.s. a dû s'adapter aux gîtes pollués proliférant ainsi toute l'année. Toutes ces raisons contribueraient à une transmission palustre relativement importante dans ce quartier central. Ce cas de figure est donc un cas particulier qui n'est pas à généraliser même dans les autres quartiers centraux de Bobo qui auraient un schéma de transmission classique commun à un centre ville ouest africain plutôt dominé par des gîtes favorables à *C. quinquefasciatus*.

Par ailleurs en sus de l'augmentation de la transmission palustre relevée à la fois en périphérie et en centre ville à Bobo-Dioulasso, on a également observé une augmentation des populations d'*An. arabiensis* vers la fin de la saison sèche (Avril 2006) représentant 70% des femelles prises en faune résiduelle dans le quartier central de Dioulassoba (Dabiré *et al.*, obs. pers.). Ceci n'est qu'une observation ponctuelle mais qui pourrait traduire la conséquence de la modification du milieu sur la composition des espèces anophéliennes et la variation des densités relatives. Aussi, Robert *et al.* (1986) avaient obtenu une fréquence globale de cette espèce à moins de 3% quoique basée sur des techniques différentes.

A Ouagadougou en 1986, des études menées par Sabatinelli puis par Rossi *et al.* (1986) ont révélé que la transmission du paludisme était assurée pour 53.5% par *An. gambiae* s.s. (dont 77.5% du cytotype « Mopti » et 19.3% de « Savane »), 45.5% par *An. arabiensis* et seulement 1.6% par *An. funestus*. A l'instar de la plupart des agglomérations ouest-africaines, l'intensité de la transmission palustre décroissait de la périphérie vers le centre avec respectivement des TIE de 0.9 pi/h/a et de 7-12.7 pi/h/a et en corollaire des indices parasitologiques de 3% à 32% (Sabatinelli *et al.*, 1986). En périphérie, les fluctuations de TIE étaient dues à la proximité ou non des concessions par rapport aux points d'eau (barrages, canaux et caves de briques) alimentant les gîtes larvaires. De nos jours, bien que des difficultés persistent quant à la mesure claire des marqueurs de la transmission, le faciès de la transmission palustre aurait évolué dans cette ville. En effet, l'urbanisation quasi-permanente et anarchique de la ville crée un nombre important de quartiers périphériques précaires tant du point de vue socio-économique que de la disponibilité en gîtes larvaires à anophèles augmentant ainsi les risques de transmission du paludisme.

En conclusion les villes ouest africaines dans leur grande majorité connaissent i) une urbanisation anarchique sans réellement une mise en place de voiries et de systèmes d'écoulement des eaux de pluies tout en préservant le milieu naturel dans ses périphéries et ii)

des activités humaines telles que l'agriculture péri-urbaine et les carrières de briques qui créent de nombreux gîtes larvaires très productifs aux anophèles. Toutes ces conditions favorisent une transmission du paludisme plus croissante dans les périphéries qu'au centre ville où le milieu naturel est plutôt résorbé lié à l'urbanisation extrême et à la pollution défavorisant les gîtes à anophèles au profit du moustique nuisant *C. quinquefasciatus*.

La distribution des vecteurs du paludisme en zone urbaine au Burkina Faso : cas de la ville de Ouagadougou (cf. article 3)

Afin de pouvoir relier des données entomologiques à une prévalence parasitologique du paludisme de 30% observée en saison sèche dans la ville de Ouagadougou (Fournet *et al.*, com pers.), nous avons conduit une enquête entomologique en avril 2006, période correspondant à la fin de la saison sèche. Cette étude a concerné aussi bien les quartiers périphériques et centraux dont le choix s'est basé sur i) la densité humaine (un quartier périphérique dense, un quartier périphérique peu dense, un quartier central urbain dense et un quartier urbain peu dense) ii) le degré d'urbanisation du quartier et iii) leur proximité par rapport aux points d'eau (barrage). Bien que les stades adultes de vecteurs n'aient été collectés qu'en très faible effectif (due aussi à l'utilisation de pièges CDC technique d'échantillonnage, comme nous l'avons déjà dit, moins sensible que la méthode de référence des captures sur sujets humains), notre étude a montré que des gîtes larvaires favorables et productifs à *An. gambiae* s.l. persistaient toute l'année. Ils étaient disséminés autour des retenues d'eau (cave de brique créant une marre permanente, ravins, canaux de bornes fontaines, lits de barrages).

Les vecteurs du paludisme rencontrés étaient composés pour plus de 76% d'*An. arabiensis* suivi d'*An. gambiae* M (22%) et d'une faible proportion de la forme S (3%). Aucun spécimen d'*An. funestus* n'avait été rencontré dans les échantillons analysés.

Sabatinelli et Rossi *et al.* (1986) lors d'une enquête entomologique réalisée dans six quartiers de Ouagadougou (6 périphériques et six centraux) ont montré que les vecteurs du paludisme étaient composés à l'époque d'*An. gambiae* s.s. (cytotypes «Mopti » et « Savane ») pour plus de 53% et de 45% d'*An. arabiensis* avec moins de 6 % d'*An. funestus*. Comparativement aux résultats de Rossi *et al.* (1986), il est difficile de tirer des conclusions pertinentes quant à l'augmentation des populations d'*An. arabiensis* (76% vs 24% pour *An. gambiae* s.s.). En effet notre étude a analysé les spécimens provenant des prospections larvaires faisant la part belle à *An. arabiensis*. Dans les travaux antérieurs ayant pris en compte la fraction endophile collectée par pulvérisation aux pyrèthres, il est évident qu'*An. arabiensis* plus exophile a été rencontré à une fréquence moins élevée à l'intérieur des maisons (45% vs 53% pour *An. gambiae* s.s.). Cependant une probable réduction de la forme moléculaire S dont quelques spécimens ont été trouvés uniquement dans une carrière à banco à l'Ouest de la ville serait plausible due à la modification progressive du milieu naturel ayant provoqué une réduction de ses populations dont le niveau était déjà faible à l'époque (19.3% vs 7% pour la forme M).

Quoique des différences existent dans l'échantillonnage en terme de période (mois d'avril) et de sites (les sites urbains sont les mêmes mais les quartiers périphériques ont totalement évolué depuis l'étude de Rossi) et de méthodes d'échantillonnage (pulvérisation aux pyrèthres vs collection larvaire), nos résultats même préliminaires donnent quelques tendances actuelles relative à la composition des vecteurs dans la ville de Ouagadougou.

En effet la disparition progressive du cytotype « Savane »/forme S s'expliquerait par : (i) l'urbanisation galopante qui a résorbé tout l'espace naturel favorable aux gîtes à S, ii) l'aridité globale de ce faciès dans son ensemble bioclimatique favorisant *An. arabiensis* et iii) l'installation de points d'eau permanente par endroits pollués mais favorables auxquels se sont adaptés *An. arabiensis* et la forme moléculaire M qui pullulent dans les gîtes ensoleillés permanents.

Dans ce même contexte, l'activité humaine a supprimé les gîtes profonds dotés de végétations qui entretenaient les quelques rares biotopes favorables à *An. funestus* transformés maintenant en véritables jardins maraîchers péri-urbains. *An. funestus* a donc complètement disparu de la ville et se retrouve dans les villages aux alentours de Ouagadougou présentant des cours d'eau semi-permanents ou permanents avec de la végétation (Guelbéogo *et al.*, 2005). Il ressort clairement que dans les vieux quartiers urbanisés hautement pollués avec une présence de canaux mal entretenus à eaux domestiques usées favorables au nuisant urbain *C. quinquefasciatus*, la transmission du paludisme est rare à cause de toutes ces raisons que nous venons d'évoquer. La transmission serait alors relativement plus importante en périphérie tel que révélé par Sabatinelli *et al.* (1986).

Il n'est pas exclu que la transmission du paludisme à Ouagadougou à l'instar d'autres agglomérations urbaines en Afrique de l'Ouest connaisse une augmentation dans un futur proche du fait du développement de l'agriculture péri-urbaine tournée vers le maraîchage. En effet, cette activité est soutenue par une intense irrigation créant des points d'eau favorables aux anophèles (Afrane *et al.*, 2004; Keiser *et al.*, 2004; Matthys *et al.*, 2006). A ceci s'ajoute l'exode rural qui contribue à un développement anarchique de la ville dans ses périphéries entraînant toutes les conséquences que nous avons décrites dans les causes anthropiques du paludisme urbain: densité humaine augmentant le réservoir du parasite, fragilisation des conditions socio-économiques avec des déchets domestiques urbains difficiles à évacuer, installation d'activités secondaires de survie tels le maraîchage péri-urbain, la construction d'habitats peu adaptés avec dissémination de gîtes par les carrières de briques etc.

Toutes ces causes créent des gîtes favorables aux principaux vecteurs du paludisme adaptés à ce nouveau contexte urbain et feront à terme des zones urbaines des zones à risque palustre.

Toutefois en l'absence de mesure de TIE lors de nos enquêtes, nous ne pourrions tirer de conclusion que sur la modification de distribution des espèces mais aucune affirmation formelle ne peut être avancée quant à l'augmentation de la transmission du paludisme dans ville de Ouagadougou.

L'urbanisation n'a pas les mêmes conséquences en terme de modification de la faune anophélienne (formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s., *An. arabiensis* et *An. funestus*) et d'augmentation/diminution de la transmission du paludisme et ce en fonction du contexte bioclimatique, de la typologie de la ville et des activités humaines *a priori*. Plusieurs situations doivent être distinguées suivant les faciès épidémiologiques primaires. Dans les villes de forêt équatoriale, on observe une augmentation de la transmission due essentiellement à la déforestation suivie de création de faciès favorables à *An. gambiae* (exemple de Yaoundé) tandis que dans les villes ouest-africaines en savane tropicale on observe une diminution relative de la transmission avec quelques variations importantes (i) une diminution de la transmission dans les centres villes due à l'urbanisation extrême et à la pollution avec cependant une augmentation de la nuisance culicidienne due à *C. quinquefasciatus* (sauf cas particulier comme le quartier de Dioulassoba au centre ville de Bobo-Dioulasso et aussi le centre ville de Niamey en zone sahélienne), (ii) une augmentation de la transmission dans les périphéries des villes en raison de l'urbanisation anarchique à l'interface milieu urbain/milieu naturel environnant et des activités humaines favorisant et entretenant les gîtes à anophèles même pendant les périodes les plus sèches de l'année.

Le paludisme urbain deviendra à moyen et long terme, si aucune politique d'urbanisation fiable n'est mise en place, un sérieux problème de santé publique qui risque de s'aggraver dans un contexte accéléré d'exode rural et d'urbanisation galopante et anarchique dépassant les capacités actuelles des autorités à régler ce problème.

En effet, dans la plupart des cas en Afrique subsaharienne la faiblesse de la transmission en milieu urbain comparé au milieu naturel environnant notamment en savanes tropicales fait que l'on se situe en ville en zone de paludisme «instable». Les citadins, même Africains, n'ayant pas forcément développé une prémunition contre le paludisme sont exposés à la maladie, la plupart étant nés et ayant grandi en ville où ils ont toujours habité. Il n'est pas non plus exclu qu'en cas de prémunition, celle-ci étant fragile, les citadins jeunes ou adultes courent le risque d'un paludisme grave en se rendant au village ou en campagne à transmission plus stable où ils pourraient avoir leur premier contact avec le parasite.

En revanche, le milieu urbain, surtout les capitales, réunit toutes les conditions pour soutenir des programmes efficaces de lutte antivectorielle contre le paludisme car il abrite les décideurs politiques et regroupe les moyens humains, financiers et techniques. Par ailleurs du fait de la forte nuisance culicidienne l'adhésion des populations quant au déploiement de la lutte antivectorielle même basée sur l'utilisation des MII plus accessible en ville que dans les zones rurales sera favorisée. Compte tenu de la transmission faible dans un faciès instable, l'efficacité de la LAV devrait être plus efficiente parce qu'il est plus facile de contrôler une transmission faible et/ou saisonnière qu'une transmission intense et pérenne. A ceci s'ajoute l'accès aux soins et aux médicaments antipaludiques dont une administration adéquate devrait synergiser la LAV. En définitive une réussite de LAV surtout à base de MII dans les villes peut facilement faire tache d'huile et de façon convaincante servir d'exemple aux populations rurales qui interagissent fortement dans nos pays avec les habitants des villes (avec qui les liens n'ont jamais été rompus se traduisant par des flux migratoires entre villes et villages ou par la voie des médias).

CHAPITRE 4: LA RESISTANCE DES VECTEURS AUX INSECTICIDES - CONSEQUENCES SUR LES STRATEGIES DE LUTTE ANTIVECTORIELLE

A l'origine basée sur l'éradication totale du vecteur par l'élimination des gîtes larvaires puis par les pulvérisations intradomiciliaires surtout à base de DDT, la lutte antivectorielle (LAV), en raison de la résistance des vecteurs aux insecticides notamment au DDT (voir détails dans le paragraphe 4.1), a été réorientée vers l'utilisation d'outil de protection communautaire ou individuelle en l'occurrence la moustiquaire imprégnée d'insecticides à base de pyréthrinoïdes. Mais l'efficacité de cet outil de lutte fait aussi face au problème de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes sélectionnée essentiellement dans les zones agricoles à usage intensif d'insecticides. De nouvelles stratégies incluant la combinaison de molécules existantes, la recherche de nouveaux insecticides et même la voie de la lutte génétique sont en ce moment explorées pour une meilleure gestion de la résistance et une optimisation de la LAV.

4.1. Historique de la lutte contre le paludisme

Hippocrate (vers 400 avant J-C) fut le premier à décrire les manifestations du paludisme et les liait à la saisonnalité et à l'environnement. Il élabora la première méthode de prévention du paludisme en déconseillant les populations d'habiter près des marais. L'association entre la maladie et les eaux stagnantes connues aujourd'hui comme gîtes larvaires potentiels des anophèles vecteurs a servi de base aux habitants de la Rome antique qui réalisèrent le drainage des marais, ce qui représentait en réalité la première intervention contre le paludisme ou «malaria» qui signifie en italien «mauvais air».

Le premier traitement prophylactique contre le paludisme remonte à 1600 quand des extraits de *Cinchona* sp (dont *C. ledgeriana*) jadis utilisés par des indiens autochtones du Pérou furent introduits dans le milieu européen par les jésuites (Bovay, 1972).

De ces extraits d'écorce fut tirée la quinine devenue aujourd'hui le traitement de référence contre le paludisme grave. Parallèlement, quelques décennies av. J-C, les chinois utilisaient les extraits de racines d'*Artemisia annua* contre la fièvre d'où dérivent de nos jours l'artémisine dont les différentes combinaisons (ACT ou « artemisinin combination treatment ») sont désormais adoptées comme médicament de première intention dans le traitement du paludisme.

La découverte de l'agent pathogène du paludisme en 1880 par Lavéran qui le décrivit comme un protozoaire et la démonstration des anophèles comme vecteurs de ce parasite en 1897 par Sir Donald Ross apportèrent plus de connaissances sur l'épidémiologie de cette maladie. Dès que fut connu le rôle des anophèles dans la transmission, leur destruction devint l'objectif principal car seul moyen à l'époque pour éliminer la maladie. Accompagnée de la «quininisation» des populations à risques, la lutte antivectorielle était devenue le fer de lance de la lutte contre le paludisme. Elle était basée dans un premier temps sur la destruction des gîtes larvaires surtout par drainage et l'aménagement de l'environnement et par l'utilisation d'huiles minérales ou l'aceto-arséniat de cuivre et suivant les particularités, la pulvérisation intradomiciliaire de pyréthrine contre les moustiques adultes (Swalengrebel *et al.*, 1931; Park Ross, 1936). Des résultats partiels mais positifs ont été alors obtenus dans de nombreuses régions impaludées des pays tempérés dont les Etats-Unis, la France, l'Italie et l'Europe de l'Est. Puis vint l'ère du DDT découvert en 1874 et dont les vertus insecticides ont été reconnues en 1939 (Muller, 1955). Testé et reconnu comme insecticide très efficace à faible dose, à large spectre d'action, à rémanence prolongée et bon marché, son utilisation fut généralisée au point que la pulvérisation intradomiciliaire de DDT a été adoptée comme l'outil de base du Programme Mondial d'éradication du paludisme lancée par l'OMS en 1955 (Macdonald & Göckel, 1964).

L'Afrique, parce que ne disposant pas de connaissances fiables sur la transmission et à cause des particularités du système vectoriel⁹ auquel s'ajoutait le manque notoire de personnel qualifié et de moyens techniques et financiers, ne devrait participer à ce programme que par le biais de zones pilotes représentatives des différentes régions africaines: Burkina Faso, Liberia, Cameroun, Bénin, Ouganda, Sénégal à partir desquelles devait s'élargir l'expérience si elle était jugée concluante (OMS, 1957).

Les succès de cette stratégie furent complets dans 37 pays notamment dans les régions tempérées d'Europe, des Etats-Unis, mais aussi dans certaines régions tropicales d'Amérique du Sud ou d'Asie où les moyens engagés furent à la hauteur des résultats obtenus.

Mais en Afrique intertropicale les succès des campagnes pilotes furent plus nuancés et souvent ponctués d'échecs dans les zones de savane tropicale ouest-africaines (Cavalié & Mouchet, 1961). Les raisons ont été attribuées à l'émergence de la résistance du vecteur principal *An. gambiae* à la dieldrine (Choumara *et al.*, 1959; Cavalié & Mouchet, 1961) puis au DDT même si le premier cas de résistance au dernier a été détecté sept ans après l'arrêt des campagnes pilotes en 1967 (Hamon *et al.*, 1968b). Cette résistance au DDT a plutôt coïncidé avec l'introduction et l'utilisation massive d'une formulation à base de DDT et d'endrine dans la protection du cotonnier (Hamon *et al.*, 1970).

Les raisons de ces échecs, outre l'émergence de la résistance des vecteurs aux insecticides, seraient plutôt dues au peu de connaissance sur la biologie et l'écologie des vecteurs ayant conduit à une mise en place de stratégies de lutte inappropriées et aussi et surtout aux ressources financières et humaines qualifiées quasi-inexistantes (Mouchet *et al.*, 2004).

⁹Le système vectoriel *An. gambiae* / *P. falciparum* en l'occurrence est très efficace, ubiquiste, très stable et particulièrement difficile à contrôler dans les régions endémiques en Afrique subsaharienne

En raison des spécificités vectorielles (Coluzzi, 1984) et surtout des changements politiques tumultueux intervenus dans l'histoire de l'Afrique dans les années 60, l'éradication du paludisme telle que révélée par l'échec des opérations pilotes de lutte fut impossible et progressivement abandonnée (Hamon *et al.*, 1963; Rugemalila *et al.*, 2006).

La lutte contre les vecteurs du paludisme dans les zones endémiques vise désormais à réduire la mortalité et la morbidité palustre par le contrôle de la transmission (WHO, 1995).

L'existence d'une relation proportionnelle entre le nombre de piqûres infectées reçues et la fréquence des accès palustres a renforcé l'idée que, même en dehors du concept d'éradication totale du paludisme, la réduction de la transmission apporte un réel bénéfice sanitaire. A partir de ce nouvel objectif, va s'articuler notamment l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) dont l'usage individuel et collectif réduit considérablement la transmission et la morbidité liée au paludisme comme l'a montré une des études pionnières réalisée dans la région de Bobo-Dioulasso (Carnevale *et al.*, 1988a). De ces études pilotes menées au Burkina Faso partiront d'autres travaux portant sur l'importance et l'efficacité des MII sur la réduction de la morbidité et de la mortalité liées au paludisme, notamment chez les jeunes classes d'âge, dans différents contextes de transmission en Afrique subsaharienne (Alonso *et al.*, 1991; d'Alessandro *et al.*, 1995; Binka *et al.*, 1996; Nevill *et al.*, 1996).

4.2. La lutte antivectorielle

Dans les paragraphes précédents, nous avons vu que la lutte anti-vectorielle était une des composantes majeures de la lutte contre le paludisme. Même si dans l'application, son objectif premier n'a pas été atteint en zone intertropicale et surtout en Afrique subsaharienne, son rôle reste toujours i) exceptionnellement d'éradiquer localement la maladie en éliminant le vecteur ou en interrompant durablement la transmission et le plus souvent ii) de réduire la

transmission dans des proportions telles que la maladie ne soit plus un problème de santé publique, ni un obstacle au développement socio-économique.

Le souci d'associer les efforts pour aboutir à une protection contre d'autres maladies vectorielles, affiche en perspective le concept de lutte intégrée contre les vecteurs. De nombreuses méthodes sont utilisables pour lutter contre les moustiques, mais pour répondre à des critères d'efficacité et de sélectivité, la lutte antivectorielle doit tenir compte avant tout de la bio-écologie et du comportement des espèces cibles ainsi que du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission (WHO, 1995).

En fonction de ces éléments elle peut se pratiquer à différents niveaux:

- la lutte larvicide qui vise à réduire la production de vecteurs,
- la lutte adulticide qui vise à diminuer les densités des populations d'adultes et/ou la longévité des femelles qui perdent ainsi leur capacité à transmettre certains agents pathogènes,
- les mesures de protection individuelle ou collective, qui visent à limiter le contact homme-vecteur et diminuer la densité des femelles voire leur espérance de vie.

La lutte antivectorielle nécessite en pré requis une bonne connaissance de l'identité et de la bio-écologie des populations de vecteurs (cycle de développement, comportement trophique et comportement de repos).

4.2.1. La lutte anti-larvaire

La lutte contre les larves passant directement par le drainage des collections d'eau et l'aménagement physique du milieu a été le schéma d'interventions aux premières heures de la lutte contre le paludisme, surtout dans les régions tempérées, avant l'avènement des insecticides chimiques. Dans le contexte afro-tropical, en zone rurale endémique, la lutte antilarvaire contre les vecteurs du paludisme paraît peu réaliste en raison surtout de la multiplicité et du caractère temporaire des gîtes à *Anopheles*.

Cette lutte antilarvaire pourrait toutefois être envisagée dans certains contextes urbains et péri-urbains, lorsque les principaux gîtes sont en nombre limité, facilement repérables et accessibles et ce, en complément d'autres méthodes de lutte notamment en région de paludisme instable.

En milieu urbain, la méthode de lutte antilarvaire la plus efficace à long terme devrait être basée surtout sur la réduction des gîtes par des mesures d'assainissement. Cependant, elle est difficilement envisageable dans de nombreux pays tropicaux étant donné l'urbanisation anarchique et le peu de moyens dont disposent les autorités municipales. Elle reste donc de nos jours axée sur le traitement chimique des eaux de surface.

Le téméphos (OP) a été jusque-là le principal larvicide utilisé en raison de sa faible toxicité pour la faune non cible (Carnevale & Mouchet, 1990). Plus récemment la lutte biologique avec l'utilisation d'autres organismes prédateurs ou pathogènes tels que les poissons larvivores (Julvez *et al.*, 1987; Sabatinelli *et al.*, 1991), les champignons (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2005) et des bactéries entomopathogènes dont *B. sphaericus* et *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Sinègre *et al.*, 1993; Baldet, 1995) ont donné des résultats intéressants lors d'expérimentations pilotes mais difficile à mettre en œuvre en conditions opérationnelles à grande échelle.

De nos jours, face à l'exode rural et à l'urbanisation accélérée et le plus souvent anarchique, les mesures d'assainissement avec élimination des gîtes larvaires en milieu urbain constituent un véritable challenge dans la plupart des villes africaines car les municipalités par manque de moyens financiers ou par absence de volonté politique ne prennent pas en compte ce volet dans leur plan d'aménagement et d'assainissement. Ainsi on assiste çà et là à une pullulation des genres *Culex* et *Aedes* causant la nuisance, notamment le nuisant urbain pantropical par excellence *C. quinquefasciatus*.

A la faveur de certaines activités anthropiques (construction et agriculture péri-urbaine), des gîtes favorables aux anophèles sont créés et entretenus à la ceinture périphérique des villes (périmètres maraîchers, carrière à banco, fosses d’empreinte de briques etc) conduisant à la persistance des populations de vecteurs souvent à des périodes sèches de l’année où logiquement ils devraient être absents (Keiser *et al.*, 2004, [article 3]).

4.2.2. La lutte contre les stades adultes et les méthodes de protection

Cette modalité qui intègre la nature de l’habitat et le comportement du vecteur s’applique principalement à trois niveaux: la pulvérisation intradomiciliaire, la protection individuelle et collective et éventuellement la lutte génétique encore à l’état de perspective. Originellement, la pulvérisation intradomiciliaire a été la principale méthode de lutte antipalustre par l’utilisation des pyréthrine notamment du fait du caractère endophile des vecteurs du paludisme (Ross, 1906; Swellengrebel *et al.*, 1931). A l’avènement du DDT, elle fut renforcée et perçue comme la clé de l’éradication du paludisme (OMS, 1957).

Avec l’apparition de la résistance des vecteurs à cet insecticide rapportée très tôt en Grèce dès 1951 (Livadas & Georgiopoulos, 1955) et suite à l’échec des campagnes pilotes menées dans différentes régions ouest-africaines (Cavalié & Mouchet, 1961), la pulvérisation intradomiciliaire fut progressivement délaissée dans la lutte contre les vecteurs du paludisme en Afrique subsaharienne.

Seuls quelques pays en Afrique de l’Est et Australe (Mabaso *et al.*, 2004) maintiennent cette pratique en prévention et en contrôle notamment dans les régions à faciès de paludisme instable dit épidémique. La pulvérisation intradomiciliaire utilise désormais les organophosphorés et les pyréthrinoïdes du fait de la résistance au DDT et surtout de son interdiction sous la pression des environnementalistes.

On note toutefois que l'usage du DDT est encore accepté par l'OMS pour les traitements domiciliaires dans certains contextes, comme à Madagascar pour juguler l'épidémie de 1988 (Mouchet *et al.*, 1997) ou de nos jours en Afrique du Sud pour lutter contre *An. funestus* devenu résistant aux pyréthriinoïdes.

Après une longue période de silence à l'exception des quelques cas que nous venons de citer, une nouvelle stratégie combinant l'effet d'une molécule d'insecticide (en l'occurrence un pyréthriinoïde) à la barrière physique de la moustiquaire a vu le jour. Ces moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) dont les premiers essais ont été réalisés au Burkina Faso (Darriet *et al.*, 1984; Carnevale *et al.*, 1988a; Darriet, 1991) ont connu un grand intérêt dès 1990. D'autres études ultérieures menées à grande échelle ont exalté l'importance de cet outil dans la réduction de la morbidité et de la mortalité palustres (Alonso *et al.*, 1991; d'Alessandro *et al.*, 1995; Binka *et al.*, 1996, Nevill *et al.*, 1996).

Les MII diminuent le contact homme-vecteur en repoussant ou en tuant les moustiques qui tentent d'atteindre leur appât qu'est le dormeur (Snow *et al.*, 1988; Robert & Carnevale, 1991; Karch *et al.*, 1993). Elles ont également un effet délétère sur la survie et la fécondité des vecteurs anthropophiles. Elles sont d'autant plus efficaces que la plupart des vecteurs du paludisme ont un comportement nocturne et endophile.

Cependant leur utilisation dans la tranche d'âge de 0-5 ans souleva un certain scepticisme chez certains paludologues qui considéraient que la diminution du nombre de piqûres retardait l'acquisition de la prémunition antipalustre chez les enfants de moins de 5 ans, et cela devait théoriquement se traduire par un rebond des accès plus sévères et un décalage de la mortalité vers les tranches d'âges plus élevées (Snow & Marsk, 1995; Trape & Rogier., 1996; Merzger *et al.*, 1998; Snow, 2000; Askjaer *et al.*, 2001).

Cette hypothèse semble de nos jours moins pertinente car des études récentes ont montré une réduction de la morbidité et de la mortalité palustre chez des enfants de 15 ans qui ont eu une protection sous moustiquaires imprégnées dès leur plus jeune âge (Eisele *et al.*, 2005). Plus de 80 essais réalisés de par le monde ont confirmé que les MII réduisaient sur le long terme et de manière substantielle le paludisme maladie, et ce quelles que soient l'intensité de la transmission, sa répartition dans le temps et l'espèce plasmodiale impliquée (Lengeler, 2004). Elles assurent en réalité deux niveaux de protection: i) à l'échelle de l'individu, elles protègent ceux qui les utilisent en repoussant les moustiques ou en les empêchant de piquer (protection individuelle), ii) à l'échelle d'une communauté, elles réduisent les densités de vecteurs et la transmission du paludisme (protection collective), à condition d'avoir une bonne couverture (au moins 80%), un insecticide efficace et que les moustiques locaux soient sensibles.

Dans tous les cas, utilisé à l'échelle individuelle ou collective, cette stratégie procure une certaine sécurité sanitaire en réduisant non seulement la transmission du paludisme mais en protégeant aussi contre d'autres vecteurs de maladies et contre la nuisance.

Les MII présentent plusieurs avantages. Utilisant une faible quantité d'insecticide, elles sont sélectives pour les seuls insectes anthropophiles. L'insecticide utilisé doit présenter un effet létal rapide («knock down») et une longue rémanence. C'est ainsi que la perméthrine et la deltaméthrine sont les plus utilisées. Les moustiquaires sont imprégnées soit par trempage ou par pulvérisation et restent efficaces pendant au moins six mois sans lavage. Après cette période, il est nécessaire de procéder à une ré-imprégnation. Il est admis que le lavage élimine une bonne partie de l'insecticide (Snow *et al.*, 1987). De même la nature du tissu est très déterminante pour l'efficacité et la rémanence de la moustiquaire imprégnée; les fibres synthétiques comme le nylon procurent une meilleure mortalité sur les moustiques que les fibres naturelles comme le coton car celles-ci fixent plus l'insecticide et l'exposent mieux à l'insecte (Hossain *et al.*, 1986).

Dans sa phase de vulgarisation à large échelle, l'utilisation des moustiquaires imprégnées (le plus souvent par trempage) connaît de sérieuses difficultés liées à la ré-imprégnation (Lines, 1996). Les quelques centres d'imprégnation assurant cette tâche sont le plus souvent éloignés des utilisateurs. A ceci s'ajoute le coût de la ré-imprégnation qui n'est pas souvent à la portée des ménages à l'exception de ceux habitant les centres urbains pour qui l'utilisation de ces MII est plus destinée à lutter contre la nuisance culicidienne.

Pour résoudre ces problèmes liés à la re-imprégnation, des moustiquaires de seconde génération ont vu le jour: les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action ou Long Lasting Impregnated Nets (LLINs) des anglo-saxons. Il s'agit de moustiquaires pré-imprégnées à l'usine dont l'efficacité est théoriquement prévue pour couvrir toute la durée de vie de la moustiquaire: deux à trois ans si elles sont en polyester, quatre à six ans si elles sont en polyéthylène. De plus, leur efficacité persiste lors des lavages (Graham *et al.*, 2005; Gimnig *et al.*, 2005). Une étude récente souligne toutefois que les LLINs souffrent dans les conditions réelles d'utilisation du terrain de dommages importants pouvant altérer leur efficacité sur le long terme au-delà de trois années (Smith *et al.*, 2007).

De nos jours, trois LLINs sont homologuées par l'OMS et vulgarisées dans les zones endémiques: Olyset® imprégnée à la perméthrine, Permanet® à la deltaméthrine et Interceptor® à l'alphacyperméthrine. De toutes, seule Olyset® a des spécifications définitives. L'efficacité de Olyset et de Permanet a été testée en conditions réelles d'utilisation par la population (phase III) où elles réduisent à plus de 95% le taux d'inoculation entomologique (Doannio *et al.*, 1999) avec une baisse significative de la prévalence parasitologique (Henry *et al.*, 1999).

Les campagnes de distribution massive de LLINs récemment réalisées dans plusieurs pays africains ont permis d'obtenir en peu de temps une couverture élevée confirmant les résultats obtenus en phase III avec les moustiquaires imprégnées classique à savoir des réductions importantes de la morbidité (de l'ordre de 50%) et de la mortalité générale infanto-juvénile de l'ordre de 20% (Eisele *et al.*, 2005).

4.3. Les MII, outil des grandes initiatives contre le paludisme

Malgré le fardeau énorme que constitue le paludisme et en l'absence d'un vaccin viable, peu de moyens sont disponibles pour lutter contre cette maladie. Les politiques actuelles sont basées sur le dépistage précoce et le traitement rapide et adapté des cas mais aussi sur la prévention basée essentiellement sur la réduction du contact homme vecteur par l'utilisation des MII. C'est surtout la population à risque que constituent les femmes enceintes et les enfants de 0-5 ans qui est la cible de cette prévention.

Par l'initiative «Faire Reculer le Paludisme» ou en anglais «Roll Back Malaria» les chefs d'états africains réunis à la conférence d'Abusha au Nigeria en 2000 ont pris la résolution de fournir les MII et les traitements intermittents d'antipaludiques à la population cible à hauteur de 60 % au délai de l'an 2005. D'autres initiatives sont aussi développées par des structures comme African Malaria Network (AMANET) pour mieux vulgariser les stratégies de lutte contre le paludisme. Malheureusement des enquêtes récentes indiquent que seulement 2% des enfants africains dorment sous MII (OMS, 2003).

Les raisons de cette faible couverture ne sont pas encore totalement élucidées et résideraient entre autres dans la non accessibilité des MII aux populations cibles du fait de leur coût élevé. Il est important à noter qu'à ce sujet, sept années après la conférence d'Abuja, 24 des 39 pays signataires n'ont toujours pas supprimé les taxes imposées sur les MII malgré les engagements pris dans cette optique (Alilio *et al.*, 2007).

La distribution gratuite des MII à grande échelle ne résoudrait pas non plus tout et des stratégies diverses et complémentaires doivent être mises en place pour arriver à une couverture optimale des populations cibles en l'occurrence les femmes enceintes et les nouveaux nés (Worrall *et al.*, 2005; Grabowsky *et al.*, 2007; Lengeler *et al.*, 2007). En outre, certains aspects socioculturels de l'acceptabilité et des pratiques d'utilisation réelle de ces MII par les ménages surtout en zones rurales limiteraient l'utilisation effective de cet outil par la population même en cas de distribution gratuite. Les dimensions et les formes de ces MII ne seraient pas adaptées aux espaces fonctionnels des unités de couchage et aux réalités des grands ménages africains. Tous ces éléments font l'objet de recherche en socio-anthropologie (Aikins *et al.*, 1994; Van Bortel *et al.*, 1996; Binka *et al.*, 1997; Alai *et al.*, 2003; Adongo *et al.*, 2005; Macintyre *et al.*, 2006; De La Cruz *et al.*, 2006; Baume & Marin, 2007). Toutefois, l'apparition de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes pourrait constituer un facteur limitant à l'utilisation à long terme des MII notamment dans un contexte où aucune nouvelle famille d'insecticide n'a été homologuée en Santé Publique au cours des deux dernières décennies (Guillet & Zaim, 2002).

4.4. Les insecticides utilisés

A l'origine, développés à des fins agricoles, la plupart des insecticides, notamment les pyréthrinoïdes, ont été testés avec succès et introduits en santé publique (Dong, 1986). Ces insecticides sont principalement groupés en quatre grandes familles chimiques.

4.4.1. Les organochlorés

Ces insecticides sont issus de l'industrie du chlore. Les organochlorés sont subdivisés en trois sous-groupe au regard de leur structure chimique et de leur mode d'action: le DDT et ses analogues, le lindane et les cyclodiènes. Ils tuent généralement par contact mais peuvent aussi agir par absorption et dans de rares cas utilisés comme des fumigants.

Le DDT agit à la fois sur le système nerveux périphérique et central en modifiant les caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant (CNaVdp). De par son mode d'action, il exerce sur les insectes un effet rapide appelé effet «knock down» (effet KD) réversibles aux doses subléthales.

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

Le DDT et la dieldrine ont été longtemps utilisés dans les années 50-60 dans les grands programmes d'éradication du paludisme mais abandonnés une décennie plus tard à cause de leur toxicité pour la faune non-cible, leur rémanence dans l'environnement, en particulier pour le DDT qui s'accumule dans les chaînes trophiques, et aussi l'apparition de la résistance des insectes cibles.

4.4.2. Les organophosphorés (OP)

Ces insecticides dérivés de l'acide phosphorique, peuvent être classés en deux sous-groupes: (i) les exothérapeutiques tel le malathion, qui pénètrent directement dans l'organisme des insectes par des voies diverses et (ii) les endothérapeutiques ou systémiques qui sont souvent combinés à la sève des végétaux les rendant toxiques pour les ravageurs qui les consomment. C'est la forme oxydée de ces insecticides qui se fixe sur l'acétylcholinestérase. Cette enzyme dégrade l'acétylcholine, qui agit comme neuromédiateur des synapses cholinergiques, localisées dans le système nerveux central chez les insectes. La fixation des OP sur l'acétylcholinestérase entraîne l'accumulation d'acétylcholine dans la jonction synaptique. Lorsque sa concentration devient trop forte, les récepteurs de l'acétylcholine se bloquent en position ouverte, entraînant la paralysie puis la mort de l'insecte.

Moins toxiques que les organochlorés, ils les ont progressivement remplacés dans les années 50 et sont toujours assez largement utilisés.

4.4.3. Les carbamates (CM)

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'ésérine et à l'instar des organophosphorés, ils sont inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. A l'inverse des organophosphorés, ils sont des inhibiteurs agissant directement sans oxydation préalable. Ces molécules sont moins utilisées en santé publique à cause de leur coût et leur toxicité souvent plus élevée vis-à-vis des mammifères.

4.4.4. Les pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs du chrysanthème, *Chrysanthemum cinerariaefolium*. L'identification des pyréthrines naturelles a permis de synthétiser des composés plus stables à effet insecticide et à rémanence plus marquée. Ces insecticides sont classés en deux groupes selon qu'ils possèdent un radical cyano en position α de la liaison ester (groupe II avec la deltaméthrine, la lambdacyhalothrine, l'alphacyperméthrine, l'etofenprox, la bifenthrine, la cyfluthrine) ou non (groupe I dont la perméthrine).

Les pyréthriinoïdes ont un large spectre d'action et agissent contre tous les stades de développement des insectes. A l'instar du DDT, ces molécules agissent sur le système nerveux central et périphérique en modifiant les caractéristiques électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant (CNaVdp). Ces canaux, une fois activés (c'est-à-dire en position ouverte), entraînent un flux d'ions sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire générant un potentiel d'action.

Cette dépolarisation de la membrane cellulaire qui ne dure que quelques secondes provoque l'activation des CNaVdp situés à proximité et par progression engendre une vague de dépolarisation assurant la propagation de l'influx nerveux (Chapman, 1969). Comme pour le DDT, les pyréthrinoïdes exercent sur les insectes un effet rapide parfois réversible aux doses subléthales appelé effet «knock down» (effet KD). Ils possèdent également des propriétés excito-répulsives et sont peu toxiques pour les mammifères aux doses opérationnelles.

Grâce à ces nombreuses qualités, les pyréthrinoïdes sont actuellement les seuls insecticides homologués en santé publique pour l'imprégnation des moustiquaires ou autres matériaux destinés à lutter contre les vecteurs piquant l'homme la nuit, notamment ceux du paludisme. La perméthrine et la deltaméthrine sont les plus couramment utilisées dans l'imprégnation des moustiquaires, notamment celles dites à longue durée d'action.

4.4.5. Autres insecticides

Les régulateurs de croissance (IGR ou Insect Growth Regulator)

Ce sont des analogues d'hormones de croissance des insectes. Les juvénoïdes (méthoprène, pyriproxifène) inhibent la nymphose alors que les ecdysoïdes (diflubenzuron) inhibent la synthèse de la chitine au moment de la mue (Dhadialla *et al.*, 1998). Mais leur utilisation opérationnelle dans la lutte antivectorielle reste négligeable.

Les bio-larvicides

Deux bactéries entomopathogènes sont utilisées comme larvicides contre les larves de diptères : *B. thuringiensis israelensis* et *B. sphaericus*. Ces deux bactéries produisent des toxines qui agissent par ingestion et exercent entre autres, une action cytotoxique sur les cellules du tube digestif des larves de diptères.

En dehors de quelques essais expérimentaux qui ont donné des résultats intéressants (Sinègre *et al.*, 1993; Baldet, 1995), leur utilisation en conditions opérationnelles à grande échelle demeure difficile.

Les Répulsifs

Certains répulsifs sont aussi utilisés en l'occurrence le N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide connu sous le nom de DEET, soit directement en application cutanée contre les piqûres de moustiques (Costantini *et al.*, 2004), soit en combinaison avec des pyréthrinoïdes sur des moustiquaires dont ils renforcent l'efficacité. Ce dernier aspect combinant répulsif et pyréthrinoïdes fait l'objet de recherche poussée en phase II dans les cases expérimentales au Burkina Faso par l'IRSS/Centre Muraz en collaboration avec l'IRD.

4.5. Les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides

La résistance est définie par l'OMS comme «la faculté chez une souche d'un organisme donné à tolérer les doses d'un produit toxique qui tue la majorité des individus d'une population normale de la même espèce». Plusieurs mécanismes peuvent conférer la résistance aux insecticides mais peuvent être classés en trois (3) catégories.

4.5.1. La résistance métabolique

Ce type de résistance correspond à un accroissement des processus de dégradation qui interviennent dans le métabolisme normal des insecticides. Cette résistance est le résultat soit d'une modification de la structure de l'enzyme, ce qui accroît ses capacités catalytiques (mutations ponctuelles), soit une augmentation de la quantité d'enzyme produite (surproduction). Elles dégradent les insecticides en molécules moins ou non toxiques pour l'insecte.

Trois classes d'enzymes interviennent dans la résistance métabolique aux insecticides chimiques :

- les estérases qui sont impliqués dans la résistance aux organophosphorés et à degré moindre dans la résistance aux pyréthriinoïdes. Elles cassent les liaisons esters des insecticides.

- les oxydases sont des enzymes regroupant plusieurs familles de gènes intervenant toutes dans des réactions d'oxydation. Elles sont principalement impliquées dans la résistance aux pyréthriinoïdes et dans une moindre mesure, aux autres insecticides. Leur implication en tant que mécanisme de résistance est encore mal connue mais ils donneraient lieu à des produits plus solubles dans l'eau pouvant être facilement excrétés.

- les glutathions S-transférases (GST) sont des enzymes qui conjuguent les insecticides avec la forme réduite du glutathion pour former des composés moins toxiques pour l'insecte. L'enzyme la plus importante de ce groupe, la DDT-ase, intervient spécifiquement dans la dégradation du DDT. Chez *An. gambiae* s.s., sept GST différentes ont été identifiées, la résistance au DDT étant associée à des changements quantitatifs et qualitatifs de certaines de ces enzymes (Prapanthadara *et al.*, 1995).

4.5.2. La résistance par modification de la cible

Ces modifications ont été observées au niveau des récepteurs ou des enzymes du système nerveux. De telles résistances sont dues à une baisse d'affinité du site d'action vis-à-vis de l'insecticide. En général les sites d'action chez l'insecte sont l'acétylcholinestérase, les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et le canal sodium voltage-dépendant.

Les mutations au niveau de la cible sont des mécanismes de résistance très efficaces qui s'accompagnent souvent de phénomènes de résistance croisée à tous les insecticides agissant sur la même cible. Parmi ces mutations on peut citer :

L'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme qui met fin à la transmission synaptique en catalysant l'hydrolyse du neurotransmetteur, l'acétylcholine. Les organophosphorés et les carbamates inactivent cette enzyme par phosphorylation de la sérine au niveau du site actif. L'accumulation de l'acétylcholine dans la jonction intersynaptique entraîne l'arrêt de la transmission des impulsions nerveuses et la mort de l'insecte. L'AChE des individus résistants est moins sensible à l'action inhibitrice de ces insecticides que celle des individus sensibles (Hama, 1983 ; Oppenoorth, 1985 ; Soderlund & Bloomquist., 1990 ; Mutero *et al.*, 1994).

Des études ont montré en utilisant la séquence du génome d'*An. gambiae*, l'existence de deux gènes *ace.1* et *ace.2* codant pour deux AChE distincts dont les fonctions diffèrent selon les espèces. Ainsi après clonage, il s'est avéré que la mutation *ace.1* est la cible des insecticides organophosphorés et carbamates chez *An. gambiae* s.l. (Weill *et al.*, 2003, 2004). La mutation *ace.1* impliquée dans ces résistances résulte d'un remplacement de la glycine par la sérine au niveau du segment 119 du gène codant pour l'acétylcholinestérase (mutation G119S).

Le canal sodium dépendant (CNaVdp) et les mutations kdr

Les canaux sodium voltage dépendant (CNaVdp) interviennent dans la transmission de l'influx le long des axones. Ces canaux une fois activés (position ouverte) entraînent un flux d'ions sodium du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, générant un potentiel d'action.

Cette dépolarisation provoque l'activation des CNaVdp situés à proximité et se propage de proche en proche engendrant une vague de dépolarisation qui assure la transmission de l'influx nerveux (Chapman, 1969). Les pyréthriinoïdes et le DDT agissent en modifiant la cinétique d'inactivation des CNaVdp qui est elle-même une protéine transmembranaire composée de 1 800 acides aminés.

L'exposition d'une souche sensible d'insectes au DDT ou à un pyréthriinoïde entraîne une paralysie très rapide ou effet knock down. Ces insecticides agissent au niveau des CNaVdp de la membrane nerveuse en perturbant le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses. Cependant une mutation ponctuelle résultant du remplacement de la Leucine par la Phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant pour le CNaVdp confère la résistance (mutation *kdr* Leu-Phe) aux pyréthriinoïdes et au DDT en Afrique de l'Ouest (Dong, 1986). En Afrique de l'Est c'est plutôt le remplacement de la Leucine par la Serine au niveau des mêmes séquences qui confère la résistance à ces insecticides (mutation *kdr* Leu-Ser). Cette mutation conduirait à une résistance moins marquée que celle de l'Afrique de l'Ouest (Ranson *et al.*, 2000).

4.5.3. Les mécanismes secondaires de la résistance

Il s'agit de mécanismes peu connus dont l'efficacité est relativement moindre, comme la pénétration réduite de l'insecticide à travers la cuticule de l'insecte et les comportements d'évitement.

Ces mécanismes interviennent souvent en synergie avec les mécanismes précédents, métaboliques et modifications de cible, qui demeurent en pratique les principaux mécanismes conférant des résistances aux insecticides.

4.6. La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en Afrique

Dans ce paragraphe nous n'aborderons que la résistance des vecteurs aux pyréthriinoïdes et aux CM et OP du fait de l'importance de ces trois classes d'insecticides dans la lutte contre les vecteurs du paludisme. Les pyréthriinoïdes sont en fait les insecticides de référence dans la lutte contre les vecteurs du paludisme utilisés à la fois pour l'imprégnation des moustiquaires et en pulvérisations intradomiciliaires tandis que les CM et les OP sont aussi préconisés en pulvérisation intradomiciliaire mais surtout pourraient constituer une alternative pour l'imprégnation des MII dans les régions où la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthriinoïdes compromet leur efficacité.

4.6.1. La résistance aux pyréthriinoïdes

En Afrique de l'Ouest

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides a été détectée très tôt en Afrique avec l'apparition de la résistance des anophèles à la dieldrine au Nigéria en 1954 puis quelques années plus tard au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire (Armstrong *et al.*, 1958 ; Adams *et al.*, 1958 ; Hamon & Garrett-Jones, 1963 ; Hamon *et al.*, 1963 ; Hamon *et al.*, 1968a) mais aussi dans la plupart des sites pilotes sélectionnés pour évaluer le programme d'éradication du vecteur. Par contre, la résistance d'*An. gambiae* s.s. au DDT a été plus lente à apparaître et surtout beaucoup plus localisée. En fait, l'apparition de la résistance au DDT a coïncidé avec son introduction massive dans la protection du cotonnier. Le premier cas a été détecté en 1967 à Bobo-Dioulasso, soit sept ans après l'arrêt complet des traitements insecticides en santé publique (Hamon *et al.*, 1968b). Par la suite la résistance au DDT a été décelée en Côte d'Ivoire, au Nigeria, au Mali au Sénégal, au Soudan, en Tanzanie, en Ethiopie et au Swaziland (Coz *et al.*, 1968; Touré, 1982; 1984; OMS, 1992).

Le changement de stratégies, suite à l'abandon du concept de l'éradication du vecteur surtout à base du DDT, a conduit à l'adoption des pyréthriinoïdes en remplacement du DDT. Ils furent alors utilisés comme nous l'avons évoqué plus haut dans l'imprégnation des moustiquaires mais aussi en pulvérisations intradomiciliaires.

Le premier cas de résistance des anophèles aux pyréthriinoïdes fut détecté à Bouaké en Côte d'Ivoire dans les populations d'*An. gambiae* s.s. par Elissa *et al.* (1993). Elle a été associée à l'utilisation intensive du DDT dans les années 60 et plus tard des pyréthriinoïdes à partir des années 70 dans la protection des végétaux particulièrement dans les zones cotonnières. Le gène *kdr* Leu-Phe a été mis en évidence comme principal mécanisme impliqué dans cette résistance. Avec la mise au point d'un test diagnostique moléculaire (Martinez-Torres *et al.*, 1998), la détection de cette mutation *kdr* a été rendue facile et pratique.

Plusieurs études ont été alors entreprises sur la distribution géographique et la fréquence de cette mutation un peu partout en Afrique (figures 20 et 21).

Ainsi il a été montré que la mutation *kdr* Leu-Phe est plus inféodée en Afrique de l'Ouest où elle a été rapportée s'étendant du Sénégal au Nigéria (Chandre *et al.*, 1999a&b; Akogbeto & Yacoubou, 1999; Diabaté *et al.*, 2002; Awolola *et al.*, 2005; Yawson *et al.*, 2005; Tripet *et al.*, 2007; Ketoh *et al.*, 2008). Dans cet espace géographique, elle a été observée à fréquence élevée le plus souvent au-delà de 80% notamment dans la forme moléculaire S sauf en Guinée-Bissau où sa fréquence globale reste encore très faible [article 4]. Il est intéressant de noter ici que la faible fréquence au sein de la forme S en Guinée-Bissau est probablement liée à la faible utilisation passée et actuelle d'insecticides dans le domaine agricole et en Santé Publique dans ce pays.

Cette association de la mutation *kdr* à la forme moléculaire S a été utilisée comme marqueur génétique entre les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. (della Torre *et al.*, 2001; Diabaté *et al.*, 2003b; Fanello *et al.*, 2003; Awolola *et al.*, 2005).

En effet, dans la forme moléculaire M, elle n'a été observée dans un premier temps que chez les populations du littoral Ouest africain au Bénin (Fanello *et al.*, 2000), au Togo (Ketoh *et al.*, 2008) en Côte d'Ivoire (Chandre *et al.*, com. pers.), en Guinée Bissau **[article 4]** devenant beaucoup plus rare au sein de cette même forme dans les savanes à l'intérieur du continent (Diabaté *et al.*, 2002; Diabaté *et al.*, 2003b; Yawson *et al.*, 2005, Tripet *et al.*, 2007).

Mais très récemment, nous avons rapporté une nette augmentation de la fréquence *kdr* dans la forme moléculaire M atteignant plus de 60% dans les zones cotonnières du Sud-Ouest du Burkina Faso alors que sa fréquence initiale était en 2000 à peine de 2% dans un seul site (VK7) à l'interface de périmètres irrigués rizicoles et de la périphérie cotonnière **[articles 2 et 6]**.

Le passage de ce gène de la forme S vers la forme moléculaire M a été attribué au phénomène d'introgession (Weill *et al.*, 2000; **[article 2]**). Mais les inversions chromosomiques pourraient aussi jouer un rôle important non encore bien élucidé (Tripet *et al.*, 2007). En effet sur le littoral du Bénin le gène *kdr* a été trouvé en forte fréquence dans la forme moléculaire M correspondant à la forme chromosomique Forêt portant des inversions *MRb/MRbu* alors qu'en zone de savane du sud-ouest du Burkina Faso, la forme moléculaire M dans laquelle le *kdr* est en pleine expansion correspond à la forme chromosomique Mopti portant des inversions *MRbu* et *MRbc*. Cette relation entre formes chromosomiques et mutation *kdr* en zones côtières comparées aux zones de savanes mérite d'être investiguée plus profondément et pourrait être un bon sujet de recherche. Par ailleurs la mutation *kdr* Leu-Phe a été pendant longtemps non observée chez *An. arabiensis* jusqu'en 2004 où elle a été détectée pour la première fois chez un seul spécimen dans un village cotonnier du Sud-Ouest du Burkina Faso (Soumouso) **[article 2]**. Plus récemment, elle a été retrouvée à une fréquence allélique plus élevée (30%) dans une population d'*An. arabiensis* échantillonnée dans une autre localité du Burkina Faso (Manga) **[article 6]** mais aussi au Sud du Togo (Ketoh *et al.*, 2008).

Si le passage de ce gène dans la forme moléculaire M d'*An. gambiae* s.s. a été attribué au phénomène d'introgression, sa présence chez *An. arabiensis* relevée en 2000 au Burkina Faso serait due à une mutation indépendante de toute relation génétique avec *An. gambiae* s.s. **[article 2]**. Par contre, cette mutation *kdr* n'a pas été observée jusqu'à présent chez *An. funestus*.

En dehors du gène *kdr*, principal mécanisme de résistance aux pyréthriinoïdes, les autres mécanismes de type biochimique (oxydases, estérases et GST) ont été fortement suspectés dans la résistance aux pyréthriinoïdes en Afrique de l'Ouest (Awolola *et al.*, 2005). Mais des résultats ont montré au Bénin notamment à Ladji qu'ils n'auraient qu'un rôle mineur dans la résistance aux pyréthriinoïdes comparés à la mutation *kdr* (Corbel *et al.*, 2007).

La résistance en particulier celle de type *kdr* Leu-Phe a induit une baisse de sensibilité des populations d'*An. gambiae* (forme M) aux MII à base de pyréthriinoïdes dans le Sud du Bénin (N'Guessan *et al.*, 20007). Cette baisse de sensibilité pourrait avoir des conséquences très graves au plan opérationnel si aucune alternative n'est trouvée. La solution passerait par l'utilisation des combinaisons d'insecticides associant des pyréthriinoïdes à des non pyréthriinoïdes (carbamates ou organophosphorés) ou à des répulsifs (DEET) dont l'efficacité a été prouvée en phase II (Pennetier *et al.*, 2005 ; 2007).

En Afrique centrale, de l'Est et du Sud

Si en Afrique de l'Ouest le principal mécanisme de résistance aux pyréthriinoïdes est comme nous venons de le voir la mutation *kdr* Leu-Phe, en Afrique centrale et de l'Est, la situation apparaît plus complexe. La mutation *kdr* Leu-Ser (voir paragraphe 4.5.2. « La résistance par modification de la cible ») a été dans un premier temps découverte dans des populations d'*An. gambiae* s.s. résistantes à la perméthrine et au DDT à l'Ouest du Kenya (Ranson *et al.*, 2000).

Par la suite, l'existence de cette mutation *kdr* Leu-Ser a été confirmée dans la même région non seulement chez *An. gambiae* s.s. mais également chez un spécimen d'*An. arabiensis* (Stump *et al.*, 2004). Cette dernière étude a confirmé l'absence de la mutation ouest-africaine Leu-Phe au Kenya et l'absence de toutes mutations *kdr* chez les populations d'*An. gambiae* s.s. provenant des zones côtières kenyanes.

Plus récemment, avec la mise au point de nouvelles techniques moléculaires permettant de détecter à la fois les deux mutations *kdr* en une seule analyse (Lynd *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006, Tripet *et al.*, 2006), il a été rapporté la mise en évidence concomitante de ces deux mutations au sein des populations d'*An. gambiae* s.s. à la fois en Afrique de l'Est en Ouganda (Verhaeghen *et al.*, 2006) ainsi qu'en Afrique Centrale au Cameroun (Etang *et al.*, 2006; Chouaïbou *et al.*, 2008) et au Gabon (Pinto *et al.*, 2006).

En Afrique Centrale, sur l'île de Bioko (Guinée Equatoriale) c'est la mutation *kdr* ouest africaine Leu-Phe qui est présente chez la forme M d'*An. gambiae* s.s. à une fréquence allélique élevée (Reimert *et al.*, 2005; Sharp *et al.*, 2007) rejoignant ici la situation décrite précédemment sur le littoral ouest-africain en Côte d'Ivoire, au Togo et au Bénin.

Plus au Sud en Angola, une étude récente a montré *a priori* l'absence de la mutation *kdr* Leu-Phe chez les populations d'*An. gambiae* s.s. échantillonnées (Cuamba *et al.*, 2006) mais cela demande à être confirmé par des études plus exhaustives à l'échelle du pays alliant des tests phénotypiques de sensibilité aux insecticides et des diagnostics génotypiques en PCR.

La mutation *kdr* est-africaine de type Leu-Ser a été aussi mise en évidence chez *An. arabiensis* en Ouganda (Verhaeghen *et al.*, 2006) après avoir été rapportée chez cette même espèce dans l'Ouest du Kenya (Stump *et al.*, 2004). Par contre au Nord de la Tanzanie, dans la région de Moshi, c'est la mutation *kdr* ouest-africaine de type Leu-Phe qui a été décelée sur des spécimens d'*An. arabiensis* (Kulkarni *et al.*, 2006), la mutation est-africaine étant absente de ces mêmes populations.

Au Soudan, la mutation Leu-Phe a été rapportée chez différentes populations d'*An. arabiensis* (Himeidan *et al.*, 2007; Abdalla *et al.*, 2008); la mutation Leu-Ser a été en outre détectée chez cette espèce au niveau d'une localité (Himeidan *et al.*, 2007).

La distribution géographique de la mutation *kdr* Leu-Ser s'arrête au Cameroun aux portes de l'Afrique de l'Ouest car elle n'a été trouvée ni au Nigeria voisin (Awolola, com. pers) ni au Bénin (Akogbeto, com. pers.). Mais il n'est pas exclu que dans un avenir proche elle amorce sa progression vers l'Ouest du continent par une propagation de proche en proche ou à la faveur d'un évènement mutationnel indépendant et isolé (Pinto *et al.*, 2008).

D'autres mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes notamment les oxydases ont été aussi impliqués dans la baisse de sensibilité des populations d'*An. gambiae* s.s. au Kenya (Vulule *et al.*, 1999) ainsi que des populations d'*An. arabiensis* au Nord Cameroun (Etang *et al.*, 2004; Etang *et al.*, 2007; Chouaïbou *et al.*, 2008) et au sud du Mozambique (Casimiro *et al.*, 2006a). Ces mécanismes sont aussi à la base de la résistance d'*An. funestus* aux pyréthrinoïdes en Afrique du Sud et au sud du Mozambique (Hargreaves *et al.*, 2000; Amenity *et al.*, 2005; Casimiro *et al.*, 2006b; Amenity *et al.*, 2008).

Distribution de la mutation *kdr* chez *Anopheles gambiae* s.s. en Afrique

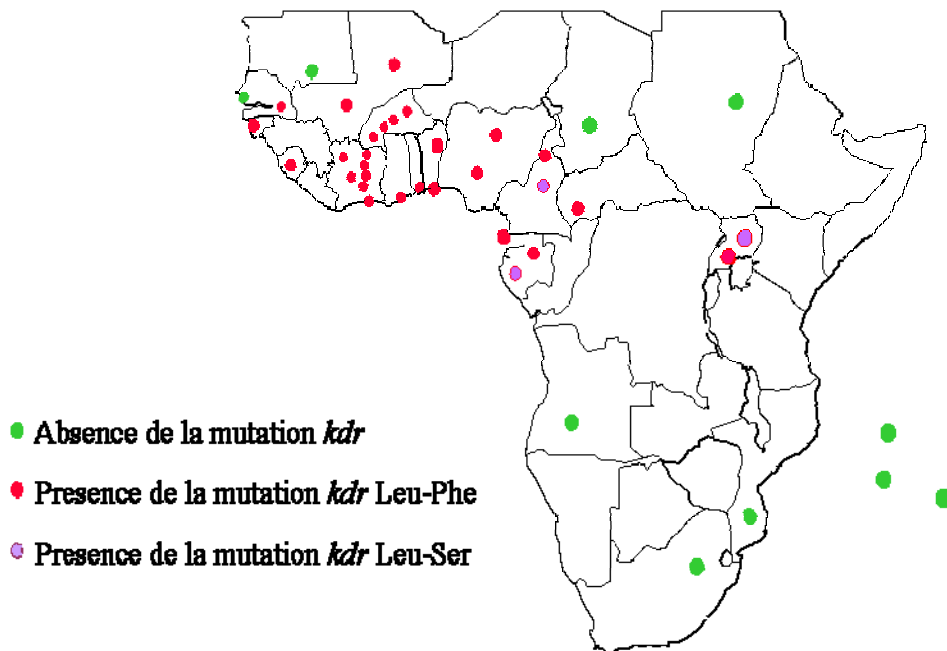


Figure 20: Distribution des mutations *kdr* chez *An. gambiae* s.s. en Afrique [cartographie réactualisée par la revue de la littérature et par nos résultats récents, cf. **articles 2, 4 & 6**]

Distribution de la mutation *kdr* chez *Anopheles arabiensis* en Afrique

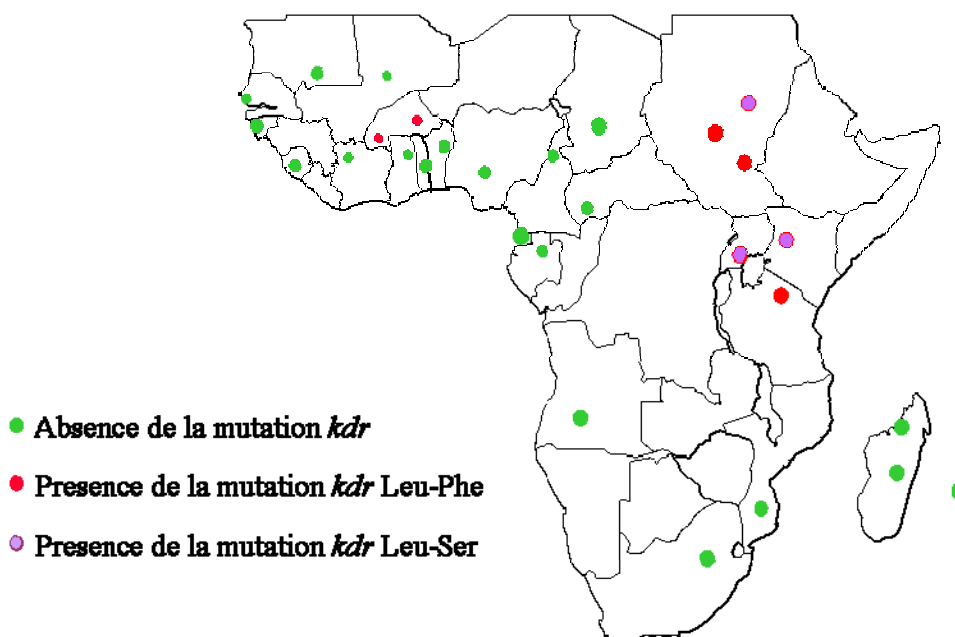


Figure 21 : Distribution des mutations *kdr* chez *An. arabiensis* en Afrique [cartographie réactualisée par la revue de la littérature et par nos résultats récents, cf. **articles 2, 4 & 6**]

4.6.2. La résistance aux carbamates (CM) et aux organophosphorés (OP)

Le premier cas de résistance des vecteurs du paludisme en Afrique aux organophosphorés a été mis en évidence chez *An. arabiensis* vis-à-vis du malathion et du phenthoate au Soudan (Hemingway, 1983). Des baisses de sensibilité au propoxur (CM) ont été également signalées chez *An. funestus* en Afrique du Sud mais probablement liées à la présence dans ces populations d'oxydases surexprimées conférant principalement une résistance aux pyréthriinoïdes (Brooke *et al.*, 2001). Des baisses de sensibilité au propoxur (CM) et/ou au bendiocarb (CM) ont été récemment notées chez des populations d'*An. arabiensis* (Casimiro *et al.*, 2006a) et d'*An. funestus* au Sud du Mozambique reliées avec des niveaux élevés en acétylcholinestérase (AChE) révélés par des dosages biochimiques (Casimiro *et al.*, 2006b; Casimiro *et al.*, 2007).

En Afrique de l'Ouest notamment en Côte d'Ivoire, une résistance au propoxur (CM) avait été notée chez *An. gambiae* s.s. à Bouaké dès 1994 (Elisa *et al.*, 1994). Une décennie plus tard, cette résistance a été confirmée au carbosulfan (CM) avec l'implication de l'AChE mis en évidence par dosages biochimiques. Cette résistance à l'AChE apparaît plus importante dans la forme S que dans la forme M d'*An. gambiae* s.s. pour différentes populations prélevées autour de Bouaké (N'Guessan *et al.*, 2003).

La mise au point d'un outil moléculaire diagnostique de la mutation *ace.1* G119S principal mécanisme impliquée dans la résistance AchE (Weill *et al.*, 2003, 2004) facilite alors sa mise en évidence. Dès lors, cette résistance est retrouvée à un très faible niveau chez une population d'*An. gambiae* forme S à Parakou au Bénin (Corbel *et al.*, 2007) et surtout à des niveaux plus élevés sur plusieurs populations d'*An. gambiae* du Sud-Ouest du Burkina Faso, notamment dans chez la forme S en milieu urbain et rural cotonnier [articles 13 et 14].

Cette mutation a été aussi détectée dans les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* au Togo respectivement aux fréquences respectives de 13% et 23% (Ketoh *et al.*, 2008).

Dans le Sud-Ouest du Burkina Faso, la mutation *ace.1* a été à la fois trouvée dans les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* mais à une fréquence plus élevée chez S [articles 13 et 14]. Cette différence est peut-être liée aux habitats naturels occupés par cette dernière forme l'exposant plus à des pressions de sélection (usage domestique et/ou agricole des OP/CM). Des travaux récents en collaboration avec notre équipe ont montré que le passage de cette mutation chez la forme M s'est fait par introgression à partir de la forme S (Djogbenou, com pers) à l'instar de ce qui a été déjà décrit pour la mutation *kdr* Leu-Phe en Afrique de l'Ouest. Par la suite, la mutation *ace.1* a été mise en évidence chez *An. arabiensis* dans la même région du Sud-Ouest du Burkina Faso (Dabiré, com pers). Mais l'origine et la nature de cette mutation *ace.1* décrite pour la première fois chez cette espèce restent à être élucidées.

Un séquençage de l'intron de cette mutation chez *An. arabiensis* pourrait nous renseigner s'il s'agit d'une mutation indépendante comme ce fut le cas de la mutation *kdr* Leu-Phe chez cette espèce ou plutôt un passage par introgression d'une des formes moléculaire M ou S d'*An. gambiae* vers cette espèce. Ceci est d'autant plus important car on pourrait être en présence chez cette espèce d'une mutation secondaire indépendante de celle qui confère la résistance aux OP/CM chez *An. gambiae* s.l.

Des travaux récents menés au laboratoire ont montré que la mutation *ace.1* G119S conférait chez *An. gambiae* s.s. des niveaux de résistance très élevés aux carbamates et un peu moins important aux organophosphorés (Djogbenou *et al.*, 2007). En outre, la même étude a souligné la capacité de cette mutation sous pression de sélection à s'étendre rapidement sur le terrain compromettant ainsi l'opportunité d'utiliser ces insecticides en Santé publique en lutte contre les vecteurs du paludisme que ce soit en aspersions intradomiciliaires ou sur les MII.

Dès lors, il apparaît nécessaire d'évaluer à une plus grande échelle la présence et l'importance de cette mutation dans les populations naturelles d'*An. gambiae* s.l.

En dehors de l’Afrique de l’Ouest, aucune mise en évidence de cette mutation *ace.1* (résistance croisée OP/CM), du moins à base de cette technique de diagnostic moléculaire, n’a été signalée chez les vecteurs du paludisme ailleurs sur le continent. Des bio-essais pourraient être réalisés dans d’autres pays africains, notamment dans les zones agricoles ayant utilisé ou utilisant de manière extensive les OP/CM, pour évaluer toute baisse de sensibilité à ces insecticides. Ceci permettrait en outre de déterminer, au cas où il y aurait des populations phénotypiquement résistantes, si cette mutation *ace.1* est impliquée à l’origine de cette résistance. De plus, la réalisation d’essais en phase II et III dans les zones d’émergence de l’*ace.1* reste déterminante pour évaluer l’impact de cette résistance sur les méthodes de lutte contre les vecteurs du paludisme à base d’OP ou de CM, à savoir essentiellement les pulvérisations intradomiciliaires voire aussi les MII.

4.7. La résistance des vecteurs aux insecticides au Burkina Faso (articles 2, 5, 6, 11, 13, 14)

Au Burkina Faso, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides est connue depuis les années 60 avec l’émergence de la résistance d’*An. gambiae* et *An. funestus* à la dieldrine à l’Ouest du pays (Hamon *et al.*, 1968a). Le premier cas de résistance au DDT a été détecté en 1967 à Bobo-Dioulasso, soit sept ans après l’arrêt complet des traitements insecticides en santé publique (Hamon *et al.*, 1968b). Par contre, son apparition a coïncidé avec l’introduction massive d’une formulation à base de DDT et d’endrine pour la protection du coton. Avec l’avènement des pyréthrinoïdes utilisés vers la fin des années 80 en priorité dans la lutte contre les ravageurs en agriculture mais aussi dans l’imprégnation des moustiquaires en santé publique, la résistance aux pyréthrinoïdes et la mutation *kdr* Leu-Phe ont été détectées pour la première fois chez *An. gambiae* au Sud-Ouest du Burkina Faso par Chandre *et al.*, 1999a puis confirmée lors d’une investigation plus poussée réalisée en 2000 (Diabaté *et al.*, 2002).

La distribution de la mutation *kdr* Leu-Phe recoupe parfaitement la zone soudanienne, principal bassin cotonnier du pays où une corrélation a été établie entre sa répartition et l'usage agricole des pyréthriinoïdes contre les ravageurs du coton. En effet, l'utilisation intensive de ces insecticides pendant la saison des pluies dans les champs de coton constituerait la principale pression de sélection de cette résistance chez les populations locales d'*An. gambiae* s.s. (Diabaté *et al.*, 2002). Cependant aucune preuve formelle n'a été apportée quant à la présence de résidus d'insecticides dans les gîtes larvaires à *An. gambiae* s.s.

Notre équipe a également trouvé que cette mutation *kdr* Leu-Phe était distribuée de façon prédominante dans les populations de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* s.s. à des fréquences très élevées de l'ordre de 80% tandis qu'elle n'avait été observée qu'à une faible fréquence dans la forme moléculaire M au niveau d'un seul site ie le site rizicole de VK7, village situé à l'interface des périmètres rizicoles de la Vallée du Kou et de la savane environnante (Diabaté *et al.*, 2003b).

De même, nous avons décelé pour la première fois la mutation *kdr* Leu-Phe chez *An. arabiensis* au Sud-Ouest du Burkina Faso mais à une très faible fréquence avec un seul spécimen trouvé porteur de cette mutation à l'état hétérozygote dans le village cotonnier de Soumousso (Diabaté *et al.*, 2004a).

En dehors du Sud-Ouest du Burkina Faso, cette mutation *kdr* avait été aussi rencontrée à de faibles fréquences chez *An. gambiae* s.s. rarement au dessus de 40% dans le plateau central et dans la zone sahélienne indemne d'utilisation intensive d'insecticides (Diabaté *et al.*, 2004b, **[article 2]**). Les bio-essais réalisés de façon concomitante à l'époque ont révélé que les populations de vecteurs provenant de 26 localités disséminées dans ces trois faciès agro-climatiques étaient résistantes à la perméthrine et au DDT dans les zones soudanienne de l'Ouest du pays et sensibles dans les zones soudano-sahélienne et sahélienne (Diabaté, 2003).

Des investigations plus récentes réactualisant ces données en 2006 ont abouti à des résultats quasi identiques pour la distribution géographique et les valeurs de la fréquence de cette mutation dans la forme S d'*An. gambiae* s.s (figure 22). Par contre, ces résultats ont montré une augmentation importante de cette mutation *kdr* chez la forme M à la fois en termes d'extension géographique et de fréquence [articles 5 et 6].

En effet la prévalence de la mutation *kdr* dans cette forme a augmenté d'un facteur 10 et s'est répandue dans toutes les zones soudaniennes du Sud-Ouest atteignant une fréquence de plus de 60 % alors qu'elle n'avait été observée 6 années auparavant que dans le seul village rizicole de VK7 (Diabaté *et al.*, 2003b). De même, elle a été détectée dans les populations d'*An. arabiensis* pour la première fois à Manga en zone soudano-sahélienne à une fréquence relativement élevée de 30%.

L'augmentation du *kdr* chez la forme moléculaire M et dans une moindre mesure chez *An. arabiensis* dans les savanes humides à l'intérieur du pays serait probablement liée à l'extension de la culture du coton et l'usage concomitant des pyréthrinoïdes dans les anciennes et nouvelles régions du Burkina Faso.

En effet les surfaces emblavées sont passées de **210 000 ha** en 1996 à plus de **500 000 ha** en 2005 donnant une production annuelle respective de **210 000 tonnes** à **580 000 tonnes** de coton graine avec en terme d'utilisation d'insecticide une valeur moyenne de 5.4 litres de formulation/ha (Kaminski, 2007). Cette expansion de la culture cotonnière au cours de la dernière décennie et l'utilisation intensive d'insecticides sur cette culture en saison des pluies, majoritairement des pyréthrinoïdes mais aussi des OP et des CM, contribue à sélectionner la résistance chez les vecteurs du paludisme au Burkina Faso. L'augmentation du *kdr* chez la forme M d'*An. gambiae* s.s. et chez *An. arabiensis* est préoccupante car elle peut constituer un obstacle dans la lutte contre *An. gambiae* s.l. à base de MII.

La cartographie de la mutation *ace.1* G119S recoupe pratiquement celle de la mutation *kdr* Leu-Phe (figure 23). En effet cette mutation a été détectée au Burkina Faso dans 14 sites sur 21 explorés. La majorité de ces sites (12 sur 14) se situent dans la zone cotonnière à l'Ouest du pays où elle est présente chez *An. gambiae* s.s. à des fréquences relativement élevées allant de 17 à 60%. Elle est quasi inexistante dans les localités des zones soudano-sahélienne et sahélienne à l'exception de Manga et de Kombissiri pour les zones soudano-sahéliennes au centre-est du pays où elle est détectée à une fréquence inférieure à 1% [article 13].

Si elle a été détectée au sein des deux formes moléculaires S et M d'*An. gambiae* s.s., elle est significativement plus présente dans la forme S avec à la fois une distribution géographique plus importante (des spécimens S porteurs de cette mutation ont été trouvés dans chacune des 14 localités positives) et une fréquence allélique globalement plus élevée (22 homozygotes sur 289 spécimens S testés vs 3 homozygotes sur 178 spécimens M testés). A l'inverse, pour la forme M, elle n'a été trouvée que dans des spécimens provenant de 5 de ces localités toutes situées dans la zone cotonnière à l'Ouest du pays [articles 13 & 14]. Nous notons cependant que la valeur de la fréquence la plus élevée a été enregistrée dans la forme moléculaire M atteignant 63% à Houndé.

La mutation *ace.1* G119S a été aussi détectée pour la première fois en Afrique de l'Ouest comme nous l'avons dit précédemment à l'état hétérozygote chez 3 spécimens d'*An. arabiensis* dans la localité de Diébougou située au Sud-Ouest du pays dans la zone cotonnière.

A l'instar de la mutation *kdr*, la sélection de cette mutation au sein des populations d'*An. gambiae* s.l. serait attribuée à l'usage agricole extensif des carbamates et des organophosphorés, notamment en troisième et quatrième fenêtres dans le traitement du coton en rotation avec les pyréthrinoïdes depuis l'apparition en 1996 d'échecs opérationnels liés à la seule utilisation de cette famille d'insecticide contre les ravageurs (Anonyme, 1997).

Ceci est d'autant plus plausible dans un contexte d'absence d'utilisation des OP/C en santé publique au Burkina Faso. Aucun cas de résistance n'a été signalé au Burkina Faso en ce qui concerne l'autre vecteur majeur du paludisme, *An. funestus* dont les populations échantillonnées en zone rizicole et en zone cotonnière du Sud-Ouest du pays se sont révélées sensibles au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine **[article 11]**.

Nous notons alors qu'au Burkina Faso la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides est un phénomène dynamique avec des foyers de multi-résistance, à la fois aux pyréthrinoïdes et aux OP/CM.

Ces foyers sont plus importants dans le Sud-Ouest du pays mais pourraient s'étendre aux autres régions et pouvant enfreindre à terme l'espoir de l'utilisation des MII ou d'autres méthodes de lutte antivectorielle comme les pulvérisations intradomiciliaire (IRS). La recherche doit désormais s'orienter vers une évaluation de l'efficacité des MII (ou d'autres outils de lutte) dans ce contexte de résistance aux insecticides pour mieux évaluer son impact en terme de Santé publique.

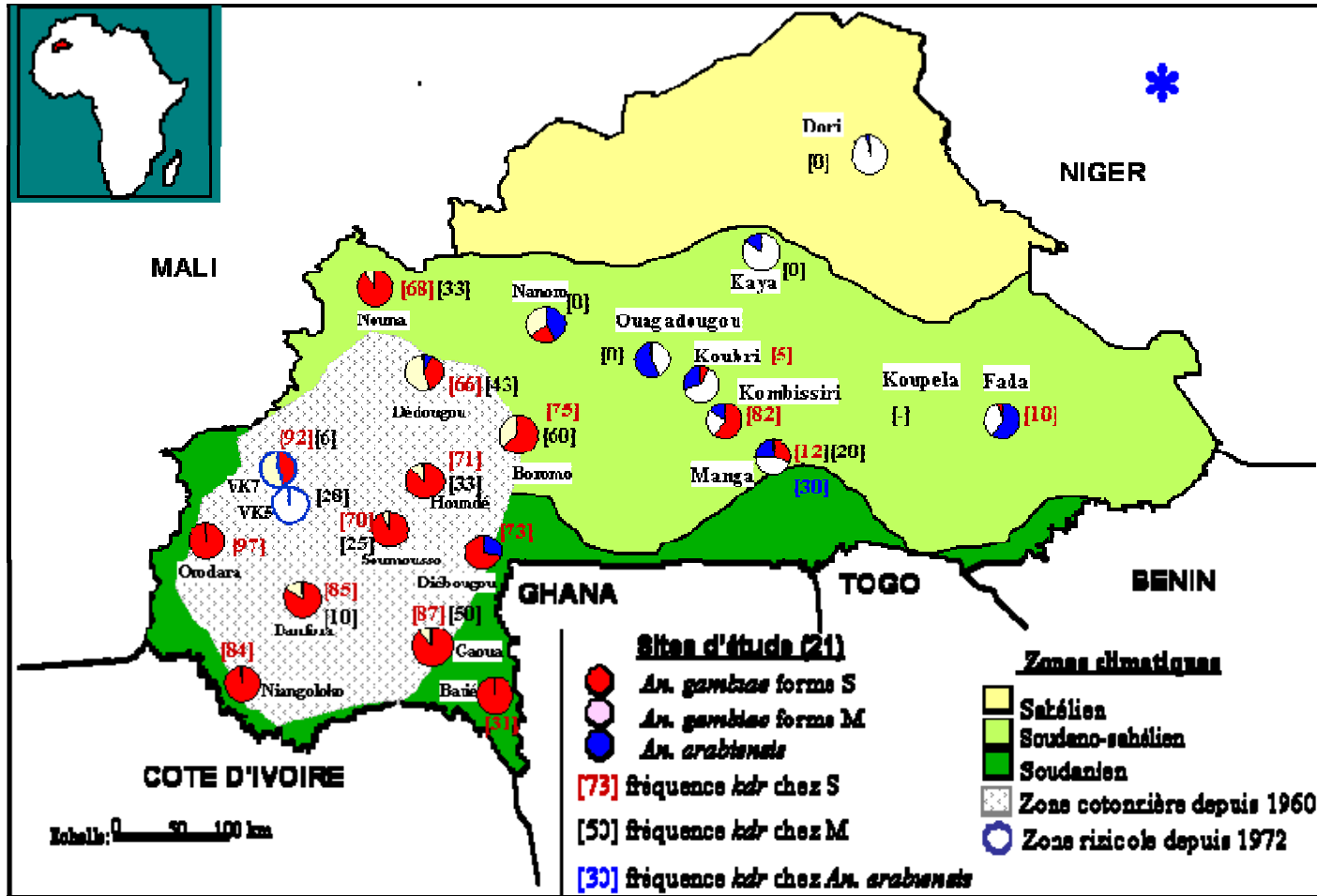


Figure 22: Distribution du gène *kdr* Leu-Phe au sein du complexe *An. gambiae* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. suivant les différentes régions agro-climatiques du Burkina Faso (cf. articles 2, 5 et 6)

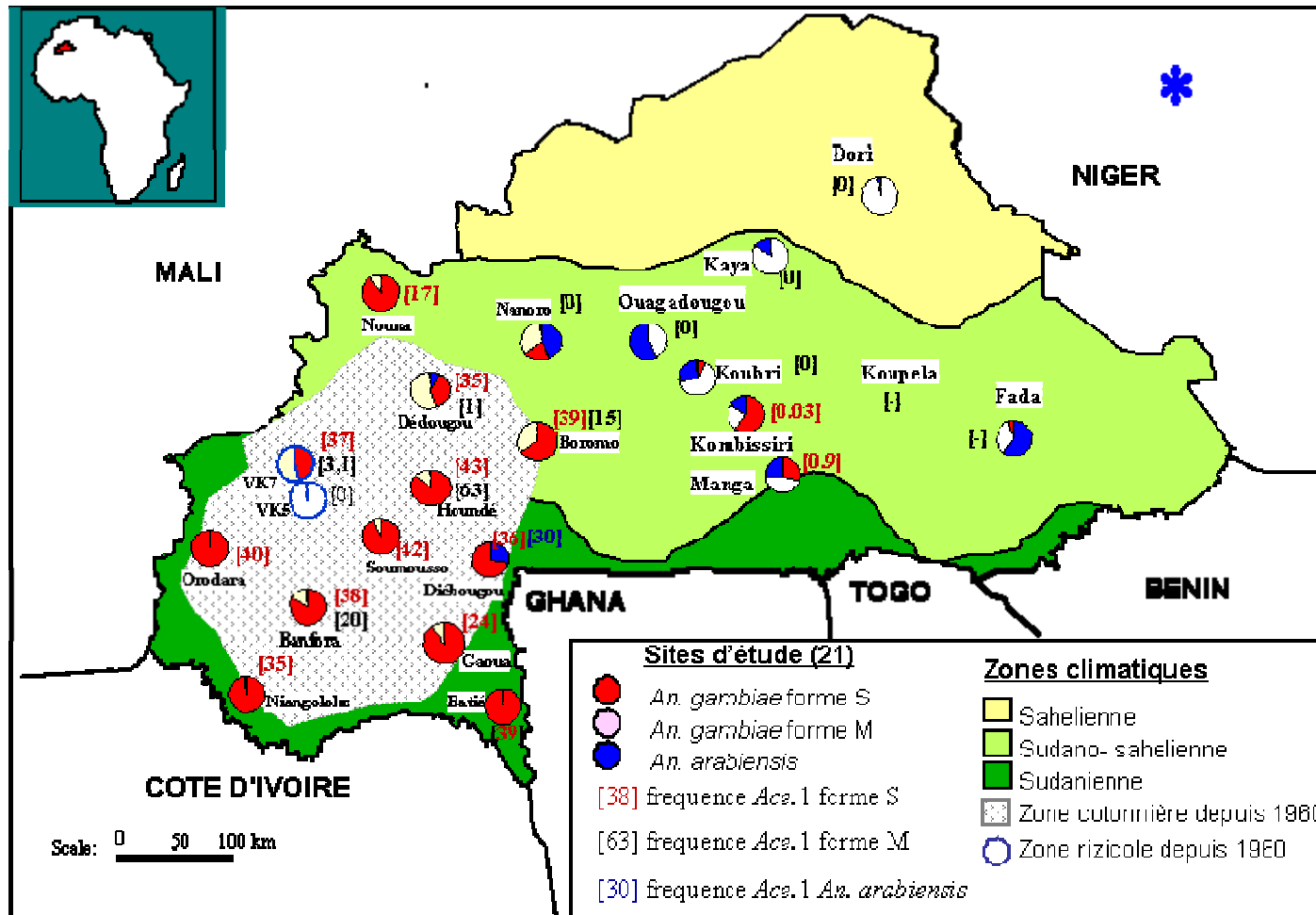


Figure 23: Distribution du gène *ace.1* G116S au sein du complexe *An. gambiae* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. suivant les différentes régions agro-climatiques du Burkina Faso (cf. **article 13**)

4.8. Quelques perspectives de lutte

4.8.1. Les LLINs et les nouvelles combinaisons d'insecticides

L'émergence de la résistance aux insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes, dans les populations de vecteurs soulève quelques inquiétudes car, sur le plan opérationnel, cela pourrait conduire à des échecs des programmes de lutte antivectorielle basés sur l'utilisation des MII. Fort heureusement jusque-là, l'utilisation des MII en masse dans des zones de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes contrôlée par le gène *kdr* Leu-Phe a montré que celles-ci conservaient leur efficacité entomologique (Doannio *et al.*, 1999; Darriet *et al.*, 2000) parasitologique et clinique avec une incidence sur la baisse de la morbidité et de la mortalité palustre chez les enfants de moins de 5 ans (Henry *et al.*, 2005). Toutefois, plus récemment une baisse d'efficacité de ces MII a été récemment observée en casés expérimentales en zone de résistance *kdr* sur le littoral du Bénin (N'Guessan *et al.*, 2007a).

Afin de trouver des solutions alternatives à cette baisse d'efficacité des MII, les recherches se sont orientées vers i) d'autres molécules notamment certains pyréthrinoïdes jusque-là peu ou pas encore testés tel la bifenthrine (Hougard *et al.*, 2002; Chouaïbou *et al.*, 2006), ii) des combinaisons de pyréthrinoïdes avec d'autres insecticides non pyréthrinoïdes tels les CM et les OP (Darriet *et al.*, 2005; Asidi *et al.*, 2005) ou même le DEET (Pennetier *et al.*, 2005 ; 2007; N'Guessan *et al.*, 2006 ; 2008). Ces combinaisons, utilisées en mosaïque ou en mélange sur les moustiquaires, induisaient un effet synergique qui pourrait améliorer significativement l'action des pyréthrinoïdes que si derniers étaient utilisés seuls (Guillet *et al.*, 2001, Hougard *et al.*, 2003). Mais de telles combinaisons sont encore en expérimentation et les résultats très préliminaires ne peuvent être vulgarisés en l'état comme outil de lutte opérationnelle. Elles pourraient ainsi se positionner comme un outil de gestion de la résistance aux pyréthrinoïdes.

En parallèle, les firmes du textile qui fabriquent les moustiquaires ont amorcé le développement de plusieurs séries de la nouvelle génération de moustiquaires à longue durée d'action (LLINs); l'objectif est de rendre plus disponible l'insecticide sur des fibres de meilleure qualité et de meilleure durabilité afin de mieux optimiser leur efficacité et leur rémanence et aussi d'éviter les problèmes liées à la réimprégnation.

En dehors des trois moustiquaires LLINs bien connues en l'occurrence Olyset, Permanet et Interceptor (cf. paragraphe 4.2.2) la plupart des nouvelles LLINs sont encore en voie d'homologation par le WHOPES (WHO Pesticides Evaluation Scheme en anglais) et ne sont pas encore véritablement homologuées, ni vulgarisées.

Efficacité des LLINs au Burkina Faso (cf. article 15)

Nous avons testé et comparé l'efficacité de deux moustiquaires LLINs (Olyset et Permanet) en phase II avancée (conditions d'utilisation réelle par les populations) dans la zone rizicole de la vallée du Kou (VK6) au Burkina Faso en 2003. Bien qu'étant dans un contexte de semi-résistance aux pyréthriinoïdes à l'époque (avec une fréquence allélique de la mutation *kdr* moyennement élevée chez la population locale d'*An. gambiae* sl), les deux LLINs ont montré une efficacité similaire en terme de taux de mortalité, de réduction du gorgement et d'effet répulsif [**article 15**] avec des scores comparables à ceux obtenus en zone dite sensible.

L'efficacité des LLINs à long terme reste à prouver dans la mesure où elles sont utilisées chez des populations rurales ayant des pratiques de lavage susceptibles de détériorer la qualité des fibres. Ce volet a déjà ouvert des pistes de recherche en socio-anthropologie couplées aux études entomologiques (Asidi *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 2005, De la Cruz *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2007). Ces recherches sur la perception et l'utilisation des moyens de lutte contre les vecteurs du paludisme sont aussi développées par notre équipe en réseau avec le Bénin et la Côte d'Ivoire.

4.8.2. Les ITPS

A côté de ces outils, les bâches et plastiques imprégnés de pyréthriinoïdes ou Insecticide Treated Plastic Sheets en anglais (ITPS) ont été conçus et testés avec succès contre les vecteurs en application intradomiciliaire.

A la lumière de la technologie « Long lasting » utilisée sur les MII, le concept de cet outil est aussi d'augmenter la rémanence et la disponibilité de l'insecticide dans ces matériaux afin d'obtenir leur efficacité sur une longue durée.

Efficacité des ITPS au Burkina Faso (cf. article 16)

Nous avons testé ces ITPS en cases expérimentales (phase II classique) dans la zone rizicole de la Vallée du Kou en 2005 avec des résultats satisfaisants en terme de réduction du taux de gorgement et de mortalité des vecteurs dans un contexte de semi-résistance aux pyréthriinoïdes [article 16]. Mais leur modalité d'utilisation en conditions réelles (phase III) par les populations en zones endémiques comme outil de protection individuelle semble plus complexe.

De fait, elles sembleraient plus préconisées pour les réfugiés et dans les zones à conflits, voire dans les installations militaires (Bouma *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 2004). En effet de par leur configuration en bâches ou en feuillets plastiques, seraient-ils perçus par la population comme un outil de lutte ou plutôt comme un objet décoratif encombrant les murs? Convendraient-ils aux formes des maisons et à l'espace fonctionnel des ménages? Face à toutes ces questions, leur mise en application nécessite au préalable des études socio-anthropologiques pour apprécier l'acceptabilité et l'adhésion des populations concernées.



Illustration 14 : Les cases expérimentales de la station expérimentales de la Vallée du Kou
(Burkina Faso).

L'efficacité des pyréthrinoïdes à long terme n'est pas garantie du fait de l'apparition et la dispersion à grande échelle du gène de résistance chez les vecteurs. Malheureusement, le nombre d'insecticides de rechange disponibles en santé publique est réduit. Pour l'instant, l'une des tentatives de recherche et de développement de nouveaux insecticides est conduite par l'initiative de la Fondation Bill Gates en collaboration avec la London School of Tropical Medicine and Hygiene.

Son objectif est de contribuer au développement de nouveaux insecticides qui se positionneraient en avant-garde de la résistance généralisée aux pyréthrinoïdes. En attendant, les stratégies alternatives basées sur la combinaison des pyréthrinoïdes avec des non-pyréthrinoïdes (CM et OP) ou des répulsifs (DEET) donnent des résultats très prometteurs qui pourraient permettre de préserver l'efficacité des MII (Pennetier *et al.*, 2005 ; 2007 ; **[article 17]**).

Plusieurs pays africains tels le Mozambique, l'Afrique du Sud, la Zambie, Madagascar et la Swaziland ont récemment reconduit l'utilisation du DDT en pulvérisations intradomiciliaires dans la lutte contre les vecteurs avec des résultats apparemment très prometteurs. En effet, quelques deux ans après l'introduction du DDT dans ces pays, le taux de transmission du paludisme a été réduit d'au moins 75% ce qui relance le débat quant au retour du DDT dans le contrôle des vecteurs (Rogan & Chen, 2005; Walter & Aimin, 2005).

Les arguments qui plaident pour le retour du DDT se basent sur i) son coût peu élevé donc accessible aux pays en voie de développement et sur le fait que ii) les quantités utilisables en pulvérisation intradomiciliaire n'entraîneraient pas de conséquences environnementales considérables (Rogan & Chen, 2005). En effet les défenseurs du retour du DDT n'envisagent pas son utilisation à large échelle notamment en agriculture où elle pourrait compromettre l'exportation des produits agricoles dans les pays développés qui ont des réglementations plus regardantes en matière de DDT.

Sachant que la résistance aux pyréthrinoïdes est attribuée au passé récent du DDT (résistance croisée DDT/pyréthrinoïdes), une telle pratique pourrait accélérer la généralisation de cette résistance qui a déjà amorcé une nette progression dans des zones jadis exemptes. Il serait alors judicieux de continuer la recherche de stratégies alternatives telle que celles mentionnées précédemment dans le souci d'une gestion durable de l'efficacité des MII.

De plus, l'utilisation du DDT en pulvérisation intradomiciliaire n'est pas sans conséquence sur la santé des populations car il a été observé des dérivés de DDT dans le lait maternel. Il aurait aussi des conséquences sur la santé de la reproduction en affectant la maturation des cellules germinales aussi bien chez l'homme que la femme pouvant induire des naissances prématurées (Longnecker *et al.*, 2001; Hausser *et al.*, 2003). En définitive, il serait trop précoce de généraliser le retour du DDT en pulvérisation intradomiciliaire.

Son utilisation devrait être très encadrée et se faire au cas par cas suivant le contexte de résistance de chaque pays demandeur. Une revue récente fait le point sur les avantages et inconvénients de l'utilisation du DDT en pulvérisations intradomiciliaires contre les vecteurs du paludisme en Afrique sub-saharienne (Guimaraes *et al.*, 2007; Sadasivaiah *et al.*, 2007).

Par ailleurs, l'implication de la lutte génétique dans la stratégie globale de lutte contre le paludisme ouvre de nouvelles perspectives à long terme surtout avec le niveau de connaissance actuelle sur le génome de *P. falciparum* et d'*An. gambiae*. Cette ère de la génomique moléculaire / fonctionnelle et de la protéomique offre d'énormes possibilités de recherche qu'il va falloir transcrire en stratégies opérationnelles de lutte contre le paludisme à moyen et à long termes.

4.8.3. La lutte génétique

L'idée de la lutte génétique contre les vecteurs est relativement ancienne (Craig, 1963) mais son intérêt récent a été relancé avec la publication du génome d'*An. gambiae*. Les données du génome peuvent aider à concevoir et développer des stratégies de lutte incluant la réduction de la longévité des moustiques infectés, leur attractivité chez l'homme et les moustiques réfractaires au parasite du paludisme (Christophides, 2005; Sperança *et al.*, 2007; Lambrechts *et al.*, 2008).

Cette dernière voie cherchant à rendre les populations d'anophèles incapables de transmettre le *Plasmodium* (Marreli *et al.*, 2007) et/ou de réduire la reproduction des anophèles par le lâcher de mâles stériles est en ce moment explorée. Les efforts sont focalisés sur les tissus du moustique avec lesquels interagit le parasite, incluant l'intestin, les glandes salivaires, les hématies ou sur les gènes de comportement du moustique.

Des chercheurs américains ont pu créer des moustiques transgéniques (issue de l'espèce *An. stephensi*, vecteur majeur du paludisme en Asie) en leur administrant une protéine nommée SM1 empêchant l'infestation du moustique par le *Plasmodium* (Clarke, 2002).

Si le transgène paraît stable pouvant passer d'une génération à une autre, le cycle du *Plasmodium* n'est que seulement atténué. La lutte génétique se trouve ainsi confrontée au défi non pas d'introduire un gène dans un organisme ou d'irradier des mâles afin de les rendre stériles mais de réussir l'interaction entre ces organismes génétiquement modifiés et les populations naturelles pour réussir la diffusion de ces gènes d'intérêt dans les dites populations (Moreira *et al.*, 2004).

En la matière, l'une des approches préliminaires mais indispensables est le recrutement de séquences stables considérées comme les bâtisseurs de génomes. Ils pourraient assurer la transmission de gènes d'une génération à une autre sans subir l'influence de la sélection naturelle et donc d'échapper à la loi de Mendel: ce sont les **éléments transposables**. Ces éléments sont définis comme des fragments d'ADN capables de se déplacer dans les génomes et d'un site chromosomique à un autre pouvant ainsi créer des mutations et des remaniements chromosomiques. Ils sont donc une force majeure dans la création, le maintien ou l'évolution génétique des populations naturelles. Avant l'introduction de moustiques génétiquement modifiés transmettant moins le *Plasmodium*, il est indispensable de connaître les flux de gènes entre les populations naturelles, la dynamique des gènes endogènes et l'interaction probable avec les gènes transposés afin d'éviter des interactions peu évolutives. D'abord investiguée chez la drosophile (Josse *et al.*, 2002; Boivin *et al.*, 2003; Ronsseray *et al.*, 2003), l'étude de l'impact des éléments transposables sur la structure et le fonctionnement des génomes a été récemment amorcée chez l'anophèle en l'occurrence chez *An. gambiae* (Quesneville *et al.*, 2003; Boulesteix, 2006). Ces éléments transposables ont été utilisés comme marqueurs de différenciation génétique des populations naturelles d'*An. gambiae* en Afrique et particulièrement des formes moléculaires M et S.

Les éléments transposables comme marqueurs génétiques des formes M et S d'*An. gambiae* au Burkina Faso (cf. article 18)

Au Burkina Faso, nous avons mis en évidence une forte différenciation génétique entre les deux formes moléculaires S et M à partir des profils d'insertion de trois éléments transposables à l'aide du système Transposon Display. Il s'agit des retrotransposons *Aara* δ , *Ozymandias* et du transposon *Crusoe*. La comparaison des profils d'insertion entre populations de M et de S (tous transposons confondus) indique un F_{st}^2 comprise entre 0 et 0.25 pour la forme M tandis qu'elle est entre 0 et 0.21 chez la forme S suggérant une forte différenciation génétique entre les deux formes.

D'autres éléments transposables tels les gènes *Medea* (acronyme de Maternal Effect Dominant Embryonic Arrest) ont été aussi isolés par des chercheurs américains. Ils ont été isolés chez un ver de la farine *Tribolium castaneum* dont la particularité est d'être transmis obligatoirement par chaque femelle à l'ensemble de sa descendance échappant ainsi à la ségrégation mendélienne (Chen *et al.*, 2007). Ils pourraient favoriser la propagation du gène de résistance au *Plasmodium* chez l'anophèle. Mais ces résultats restent préliminaires et sont encore très loin de toute utilisation pratique.

D'autres approches basées sur l'incompatibilité cytoplasmique bactérie-arthropode sont récemment investiguées dans une perspective de lutte contre les anophèles. En effet la bactérie endocellulaire *Wolbachia* très répandue chez les arthropodes développe une incompatibilité cytoplasmique qui se traduit par la mort précoce des embryons issus de croisement entre mâles infectés et femelles non infectées. Cependant la viabilité est normale si la femelle elle-même est infectée ou si le mâle n'est pas infecté. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore bien élucidés, le phénomène peut se résumer comme si la bactérie déposait une substance toxique dans les spermatozoïdes en maturation.

² Le F_{st} est un indice statistique pour décrire la répartition de la variabilité génétique entre et dans les populations étudiées. $F_{st} = 0$ quand les sous populations sont en équilibre, $F_{st} > 0$ quand il y a déficit d'hétérozygotes

Cette substance toxique pourrait être neutralisée par un antidote contenu dans les œufs fécondés s'ils sont infectés au départ par la même bactérie. Cette découverte ouvre des pistes de recherche intéressantes quant à leur transposition éventuelle chez les anophèles vecteurs du paludisme (Poinsot *et al.*, 2003).

Globalement, les informations apportées par le séquençage des génomes peuvent aider à identifier les gènes et les voies impliquées dans la transmission, la pathogénicité des parasites et leurs réponses aux médicaments mais aussi la résistance des vecteurs aux insecticides. Cette voie de recherche est encore très complexe et nécessite souvent une haute technicité; elle ne peut être envisagée que si des moyens techniques et financiers importants sont mobilisés. Maintenant que les génomes des trois acteurs du cycle du paludisme sont séquencés, l'ère post-génomique devrait connaître beaucoup de progrès dans les années à venir. Toutefois, de nombreux travaux de terrain sont encore nécessaires pour décrypter et mieux comprendre toutes les interactions entre les populations naturelles **[article 8]** avant qu'une quelconque intervention à base de moustiques transgéniques ne puisse être réellement opérationnelle.

CONCLUSION

L'éradication du paludisme a été effective dans les régions tempérées grâce à la mise en place de stratégies de lutte appropriées basées sur la lutte antivectorielle alliant aménagement de l'environnement, pulvérisations intradomiciliaires et lutte antiparasitaire. Mais la situation en Afrique subsaharienne est un peu plus complexe due à: i) un système vectoriel très compétent (existence de bons vecteurs et en particulier du système *An. gambiae* / *Plasmodium* très efficient), ii) insuffisance de ressources humaines et financières voire un manque de volonté politique iii) et surtout de la résistance des parasites aux antipaludiques et des vecteurs aux insecticides. Dans tous les cas l'Afrique reste un faciès de paludisme stable avec de longue période de transmission (Mouchet *et al.*, 1997).

En terme de transmission et de complexité vectorielle, notre étude a montré l'existence de quatre vecteurs au Burkina Faso inégalement repartis suivant les faciès écologiques du pays en mettant en exergue le rôle et la part de chaque espèce dans le rythme et l'intensité de la transmission du paludisme. Nous avons en outre réactualisé le statut de résistance des vecteurs aux insecticides avec la distribution des principaux gènes de résistance (*kdr* et *ace.1^R*) en fonction de chaque situation agro-climatique.

De la transmission du paludisme, notre étude a montré une évolution du contexte écologique avec un regain de la transmission comparé au niveau des années 80 tant dans l'environnement modifié par l'homme telle la plaine rizicole de la Vallée du Kou que le milieu rural naturel. Dans le milieu rizicole de la Vallée du Kou surtout dans le village périphérique de VK7, notre étude a mis en évidence une modification dans la composition des vecteurs du paludisme avec l'accroissement de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* au dépend de la forme moléculaire M, la seule rapportée jadis dans tous les villages rizicoles de la Vallée du Kou. Ceci modifie le schéma de la transmission du paludisme assuré jusque au début des années 2000 essentiellement par la seule forme moléculaire M.

Il faudrait alors prendre en compte dans l'avenir cette nouvelle situation surtout en terme de lutte antivectorielle tenant compte du fait que les principaux gènes de résistance (*kdr* et *ace.1^R*) sont plus prévalents chez la forme moléculaire S.

Dans le milieu rural naturel à Lena et à Soumouso où la transmission du paludisme dans les années 80 était assurée principalement par *An. gambiae* s.s., notre étude a dégagé clairement le rôle prépondérant d'*An. funestus* qui joue le rôle de premier vecteur à Léna et qui prend fortement le relais d'*An. gambiae* s.s. en fin de la saison des pluies à Soumouso. Ce schéma est dû à l'installation précoce et à l'augmentation des densités de cette espèce favorisée par des aménagements locaux du milieu avec la prolifération de gîtes appropriés. Par contre cette modification sensible du milieu a éliminé *An. nili* dans ces zones. De fait, cette espèce vectrice n'est plus que cantonnée dans l'extrême sud-ouest du pays où l'environnement est resté peu modifié par l'homme. Le milieu urbain n'est pas non plus resté exempt de modification de la transmission palustre à travers le développement anarchique des quartiers périphériques favorables aux vecteurs auquel il faut ajouter certaines activités anthropiques péri-urbaines tels que le maraîchage et la confection des briques qui créent des gîtes façonnant un nouvel environnement propice aux vecteurs. Ceci devrait se ressentir sur le niveau de transmission du paludisme urbain qui, si on n'y prend garde, pourrait devenir un grave problème de santé publique.

L'une des raisons plausibles de l'augmentation du niveau de la transmission du paludisme pourrait être le réservoir de parasites résistants aux antipaludiques qui circulent dans les populations humaines. La conséquence de cette chloroquinorésistance a été le changement de politique médicamenteuse avec le remplacement de la chloroquine par les ACT comme médicament de première intention. Mais ces ACT en l'occurrence le Coartem sont difficilement accessibles par la population rurale à cause d'une part, de leur coût élevé et d'autre part de leur non disponibilité dans le système de santé actuel.

En attendant la mise au point d'un vaccin fiable, les Etats et les firmes devraient s'impliquer à réduire le coût de ces ACT pour l'ensemble de la population démunie car ceci pourrait aussi limiter le problème d'automédication qui dévie les patients vers d'autres molécules non-conformes.

La résistance des vecteurs aux insecticides connue au Burkina Faso vers la fin des années 60 avec la résistance des vecteurs aux organochlorés demeure toujours le facteur préoccupant de la réussite des programmes de lutte antivectorielle. En effet cité en partie comme l'une des raisons ayant conduit à l'échec du programme d'éradication totale des vecteurs dans les années 50, le problème de la résistance des vecteurs était censé en partie être réglé avec l'adoption des MII imprégnées de pyréthrinoïdes en remplacement du DDT en pulvérisations intradomiciliaires.

L'avènement des MII comme outil de protection individuelle et communautaire promu pour être vulgarisé à grande échelle surtout dans la population cible des enfants de 0-5 ans et des femmes enceintes, a suscité beaucoup d'espoir. En effet l'utilisation de cet outil en masse dans certaines zones endémiques a réduit de façon notable la mortalité et la morbidité liées au paludisme. Mais il s'est posé une série de problèmes liés d'une part à sa ré-imprégnation, et d'autre part à son acceptabilité et son utilisation effective par les populations. L'introduction des MII avec la technologie Long lasting (LLINs) qui garantit leur efficacité sur toute la durée de vie de la moustiquaire (3-5 ans) a résorbé quelque peu le problème de la ré-imprégnation.

Mais si la qualité et la rémanence de l'insecticide sur les MII ont été améliorées, leur efficacité à long terme demeure une question préoccupante surtout dans les zones de résistance des vecteurs aux insecticides. Notre étude a montré qu'au Burkina Faso, le niveau de résistance actuel des vecteurs aux insecticides a significativement augmenté comparé à celui des années 2000 avec des foyers de multi résistance aux pyréthrinoïdes et aux OP/ CM et une extension géographique dans des zones jadis exemptes de résistance.

Les facteurs qui favorisent la propagation de la résistance sont liés à la fois à la bio-écologie du vecteur, du mécanisme de résistance impliqué et surtout de la pression de sélection exercée sur les vecteurs. Ainsi le rôle de l'utilisation agricole des insecticides dans la sélection de cette résistance avait déjà été mis en évidence par les travaux de notre équipe en 2000.

Nos récents travaux confortent cette hypothèse en relevant l'accroissement de la résistance aux pyréthrinoïdes et aux OP/CM dans les nouvelles zones cotonnières emblavées vers la fin des années 90 tandis qu'elle reste à des fréquences très faibles dans les zones vivrières utilisant peu ou pas d'insecticides.

Détecté au départ dans les zones cotonnières de l'Ouest au sein des populations de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* à des fréquences se situant à 90%, la mutation *kdr* Leu-Phe principal mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'Ouest est actuellement quasi fixée dans cette forme et amorce son expansion dans la forme moléculaire M où elle n'avait été détectée qu'à une fréquence de 2% dans une seule localité en 2000. Elle est actuellement aussi détectée dans les populations d'*An. arabiensis* dans une aire géographique hors de la zone cotonnière classique à une fréquence de 30% alors qu'elle n'avait été rencontrée que chez un seul spécimen en 2000 dans le sud-ouest du pays.

La présente étude souligne aussi l'émergence de la mutation *ace.1^R*, principal mécanisme de résistance aux OP/CM, aussi bien dans les zones cotonnières classiques que celles nouvellement emblavées au sein des deux formes moléculaires S et M d'*An. gambiae* s.s avec comme pour le *kdr* une fréquence allélique plus élevée au sein de la forme S.

Un tel niveau de résistance suscite forcément une grosse inquiétude quant à l'impact réel de la résistance sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées au plan opérationnel.

Si plusieurs études ont montré que les MII conservaient leur efficacité dans les zones de résistance et de semi-résistance (Doannio *et al.*, 1999, Darriet *et al.*, 2000; Dabiré *et al.*, 2006) à l'intérieur des terres en savanes humides ouest-africaines, la situation observée sur le littoral reste problématique.

En effet, une baisse d'efficacité des MII testée en phase II a été notée dans les populations de la forme moléculaire M (cytotype Forêt) sur le littoral du Bénin (N'Guessan *et al.*, 2007).

Cette baisse d'efficacité a été attribuée à la mutation *kdr* Leu-Phe détectée en forte proportion dans cette population. Au Burkina Faso, le *kdr* est actuellement en pleine évolution dans les populations de la forme moléculaire M (cytotype Mopti) et un gros travail reste à faire afin de déterminer l'impact de cette résistance génétique sur le statut de résistance réel des vecteurs au niveau phénotypique. Ce travail passerait par des évaluations de l'efficacité des MII et du statut de résistance des vecteurs qui doivent aller au-delà de simples bio-essais en tubes OMS vers des expérimentations en phase II voire des évaluations pluridisciplinaires (entomologique, parasitologique, clinique) en phase III. Ces études permettraient en outre d'établir une relation entre la résistance génétique conférée par les mutations génétiques (*kdr* et *ace.1^R*) et l'expression de ces mutations sur le statut phénotypique de résistance des populations étudiées. Ceci est d'une importance extrême sur le plan opérationnel car renforcerait les stratégies de gestion de la résistance à partir de bases d'information plus concrètes. Au delà de la gestion de la résistance, sur le plan fondamental, ces études permettront de comparer le comportement des populations de la forme moléculaires M du littoral (cytotype Forêt) et des savanes humides à l'intérieur des terres (cytotype Mopti) qui ont acquis le gène *kdr* plus tardivement.

La gestion de la résistance des vecteurs doit être abordée de façon collective et aller au-delà des modèles théoriques qui le plus souvent évoquent peu le rôle du milieu et l'activité humaine en tant source de pression de sélection de cette résistance.

Elle doit alors en plus des concepts scientifiques regrouper tous les acteurs utilisant les insecticides aussi bien en santé publique qu'en agriculture pour permettre de pérenniser les bénéfices des MII le plus longtemps possible. Ceci pourrait se réaliser par une rotation concertée des insecticides afin de limiter l'extension des gènes et mécanisme de résistance à des proportions où leur utilisation ne constituerait plus une pression de sélection de cette résistance.

Cette option n'est pas impossible car la gestion réussie de la résistance aux insecticides en santé publique a été obtenue par exemple avec le Programme de lutte contre l'Onchocercose en Afrique de l'Ouest (OCP) qui a pu maîtriser le développement de la résistance à des proportions raisonnables et ne remettant pas en cause l'efficacité de la lutte antivectorielle (Hougard *et al.*, 1993). Toutefois le risque d'émergence d'autres mécanismes de résistance en l'occurrence la résistance métabolique, doit orienter la recherche vers de nouvelles classes d'insecticides ou de nouvelles combinaisons (associant plusieurs insecticides à propriété complémentaire mais très bénéfique) qui pourraient se positionner en remplacement des pyréthrinoïdes si jamais ceux-ci devenaient inefficaces. Ce risque de généralisation de la résistance qui pourrait affecter l'efficacité des MII a fortement suscité le retour du DDT en pulvérisations intradomiciliaires. Mais la réintroduction du DDT devrait être analysée avec précaution et se faire s'il y avait urgence au cas par cas suivant le contexte de résistance de chaque pays demandeur. En attendant de trouver de nouvelles molécules, l'accent devrait être mis sur le renforcement des stratégies alternatives basées sur les combinaisons de pyréthrinoïdes avec des non pyréthrinoïdes (CM/OP ou répulsifs tels que le DEET).

De nombreux travaux de sensibilisation restent aussi à faire pour mieux « domestiquer » la moustiquaire imprégnée perçue souvent comme un outil d'usage ponctuel ou circonstanciel.

Une approche multidisciplinaire est aussi à encourager car le problème de la résistance des vecteurs aux insecticides s'est posé de façon dichotomique avec celui de la chimiorésistance.

La conséquence qui en résulte est le changement de politique médicamenteuse avec le remplacement de la chloroquine par les ACTs alors qu'aucun point réel n'est fait sur la résistance des vecteurs aux insecticides. Et pourtant ce sont deux composantes d'une même cible, la lutte contre le paludisme.

Dans l'attente d'un vaccin, aucune piste respectueuse de l'éthique ne peut être perçue comme superflue. Il est donc important d'engager les recherches en lutte génétique dont les résultats pourraient compléter d'autres méthodes de lutte antivectorielle déjà appliquées sur le terrain.

De nos jours, le paludisme est de plus en plus relié à l'état de pauvreté des populations et sa réduction est perçue de ce fait comme une priorité de développement socio-économique. S'il demeure une préoccupation majeure pour les spécialistes de la santé, il doit constituer une priorité également pour les décideurs politiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Richard A., 1983. Aspects épidémiologiques et cliniques du paludisme dans les villages de la forêt du Mayombe (République pop. Congo) Thèse médecine Paris Port Royal.
2. Abdalla H., Matambo T.S., Koekemoer L.L., Mnzava A.P., Hunt R.H., Coetzee M., 2008. Insecticide susceptibility and vector status of natural populations of *Anopheles arabiensis* from Sudan. *T. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102: 263-271.
3. Adam J.P., Binson G., Baily H., Eyraud M., Hamon J., 1958. Présence du gène de résistance à la Dieldrine chez *Anopheles gambiae* Giles en basse Côte d'ivoire (A.O.F.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 51, 326-329.
4. Adja A.M., N'goran K.E., Kengne P., Koudou G.B., Toure M., Koffi A.A., Tia E., Fontenille D., Chandre F., 2006. Transmission vectorielle du paludisme en savane arborée à Gansé en Côte d'Ivoire. *Med Trop*, 66: 449-455.
5. Adongo P.B., Kirkwood B., Kendall C., 2005. How local community knowledge about malaria affects insecticide-treated-net use in northern Ghana. *Trop. Med. Int. Health*, 10(4): 366-78.
6. Afrane Y.A., Klinkenberg E., Owusu-Daaku K., Garms R., Kruppa T., Drechsel P., 2004. Does irrigated urban agriculture influence the transmission of malaria in the city of Kumasi, Ghana? *Acta tropica*, 89: 125-134.
7. Aikins M.K., Pickering H., Greenwood B.M., 1994. Attitudes to malaria, traditional practices and bednets (mosquito nets) as vector control measures: a comparative study in five West African countries. *J. Trop. Med. Hyg.*, 97:81-6.
8. Akogbeto M., 2000. Le paludisme côtier lagunaire à Cotonou: données entomologiques. *Cahiers Santé*, 10: 267-275.
9. Akogbeto M., Chippaux J.P., Coluzzi M., 1992. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (Bénin). Etude entomologique. *Rev. Epid. Santé Pub.*, 40: 233-239.
10. Akogbeto M., Romano R., 1999a. Infectivity of *Anopheles melas* vis-à-vis *Plasmodium falciparum* in the coastal lagoon of Benin. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 92: 57-61.
11. Akogbeto M., Yakoubou S., 1999b. Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa [article in French]. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 92: 123-30.
12. Alaii J.A., Hawley W.A., Kolczak M.S., ter Kuile F.O., Gimnig J.E., Vulule J.M., Odhacha A., Oloo A.J., Nahlen B.L., Phillips-Howard P.A., 2003. Factors affecting use of permethrin-treated bed nets during a randomized controlled trial in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 137-141.
13. Alilio M., Mwenesi H., Barat M.L., Payes M. R., Prysor-Jones S., Diara M., McGuire D., Shaw W., 2007. Broken Promise? Taxes and Tariffs on Insecticide Treated Mosquito Nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6): 227-231.
14. Alonso P.L., Lindsay S.W., Schellenberg A.J.R.M., Conteh M., Hill A.G., David P.H., Fegan G., de Francisco A., Hall A.J., Shenton F.C., Chan K., Greenwood B.M., 1991. The effect of insecticide- treated bednets on mortality of Gambian children. *The Lancet*, 337: 1499-1502.
15. Ameyya D.A., Koekemoer L.L., Vaughan A., Morgan J.C., Brooke B.D., Hunt R.H., Ranson H., Hemingway J., Coetzee M., 2005. Isolation and sequence analysis of P450 genes from a pyrethroid resistant colony of the major malaria vector *Anopheles funestus*. *DNA Seq.*, 16(6): 437-45.
16. Ameyya D.A., Naguran R., Lo T.C., Ranson H., Spellings B.L., Wood O.R., Brooke B.D., Coetzee M., Koekemoer L.L., 2008. Over expression of a cytochrome P450 (CYP6P9) in a major African malaria vector, *Anopheles funestus*, resistant to pyrethroids. *Insect Mol Biol.*, 17(1): 19-25.

17. Anonyme, 1988. Development of recommendations for the protection of short stay travellers to malaria endemic areas: memorandum from two WHO meetings. *Bull. Org. Mond. Santé*, 66: 177-196.
18. Anonyme, 1997. Rapport technique sur la campagne agricole cotonnière 1996/1997, 33p.
19. Antonio-Nkondjio C., Awono-Ambene P., Toto J.C., Meunier J.Y., Zabaze-Kemleu S., Nyambam R., Wondji C.S., Tchoumka T., Fontenille D., 2002. High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J. Med. Entomol.*, 39 (2): 350-355.
20. Antonio-Nkondjio C., Kera H., Simard F., Awono-Ambene P., Chouaïbou M., Tchoumka T., Fontenille D., 2006. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon, contribution of secondary vectors to malaria transmission. *J. Med. Entomol.*, 43(6): 1215-1231.
21. Antonio-Nkondjio C., Simard F., Awono-Ambene P., Ngassam P., Toto J.C., Tchoumka T., Fontenille D., 2005. Malaria vectors and urbanisation in the equatorial forest region of south Cameroon. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 99: 347-354.
22. Appawu M.A., Baffoe-Wilmot A., Afari E.A., Nkrumah F.K., Petrarca V., 1994. Species composition and inversion polymorphism of *Anopheles gambiae* complex in some sites of Ghana, West Africa. *Acta Tropica*, 56: 15-23.
23. Armstrong J.A., Ramsdale C.D., Ramakrishna V., 1958. Insecticide resistance in *An. gambiae* Giles in Western Sokoto, Northern Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 52: 247-256.
24. Asidi A.N., N'guessan R., Hutchinson R.A., Lamizana-Traoré M., Carnevale P., Curtis C.F., 2004. Experimental hut comparisons of nets treated with carbamates or pyrethroids insecticides, washed or unwashed, against pyrethroid-resistant mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.*, 18: 134-140.
25. Asidi A.N., N'Guessan R., Koffi A.A., Curtis C.F., Hougard J.M., Chandre F., Corbel V., Darriet F., Zaim M., Rowland M.W., 2005. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malaria J.*, 26, 4(1): 25.
26. Askjaer N., Maxwell C., Chambo W., Staalsoe T., Nielsen M., Hviid L., Curtis C., Theander T.G., 2001. Insecticide-treated bed nets reduce plasma antibody levels and limit the repertoire of antibodies to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 8: 1289-1291.
27. Awolola T.S., Oyewole I.O., Amajoh C.N., Idowu E.T., Ajayi M.B., Oduala A., Manafa O.U., Ibrahim K., Koekemoer L.L., Coetzee M., 2005. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Tropica*, 95: 204-209.
28. Awono-Ambene H.P., Kengne P., Simard F., Antonio-Nkondjio C., Fontenille D., 2004. Description and bionomics of *Anopheles* (Cellia) *ovengensis* (Diptera: Culicidae) a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *J. Med. Entomol.*, 41 (4): 561-568
29. Baldet T., 1995. Etude comparative de deux stratégies de lutte contre *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 par *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 dans la ville de Maroua (Nord Cameroun). Thèse Université Montpellier II, 294p.
30. Baldet T., Diabaté A., Guiguemdé T.R., 2003. Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama), Burkina Faso. *Cahier Santé*, 13 : 55-60.

31. Baum C., Marin M.C., 2007. Intra-household Mosquito Net Use in Ethiopia, Ghana, Mali, Nigeria, Senegal, and Zambia: Are Nets Being Used? Who in the Household Uses Them? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(5): 963-971.
32. Beier J.C., Perking P.V., Wirtz R.A., Koros J., Diggs D., Gargan T.P.I.I., Koetch D.K., 1988. Blood meal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.*, 25: 9-16.
33. Binka F.N., Adongo P., 1997. Acceptability and use for insecticide bednets in northern Ghana. *Trop Med Int Health*, 2: 499-507.
34. Binka F.N., Kubaje A., Adjuik M., Williams L.A., Lengler C., Maude G.H., Arma G.E., Kajihra B., Adiama J.H., Smith P.G., 1996. Impact of permethrin treated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop Med. Int Health* 1 (2): 147-154.
35. Blanford S., Chan B.H.K., Jenkins N., Sim D., Turner R.J., Read A.F., Thomas M.B., 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 308: 1638-1641.
36. Boccolini D., Carraca G.C., Cani P.J., Costantini C., 2002. Preliminary data on *An. funestus* chromosomal polymorphism in a peri-urban site of Western Angola. *Parassitologia*, 44:22.
37. Boccolini D., Carrara G.C., Dia I., Fortes F., Cani P.J., Costantini C., 2005. Chromosomal differentiation of *Anopheles funestus* from Luanda and Huembo provinces, Western and Central Angola. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(6): 1071-1076.
38. Boccolini D., Sabatini A., Sanogo E., Sagnon N., Coluzzi M., Costantini C., 1994. Chromosomal and vectorial heterogeneities in *Anopheles funestus* from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia*, 36: 20.
39. Boccolini D., Sagnon N., Touré Y.T., 1998. Chromosomal polymorphism in *An. funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia*, 40: 14.
40. Boivin A., Gally C., Netter S., Anxolabéhère D., Ronsseray S., 2003. Telomeric associated Sequences of *Drosophila* recruit Polycomb-group proteins *in vivo* and can induce pairing sensitive repression. *Genetics*, 164: 195-208.
41. Boulesteix M., 2006. Polymorphisme d'insertion d'éléments transposable dans les populations naturelles d'*Anopheles gambiae*. Structuration des populations. Thèse Université Claude Bernard Lyon 1.
42. Bouma M.J., Parvez S.D., Nesbit R., Winkler A.M., 1996. Malaria control using permethrin applied to tents of nomadic Afghan refugees in Northern Pakistan. *Bull. World Health Organ.*, 74 (4): 413-21.
43. Bovay G.M., 1972. Malaria: l'épopée du paludisme Paris : Denoël, 314p.
44. Briët O.J.T., Dossou-Yovo J., Akodo E., van de Giesen N., Teuscher T.M., 2003. The relationship between *Anopheles gambiae* density and rice cultivation in the savannah zone and forest zone of Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 8, 439-448.
45. Brooke B.D., Kloke G., Hunt R.H., Koekemoer L.L., Temu E.A., Taylor M.E., Small G., Hemingway J., Coetzee M., 2001. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res.*, 91(4): 265-72.
46. Bruce-Chwatt L.J., 1983. Paludisme et urbanisation. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 76: 243-249.
47. Bruce-Chwatt L.J., 1987. Malaria and its control: present situation and future prospects. *Ann. Rev. Pub. Health*, 8: 75-108.
48. Brun L.O., 1973. Contribution à l'étude biologique et écologique des vecteurs majeurs de paludisme en Afrique de l'Ouest. Thèse d'ingénieur, Fac des Sciences biologiques, Université de Rennes, 223p.

49. Bryan J.H., Petrarca V., Di Deco M.A., Coluzzi M., 1987. Adult behaviour of members of the *An. gambiae* complex in The Gambia with special references to *An. melas* and its chromosomal variants. *Parassitologia*, 29: 221-249.
50. Burkot T.R., Graves P.M., Cattan J.A., Wirtz R.A., Gibson F.D., 1987. The efficiency of sporozoites transmission in the human malarial *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Bull. Org. Mond. Santé*, 65: 375-380.
51. Burkot T.R., Williams J.L., Schneider I., 1984. Identification of *Plasmodium falciparum* - infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 783-788.
52. Caputo B., Dani F.R., Horne G.L., N’Fale S., Diabaté A., Turillazzi S., Coluzzi M., Priestman A.A., Petrarca V., della Torre A., 2007. Comparative analysis of epicuticular lipid profiles of sympatric and allopatric field populations of *Anopheles gambiae* ss molecular forms and *An. arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *Insect Biochemistry Mol. Biol.*, 37: 389-398.
53. Carnevale P., Bosseno M-F., Zoulani A., Michel R., Molez J-F., 1985. La dynamique de la transmission du paludisme humain en zones des environs nord et sud de Brazzaville, Rep. Pop. Congo. *Cah. ORSTOM Sér. Ent. Med. Parasitol.*, 23: 95-115.
54. Carnevale P., Guillet P., Robert V., Fontenille D., Doannio J., Coosemans M., Mouchet J., 1999. Diversity of malaria vectors in rice growing areas of the Afrotropical region. *Parassitologia*, 41: 273-76.
55. Carnevale P., Mouchet J., 1990. Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. *Med. Trop.*, 50: 391-338.
56. Carnevale P., Robert V., Boudin C., Halna J-M., Pazart L., Gazin P., Richard A., Mouchet J., 1988a. La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyrèthrinoides au Burkina Faso. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 81(5): 832-846.
57. Carnevale P., Robert V., Gazin P., Boudin C., Richard A., Molez J-F., Chippaux J-P., Mouchet J., 1988b. Les principaux faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique subsaharienne. *Bull. IFAN*.
58. Casimiro S., Coleman M., Hemingway J., Sharp B., 2006a. Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique. *J. Med. Entomol.*, 43(2): 276-82.
59. Casimiro S., Coleman M., Mohloai P., Hemingway J., Sharp B., 2006b. Insecticide resistance in *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from Mozambique. *J Med Entomol.*, 43(2): 267-75.
60. Casimiro SL, Hemingway J, Sharp BL, Coleman M, 2007. Monitoring the operational impact of insecticide usage for malaria control on *Anopheles funestus* from Mozambique. *Malaria J.*, 31(6): 142.
61. Cavalie Ph., Mouchet J., 1961. Les campagnes expérimentales d'éradication du paludisme dans le nord de la république du Cameroun. *Med. Trop.*, 21: 847-870.
62. Chandre F, Manguin S., Brengues C., Dossou-Yovo J., Darriet F, Diabaté A., Carnevale P., Guillet P., 1999a. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull. World Health Org.*, 77: 230-234.
63. Chandre F., Darriet F., Manguin S., Brengues C., Carnevale P., Guillet P., 1999b. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 15:53-59.
64. Chapman R.F., 1969. The insects' structure and function. The English universities Press Ltd London, UK: 819p.
65. Charlwood J.D., Jones M.D.R., 1979. Mating in the mosquito *Anopheles gambiae* s.l. II. Swarming behaviour. *Physiol. Entomol.*, 5: 315-320.

66. Charlwood J.D., Thomson R., Madsen H., 2002. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. *J. Vector Ecol.* 27: 178-183.
67. Chen C.H., Huang H., Ward C., Su J.T., Shaeffer L.V., Guo M., Hay B.A., 2007. A synthetic maternal-effect selfish genetic element drives population replacement in *Drosophila*. *Science*, 316(5824): 597-600.
68. Chimbari M.J., Chirebvu E., Ndlela B., 2004. Malaria and schistosomiasis risks associated with surface and sprinkler irrigation systems in Zimbabwe. *Acta Tropica*, 89: 205-213.
69. Chinery W.A., 1984. Effects of ecological changes on the malaria vector *Anopheles funestus* and the *Anopheles gambiae* complex of mosquitoes in Accra, Ghana. *J Trop Med Hyg* 87: 75-81.
70. Chinery W.A., 1995. Impact of rapid urbanisation on mosquitoes and their disease transmission potential in Accra, Ghana. *West Africa J. Med. Sc.*, 24: 179-188.
71. Chouaïbou M., Etang J., Brévault T., Nwane P., Hinzoumbe C.K, Mimpfoundi R., Simard F., 2008. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop. Med. Int. Health*, 13 (4): 1-11.
72. Chouaïbou M., Simard F., Chandre F., Etang J., Darriet F., Hougard J.M., 2006. Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against *Anopheles funestus* and pyrethroid and pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* in North Cameroon. *Malaria J.*, 11, 5:77.
73. Choumara R., Hamon J., Ricossé J., Bailly H., Adam J.P., 1959. Le paludisme dans la zone pilote de Bobo-Dioulasso. *Cah. ORSTOM*, 1: 1-125.
74. Christie M., 1959. A critical review of the role of immature stages of anopheline mosquitoes in the regulation of adult numbers with particular reference to *Anopheles gambiae*. *Trop. Dis. Bull.*, 56: 385-399.
75. Christophides G.K., 2005. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cell Microbiol.*, 7: 325-333.
76. Clarke T., 2002. Mosquitoes minus malaria. *Nature*, 419: 429-430.
77. Coene J., 1993. Malaria in urban and rural Kinshasa: the entomological input. *Med. Vet. Entomol.*, 7: 127-137.
78. Coetzee M., Craig M., Le Sueur D., 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol. Today* 16: 74-77.
79. Cohuet A., Simard F., Toto J.C., Kengne P., Coetzee M., Fontenille. D., 2003. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am. J. Trop. Hyg.*, 69: 200-205.
80. Cohuet A., Simard F., Wondji C., Antonio-Nkondjio C., Awono-Ambene P., Fontenille D., 2004.- High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* in a village of Savannah-Forest transition area in Cameroon. *J Med Entomol* 41: 901-905.
81. Coluzzi M., 1984. Heterogeneities of malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull. World Health. Org.*, 62: 107-113.
82. Coluzzi M., 1993. Advances in the study of afrotropical malaria vectors. *Parassitologia*, 35: 23-29.
83. Coluzzi M., Petrarca V., Di Deco M.A., 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles*. *Boll. Zool.*, 52: 45-63.
84. Coluzzi M., Sabatini A., Della Torre A., Di Deco M. A., Petrarca V., 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* complex. *Science* (Wash. DC) 298, 1415-1418.

85. Coosemans M., Wery M., Storme B., Hendrix L., Mfisi B., 1984. Epidémiologie du paludisme dans la plaine rizicole de la Ruzizi, Burundi. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 64: 135-158.
86. Cooter R.J., 1989. Swarm flight behavior in flies and locusts. In: Goldsworthy, G.J. & Wheeler C.H. (Eds) *Insect flight*. Boca Raton Florida, CRC press pp 165-203.
87. Corbel V., N'Guessan R., Brengues C., Chandre F., Djogbenou L., Martin T., Akogbéto M., Hougard J.M., Rowland M., 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica*, 3: 207-216.
88. Costantini C., Badolo A., Ilboudo-Sanogo E., 2004. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535 and KBR-3023 against *An. gambiae* complex and other afro-tropical vectors mosquitoes. *Trop. Med. Hyg.*, 98: 644-652.
89. Costantini C., Sagnon N., Ilboudo-Sanogo E., Coluzzi M., Boccolini D., 1999. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia*, 41: 595-611.
90. Coz J., Davidson G., Chauvet G., Hamon J., 1968. Résistance des anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et Madagascar. *Cahiers ORSTOM Série Ent. Med.*, VI (3/4)1653.
91. Coz J., Hamon J., Sales S., Eyraud M., Brengues J., Subra R., Accrombessi R., 1966. Etudes entomologiques sur la transmission du paludisme humain dans une zone de forêt humide dense, la région de Sassandra, république de Côte d'Ivoire. *Cahier ORSTOM Ser. Ent. Med. Parasitol.*, 7: 13-42.
92. Craig G.B.J., 1963. Prospects for vector control through genetic manipulation of populations. *Bull. World Health Org.*, 29: 89-97.
93. Cuamba N., Choi K.S., Townson H., 2006. Malaria vectors in Angola: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex, their pyrethroid insecticide knockdown resistance (*kdr*) status and *Plasmodium falciparum* sporozoite rates. *Malaria J.*, 5:2 doi:10.1186/1475-2875-5-2.
94. Dabiré K.R., Diabaté A., Baldet T., Paré L., Guiguemdé T.R., Ouédraogo J.B., Skovmand O., 2006. Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *Anopheles gambiae* s.s. resistance to pyrethroids. *Malaria J.*, 5-12 doi: 10.1186/1475-2875-5-12.
95. d'Alessandro U., Olaleye B.O., McGuire W., Languerock P., Bennett S., Aikins M.K., Thomson M.C., Cham M.K., Cham B.A., Greenwood B.M., 1995. Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of a treated bednet programme. *The Lancet*, 345: 479-483.
96. Darriet F., 1991. Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trios pyréthrinoïdes dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parassitologia*, 33: 111-119.
97. Darriet F., Hougard J.M., Corbel V., 2005. Effect of pyrethroid and organophosphate bi-treated nets on the behaviour of Kdr+ *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 98(3): 201-4.
98. Darriet F., N'Guessan R., Koffi A.A., Konan L., Doannio J.M., Chandre F., Carnevale P., 2000. Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 93: 131-134.
99. Darriet F., Robert V., Tho View N., Carnevale P., 1984. Evaluation of the efficacy of permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vector of malaria. WHO/VBC/84.889.

100. De La Cruz N., Crookston B., Dearden K., Gray B., Ivin N., Alder S., Davis R., 2006. Who sleeps under bednets in Ghana? A doer/non-doer analysis of malaria prevention behaviours. *Malaria J.*, **5**:61 doi:10.1186/1475-2875-5-61.
101. De Plaen R., Seka M-L., Koutoua A., 2004. The paddy, the vector and the caregiver: lessons from an ecosystem approach to irrigation and malaria in Northern Côte d'Ivoire. *Acta Tropica*, **89**:135-146.
102. della Torre A., Costantini C., Besansky N., Caccone A., Petrarca V., Powell J.R., Coluzzi M., 2002. Speciation within *Anopheles gambiae* – the glass is half full. *Science*, **298**: 115-117.
103. della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-Yovo J., Favia G., Petrarca V., Coluzzi M., 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *An. gambiae* ss in West Africa. *Insect Mol. Biol.*, **10**(1): 9-18.
104. della Torre A., Tu Z., Petrarca V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* ss molecular forms. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, **35**: 7055-769.
105. Dhadialla T.S., Carlson G.R., Le D.P., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.*, **43**:545–69.
106. Di Deco M.A., Petrarca V., Villani F., Coluzzi M., 1980. Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di *Anopheles allelvi* in laboratorio. *Parassitologia*, **22**: 304-306.
107. Dia I., Diop T., Rakotoarivony I., Kengne P., Fontenille D., 2003. Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean Zone (Ngari, Senegal). *J. Med. Entomol.*, **40** (3): 279-283.
108. Dia I., Lochouart L., Boccolini D., Costantini C., Fontenille D., 2000. Spatial and temporal variations of chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* **7**: 179-184.
109. Diabaté A., 2003. Le paludisme au Burkina Faso: étude de la transmission et répartition géographique de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux pyréthrinoides. Thèse de doctorat, Montpellier 2, 123p.
110. Diabaté A., Baldet T., Brengues C., Kengne P., Dabiré K.R., Simard F., Chandre F., Hougard J.M., Hemingway J., Ouédraogo J.B., Fontenille D., 2003a. Natural swarming behaviour in the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **97**: 713-716.
111. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Akogbeto M., Guiguemdé T.R., Darriet F., Brengues C., Guillet P., Hemingway J., Small G.J., Hougard J.M., 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67** (6): 617-622.
112. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K.R., Kengne P., Simard F., Guiguemdé T.R., Guillet P., Hemingway J., Hougard J.M., 2003b. Kdr mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. *J. Med. Entomol.*, **40**(2): 195-198.
113. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K.R., Simard F., Ouédraogo J.B., Guillet P., Hougard J.M., 2004a. First report of *kdr* mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. *J. Am. Mosq. Control Ass.*, **20** (2), 195-196.
114. Diabaté A., Brengues C., Baldet T., Dabiré K.R., Hougard J.M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J., Chandre F., 2004b. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop. Med. Int. Health*, **9** (12): 1267-73.

115. Diabaté A., Dabiré K.R., Kengne P., Baldet T., Ouari A., Costantini C., Simard F., Fontenille D., 2006. Mixed-swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* in a sympatric area from Burkina Faso. *J. Med. Entomol.*, 43 (3): 480-483.
116. Diallo S., Konaté L., Faye O., Ndir O., Faye M., Gueye A., Diouf M., 1998. Le paludisme dans le district sanitaire sud de Dakar, Sénégal: 2. Données entomologiques. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 91 : 259-263.
117. Diallo S., Konaté L., Ndir O., Dieng T., Dieng Y., Bah I.B., Faye O., Gaye O., 2000. Le paludisme dans le district sanitaire du centre de Dakar, Sénégal: Données entomologiques, parasitologiques et cliniques. *Cahiers Santé*, 10: 221-229.
118. Diop A., Molez J. F., Konate L., Fontenille D., Gaye O., Diouf M., Diagne M., Faye O., 2002. Role of *Anopheles melas* Theobald (1903) on malaria transmission in a mangrove swamp in Saloum (Senegal). *Parasite*, 9: 239-246.
119. Djogbénu L., Weill M., Hougard J.M., Raymond M., Akogbéto M., Chandre F., 2007. Characterization of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): resistance levels and dominance. *J Med Entomol.*, 44(5): 805-10.
120. Doannio J.M.C., Dossou-Yovo J., Diarrasouba G., Chauvancy G., Darriet F., Chandre F., Henry M.C., Nzeymana I., Guillet P., Carnevale P., 1999. Efficacité des moustiquaires pré-imprégnées de perméthrine OLYSET en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes I. Evaluation entomologique. *Med. Trop.*, 59: 349-354.
121. Doannio J.M.C., Dossou-Yovo J., Diarrasouba S., Rakotondraibé M.E., Chauvancy G., Chandre F., Rivière F., Carnevale P., 2002. La dynamique de la transmission du paludisme à Kafiné, un village rizicole en zone de savane humide de Côte d'Ivoire. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 95 (1): 11-16.
122. Dolo G., Olivier J.T., Briët, Dao A., Traoré S.F., Bouaré M., Sogoba N., Niaré O., Bagayogo M., Sangaré D., Teuscher T., Touré Y.T., 2004. Malaria transmission in relation to rice cultivation in the irrigated Sahel of Mali. *Acta Tropica*, 89: 147-159.
123. Dong K., 1986. A single amino acid change in the para-sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, 27: 93-100.
124. Eisele T.P., Lindblade K.A., Wannemuehler K.A., Giming J.E., Odhiambo F., Hawley W.A., Ter Kuile F.O., Howards P.P., Rosen D.H., Nahlen B.L., Vulue J.M., Slutsker L., 2005. Effect of sustained insecticide-treated bed net use on all-cause child mortality in an area of intense perennial malaria transmission in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(1): 149-156.
125. Elissa N., Mouchet J., Rivière F., Meunier J.Y. & Yao K., 1994. Sensibilité d'*An. gambiae* aux insecticides en Côte d'Ivoire. *Cahiers Santé*, 4: 95-99.
126. Elissa N., Mouchet J., Riviere F., Meunier J.Y., Yao K., 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Bel. Med. Trop.*, 73: 291-294.
127. Etang J., Chandre F., Guillet P., Manga L., 2004. Reduced bio-efficacy of permethrin EC impregnated bednets against an *Anopheles gambiae* strain with oxidase-based pyrethroid tolerance. *Malaria J.*, 3:46 doi:10.1186/1475-2875-3-46.
128. Etang J., Fondjo E., Chandre F., Morlais I., Brengues C., Nwane P., Chouaïbou M., Amadou D., Simard F., 2006. First report of the *kdr* mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74: 795-797.
129. Etang J., Manga L., Toto J-C, Guillet P., Fondjo E., Chandre F., 2007. Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *J Vect Ecol*, 32(1): 123-132.

130. Fanello C, Akogbeto M., della Torre A., 2000. Distribution of the knockdown resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94:132.
131. Fanello C., Petrarca V., della Torre A., Santolamazza F., Dolo G., Coulibaly M., Allouche A., Curtis C.F., Toure Y.T., Coluzzi M., 2003. The pyrethroid knockdown resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.*, 12: 241-245.
132. FAO, 1987. Consultation on irrigation in Africa. Food and agriculture organisation of the United-Nations, Rome.
133. Favia G., della Torre A., Bagayoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N'F., Touré Y.T., Coluzzi M., 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *An. gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol. Biol.*, 6 (4): 377-383.
134. Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sideén-Kiamos I., Louis C., 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.*, 10: 15-23.
135. Faye O., Fontenille D., Hervé J.P., Diack P.A., Diallo S., Mouchet J., 1993. Le paludisme en zone sahéenne du Sénégal. 1. Données entomologiques sur la transmission. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 73 : 21-30.
136. Faye O., Gaye O., Fontenille D., Sy N., Konate L., Hebrard G., Herve J.P., Trouillet J., Diallo S., Mouchet J., 1995. Comparaison de la transmission du paludisme dans deux faciès épidémiologiques au Sénégal : la zone côtière sahéenne e la zone méridionale soudanienne. *Dakar Med*, 40(2): 201-207.
137. Fondjo E., Robert V., Le Goff G., Toto J.C., Carnevale P., 1992. Le paludisme urbain à Yaoundé, Cameroun. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 85 : 57-63.
138. Fontenille D., Campbell G.H., 1992. Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56(3): 247-253.
139. Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccolini D., Duchemin J.B., Rajaonarivelo V., Dabire R., Adja-Akre M., Ceainu C., Le Goff G., Simard F., 2003. Systématique et biologie des anophèles vecteurs de *Plasmodium* en Afrique de l'Ouest, données récentes. *Revue Med. Trop.*, 63(3): 247-253.
140. Fontenille D., Lochouart L., 1999. The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia*, 41: 267-271.
141. Gazin P., Robert V., Cot M., Carnevale P., 1988. *Plasmodium falciparum* incidence and patency in a high seasonal transmission area of Burkina Faso. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.*, 82: 50-55.
142. Gillies M.T., Coetzee M., 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). Publications of the South African Institute for Medical Research, no. 55. SAIMR, Johannesburg: pp143.
143. Gillies M.T., De Meillon B., 1968. The Anophelinae of Africa South of Sahara, South African Institute for Medical Research, no. 54, Johannesburg, 2nd ed: pp343.
144. Gimnig J.E., Lindblade K.A., Mount D.L., Atieli F.K., Crawford S., Wolkon A., Hawley W. A., Dotson E.M., 2005. Laboratory washes resistance of long-lasting insecticidal nets. *Trop Med Int Health*, 10 (10): 1022-1029.
145. Githero A.K., Service M.W., Mbogo C.M., Atieli F.K., Juma F.O., 1994. Sampling *Anopheles arabiensis*, *An. gambiae* sensu lato and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) with CDC light traps near a rice irrigation area and sugarcane belt in western Kenya. *Bull. Entomol. Res.*, 84: 19-324.

146. Grabowsky M., Nobiya T., Selanikio J., 2007. Sustained high coverage of insecticide-treated bednets through combined Catch-up and Keep-up strategies. *Trop. Med. Int Health*, 12: 815–822.
147. Graham K., Kayedi M.H., Maxwell C., Kaur H., Rehman H., Malima R., Curtis C.F., Rowland M., 2005. Multi-country field trials comparing wash-resistance of Permanet and conventional insecticide-treated nets against anopheline and culicine mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.*, 19:72-83.
148. Graham K., Rehman H., Ahmad M., Kamal M., Khan I., Rowland M., 2004. Tents pre-treated with insecticide for malaria control in refugee camps: an entomological evaluation. *Malaria Journal* 3:25 doi:10.1186/1475-2875-3-25.
149. Graves P.M., 1980. Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 738-742.
150. Green C., Hunt R., 1980. Interpretation of variation in ovarian polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *Anopheles parensis* Gillies and *Anopheles aruni*. *Genetica* 51: 87-195.
151. Guelbéogo W.M., Grushko O., Boccolini D., Ouedraogo P.A., Besansky N.J., Sagnon NF., Costantini C., 2005. Chromosomal evidence of incipient speciation in the Afrotropical malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Med. Vet. Entomol.*, 19: 458-469.
152. Guillet P., N'Guessan R., Darriet F., Traore-Lamizana M., Chandre F., Carnevale P., 2001. Combined pyrethroid and carbamate “two in one” treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.*, 15: 105-12.
153. Guillet P., Zaim M., 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology*, 18(4): 161-163.
154. Guimaraes R.M., Asmus C.I.R.F., Meyer A., 2007. DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health. *Cad. Saude Publica*, 23(12): 2835-2844.
155. Hall J.C., 1994. The mating of a fly. *Science*, 264:1702-1714.
156. Hama H., 1983. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of AChE. In: G.P. Georgiou and T. Saito (eds) *Pest resistance to pesticide* New York, Plenum: pp 231-299.
157. Hamon J. Choumara R., Ricosse J., Adam J.P., Bailly H., 1959. Le paludisme dans la zone pilote de Bobo-Dioulasso, Haute Volta. *Cahiers ORSTOM*, 1: 125.
158. Hamon J., Coz J., Sales S., Ouédraogo C., 1965. Etudes entomologiques sur la transmission du paludisme humain dans une zone de steppe boisée, la région de Dori, République de Haute -Volta. *Bull. IFAN Serie A*, 27: 1115-1150.
159. Hamon J., Garret-Jones C., 1963. La résistance aux insecticides chez les vecteurs majeurs du paludisme et son importance opérationnelle. *Bull. Org. Mond. Santé*, 28: 1-24.
160. Hamon J., Mouchet J., Brengues J., Chauvet G., 1970. Problems facing anopheline vector control; vector ecology and behaviour before, during and after application of control measures. *Miscellan. Pub. Entomol. Soc. Amer.*, 1: 28-44.
161. Hamon J., Mouchet J., Chauvet G., Lumaret R., 1963. Bilan de 14 années de lutte contre les vecteurs de paludisme dans les pays francophones d'Afrique tropicale et à Madagascar, considérations sur la persistance de la transmission et perspectives d'avenir. *Bull Soc. Path. Exot.*, 56: 933-971.
162. Hamon J., Sales S., Venard P., Coz J., Brengues J., 1968a. Présence dans le Sud-Ouest de la Haute-Volta de populations d'*Anopheles funestus* Giles résistantes à la dieldrine. *Med. Trop.*, 28: 221-226.

163. Hamon J., Subra R., Sales S., Coz J., 1968b. Présence dans le Sud-Ouest de la Haute-Volta de populations d'*Anopheles gambiae* « A » résistantes au DDT. *Med. Trop.*, 28: 221-226.
164. Harbach, R.E., 1994. Review of internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematic and phylogenetic research. *Bull. Entomol. Res.* 84: 331-342.
165. Hargreaves K., Koekemoer L.L., Brooke B., Hunt R.H., Mthembu J., Coetzee M., 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med. Vet. Entomol.*, 14:181-189.
166. Hausser R., Chen Z., Pothier L., Ryan L., Altshul L., 2003. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p-DDE. *Environ Health Perspect*, 111: 1505-1511.
167. Hemingway J., 1983. Biochemical studies on malathion resistance in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 77(4):477-80.
168. Henry M.C., Assi S.B., Rogier C., Dossou-Yovo J., Chandre F., Guillet P., Carnevale P., 2005. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg.*, 73: 859-64.
169. Henry M.C., Doannio J.M.C., Darriet F., Nzeyimana I., Carnevale P., 1999. Efficacité des moustiquaires pré-imprégnées de perméthrine *Olyset Net®* en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes. II. Evaluation parasito-clinique. *Med Trop.*, 59: 355-357.
170. Henry M.C., Rogier C., Nzeyimana I., Assi S.B., Dossou-Yovo J., Audibert M., Mathonnat J., Keundjian A., Akodo E., Teuscher T., Carnevale P., 2003. Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in the savannah of Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health*, 8: 449-458.
171. Himeidan Y.E, Chen H., Chandre F., Donnelly M.J., Yan G., 2007. Permethrin and DDT Resistance in the Malaria Vector *Anopheles arabiensis* from Eastern Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6): 1066–1068.
172. Holt R.A., Subramanian G.M., Halpern A., Sutton G.G., Charlab R., Nusskern D.R., Wincker P., Clark A.G., Ribeiro J.M., Wides R., Salzberg S.L., Loftus B., Yandell M., Majoros W.H., Rusch D.B., Lai Z., Kraft C.L., Abril J.F., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson P.W., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chaturverdi K., Christophides G.K., Chrystal M.A., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans C.A., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer M.E., Hladun S.L., Hogan J.R., Hong Y.S., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin J.J., Lobo N.F., Lopez J.R., Malek J.A., McIntosh T.C., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S.D., O'Brochta D.A., Pfannkoch C., Qi R., Regier M.A., Remington K., Shao H., Sharakhova M.V., Sitter C.D., Shetty J., Smith T.J., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton L.Q., Topalis P., Tu Z., Unger M.F., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford K.J., Wortman J.R., Wu M., Yao A., Zdobnov E.M., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu S.C., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth C.W., Louis C., Kalush F., Mural R.J., Myers E.W., Adams M.D., Smith H.O., Broder S., Gardner M.J., Fraser C.M., Birney E., Bork P., Brey P.T., Venter J.C., Weissenbach J., Kafatos F.C., Collins F.H., Hoffman S.L., 2002. The genome sequencing of the malaria mosquito. *Science*, 2985(5591): 129-149.

173. Hossaim M.I., Curtis C.F., Smith M.D., Ellis S., 1986. Laboratory studies of permethrin impregnated nets and their effects on mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 842-843.
174. Hougard J.M., Zaim S.D., Guillet P., 2002. Bifenthrin: a useful pyrethroid insecticide for treatment of mosquito nets. *J Med Entomol.*, 39(3): 526-33.
175. Hougard J-M, Poudiougou P., Guillet P., back C., Akpoboua L.K.B., Quilévéré D. (1993). Criteria for the selection of larvicides by Onchocerciasis Control Programme in West Africa. *Ann Trop Med Parasitol*, 87 (5): 435-442.
176. Hougard J-M., Corbel V., N'Guessan R., Darriet F., Chandre F., Akogbeto M., Baldet T., Guillet P., Lamizana-Traoré M., 2003. Efficacy of mosquito nets treated with insecticides mixtures and mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* in Côte d'Ivoire. *Bull. Entomol. Res.*, 93 (6): 491-498.
177. Hunt R.H., Coetzee M., Fettene M., 1998. The *Anopheles gambiae* complex: A new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92:231-235.
178. Hunter J.M., Rey L., Chu K.Y., Adekolu-John E.O., Mott K.E., 1993. Parasitic Diseases in Water Resources Development: The Need for Intersectoral Collaboration. World Health Organization, Geneva.
179. Ijumba J.N., Mosha F.W., Lindsay S.W., 2002a. Malaria transmission risk variations derived from different agricultural practices in an irrigated area of northern Tanzania. *Med. Vet. Entomol.*, 16: 28–38.
180. Ijumba J.N., Shenton F.C., Clarke S.E., Mosha F.W., Lindsay S.W., 2002b. Irrigated crop production is associated with less malaria than traditional agricultural practices in Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96: 476-480.
181. Josse T., Boivin A., Anoxlabéhère D., 2002. P element-encoded regulatory products enhance Repeat-Induced Genes Silencing (RIGS) of P-lacZ-white clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Genet. Genomics*, 268: 311-320.
182. Julvez J., Galtier J., Ali Halidi M.A., Henry M., Mouchet J., 1987. Epidémiologie du paludisme et lutte antipaludique à Mayotte, archipel des Comores. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 80: 505-519.
183. Julvez J., Mouchet J., Michault A., Fouta A., Hamidine M., 1997a. Evolution du paludisme dans l'Est sahélien du Niger. Une zone écologiquement sinistrée. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 90 (2): 101-104.
184. Julvez J., Mouchet J., Michault A., Fouta A., Hamidine M., 1997b. Eco-epidemiology of malaria in Niamey and in the river valley, the Republic of Niger, 1992-1995. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 90 (2): 94-100.
185. Kamau L., Munyekenye G.O., Koekemoer L.L., Hunt R.H., Coetzee M., 2003. A survey of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group from 10 sites in Kenya with special emphasis on population genetic structure based on chromosomal inversion karyotypes. *J. Med. Entomol.*, 40: 664-671.
186. Kaminski J., 2007. Réforme de la filière cotonnière burkinabé - retour sur dix ans de mutations: Analyse des impacts économiques et sociaux sur les producteurs et implications des organisations agricoles. Rapport Université de Toulouse, 96p.
187. Karch S., Garin B., Asidi N., Mazambi Z., Salaun J.J., Mouchet J., 1993. Moustiquaires imprégnées contre le paludisme au Zaïre. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 73 (1): 37-53.
188. Keiser J., Utzinger J., Caldas de Castro M., Smith T.A., Tanner M., Singer B.H., 2004. Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71 (2): 118-127.

189. Keiser J., Utzinger J., Singer B.H., 2002. The potential of intermittent irrigation for increasing rice yields, lowering water consumption, reduction methane emissions, and controlling malaria in African rice fields. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 18: 329-340.
190. Ketoh K.G., Ahadji-Dabla M.K., Brengues C., Corbel V., Chandre F., Hougard J-M., Fontenille D., Glitho I.A., 2008. Seasonal distribution and insecticide resistance of *Anopheles gambiae s.l.* in Lome (Togo). *Malaria J.* (in press).
191. Koekemoer L., Weeto M.M., Kamau L., Hunt R.H., Coetzee M., 2002. A cocktail polymerase chain reaction (PCR) assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66: 804-811.
192. Konate L., Diop A., Sy N., Faye M., Deng Y., Izri A., Faye O., Mouchet J., 2001. Comeback of *Anopheles* in Sahelian Senegal. *The Lancet*, 358 (9278): 336-336.
193. Kulkarni M.A., Rowland M., Alifrangis M., Mosha F.W., Matowo J., Malima R., Peter J., Kweka E., Lyimo I., Magesa S., Salanti A., Raul E.M., Drakeley C., 2006. Occurrence of the leucine-to-phenylalanine knockdown resistance (*kdr*) mutation in *Anopheles arabiensis* populations in Tanzania, detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria Journal*, 5:56 doi:10.1186/1475-2875-5-56.
194. La Chance L.E., Schidt C.H., Bushland R.C., 1967. Stérilité induite par la radiation. In: Kligore W.W. & Doult R.L. (ed): Contrôle des parasites : Méthodes chimiques, biologiques, physiques choisies. Ed. Académique, New York, 477pp.
195. Lambrechts L., Koella J.C., Boe C., 2008. Can transgenic mosquitoes afford the fitness cost? *Trends Parasitol*, 24 : 4-7.
196. Le Bras M., Soubiran C., Baraze A., Mestlet B., Combe A., Giap G., Fabre A., 1986. Paludisme urbain et rural au Niger, le cas du département de Maradi. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 79: 695-706.
197. Lemasson J.J., Fontenille D., Lochouarn L., Dia I., Simard F., Ba K., Diop A., Diatta M., Molez J.F. 1997. Comparison of behaviour and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J. Med. Entomol.*, 34(4): 396-403.
198. Lengeler C, 2004. Insecticide-treated bed net and curtains for preventing malaria, in *Cochrane Database Systematics Reviews*, CD000363
199. Lengeler C., Grabowsky M., McGuire D., de Savigny D., 2007. Quick Wins Versus Sustainability: Options for the Upscaling of Insecticide-Treated Nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6): 222-226.
200. Lines J., 1996. Mosquito nets and insecticides for nets treatment: a discussion of existing and potential distribution systems in Africa. *Trop Med Int Health*, 1: 616-632.
201. Lins R.M.M.A., Oliveira S.G., Souza N.A., de Queiroz R.G., Justiniano S.C.B., Ward R.D., Kyriacou C.P., Peixoto A.A., 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Molecular Biology*, 11(2): 117-122.
202. Livadas G., Georgiopoulos G., 1953. Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. *Bull. World Health Org.*, 8: 497-511.
203. Livadas G., Muchet J., Gariou J., Chasyang R., 1958. Peut-on envisager l'éradication du paludisme dans la région forestière du sud-Cameroun. *Rivist. Malariol.*, 37: 229-256.
204. Lochouarn L., Dia I., Boccolini D., Coluzzi M., Fontenille D., 1998. Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92: 607-612.

205. Longnecker M.P., Klebanoff M.A., Zhou H., Brock J.W., 2001. Association between maternal serum concentration of the DDT metabolic DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth. *Lancet*, 358: 110-104.
206. Lynd A., Ranson H., McCall P.J., Randle N.P., Black W.C., Walker E.D., Donnelly M.J., 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria J.*, 14; 4(1): 16.
207. Mabaso M.L.H., Sharp B., Lengeler C., 2004. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop. Med. Int. Health*, 9(8): 846-856.
208. Macdonald G., Göckel G.W., 1964. The malaria parasite rate and interruption of transmission. *Bull. Org. Mond. Santé*, 31: 365-377.
209. MacKay R., 1935. Report on work done at Dar es Salaam during 1932-1934. London: Government Printer.
210. Manga L., Toto J.C., Le Goff G., Brhunes J., 1997. The bionomics of *Anopheles funestus* and its role in malaria transmission in a forest area of southern Cameroon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91: 387-388.
211. Marrama L., Jambou R., Rakotoarivony I., Leong Pock Tsi J.M., Duchemin J.B., Laventure S., Mouchet J., Roux J., 2004. Malaria transmission in Southern Madagascar: influence of the environment and hydro-agricultural works in sub-arid and humid regions. Part 1. Entomological investigations. *Acta Tropica*, 89:193-203.
212. Marreli M.T., Li C., Rasgon J.L., Jacobs-Lorena M., 2007. Transgenic malaria resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on plasmodium-infected blood. *Proc Natl Acad Sci USA* [Epub ahead of print].
213. Martinez-Torres 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(2): 179-84.
214. Mathenge E.M., Misiani G.O., Oulo D.O., Irungu L.W., Ndegwa P.N., Smith T.A., Killeen G.F., Knols B.G.J., 2004a. Comparative performance of the Mbita trap, CDC light trap and the human landing catch in the sampling of *Anopheles arabiensis*, *An. funestus* and *culicine* species in a rice irrigation in western Kenya. *Malaria Journal*, 4:7 doi:10.1186/1475-2875-4-7
215. Mathenge E.M., Omweri G.O., Irungu L.W., Ndegwa P.N., Walczak E., Smith T.A., Killeen G.F., Knols B.G.J., 2004b. Comparative field evaluation of the Mbita trap, CDC light trap and the human landing catch for sampling of malaria vectors in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70: 33-37
216. Matthys B., N'Goran E.K., Koné M., Koudou B.G., Vounatsou P., Cissé G., Tschannen A.B., Tanner M., Utzinger J., 2006. Urban agricultural land use and characterization of mosquito larval habitats in a medium-sized town of Côte d'Ivoire. *J Vect Ecol*, 31 (2): 319-333
217. Metzger W.G., Maxwell C.A., Curtis C.F., 1998. Anti-sporozoite immunity and impregnated bednets in Tanzanian villages. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 92: 727-729.
218. Miller L.H., Mason S.J., Cyde D.F., McGinniss M.H., 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N. E. J.M.*, 295: 302-304.
219. Moreira L.A., Wang J., Collins F.H., Jacobs-Lorena M., 2004. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics* 166: 1337-1341.

220. Mouchet J., 1962. Influence des fleuves sur la biologie d'*An. gambiae* pendant la saison sèche dans le Sud Cameroun. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 3: 1163-1171.
221. Mouchet J., 1976. Les problèmes épidémiologiques posés par les maladies à vecteurs dans les zones de forêt dense africaine : influence des changements d'environnements. *Wiadomosci parazytologiczne*, 22 : 557-567.
222. Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Fontenille D., Ravaonjanahary C., Richard A., Robert V., 1997. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers Santé*, 3: 220-238.
223. Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J., 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. (Eds) John Libbey Eutotext, 428pp.
224. Mouchet J., Faye O., Julvez J., Manguin S., 1996. Drought and malaria retreat in the Sahel, West Africa. *Lancet* 21-28; 348(9043): 1735-6.
225. Mouchet J., Hamon J., 1963. Les problèmes techniques de l'éradication du paludisme en Afrique. *Cah. Orstom, Ser. Ent. Med.*, 33: 39-48.
226. Muller P., 1955. Des insektizid dichlorodiphenyltrichloroethan und seine bedeutung. Basel: Birkhäuser.
227. Mutéro A., Pralavorio M., Bride J.M., Fournier D., 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 5922-5926.
228. Mutero C.M., Ng'ang'a P.N., Wekoyela P., Githure J., Konradsen F., 2004. Ammonium sulphate fertiliser increases larval populations of *Anopheles arabiensis* and culicine mosquitoes in rice fields. *Acta Tropica*, 89: 187-192.
229. 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. *Emerging Infectious Diseases*, (13) 2 www.cdc.gov/eid.
230. N'Guessan R., Darriet F., Guillet P., Carnevale P., Lamizana-Traore M., Corbel V., Koffi A., Chandre F., 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med. Vet. Entomol.*, 17: 1-7.
231. N'Guessan R., Rowland M., Traoré-Lamizana M., Kesse B., Carnevale P., 2006. Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100: 1091-1097.
232. Nchinda T.C., 1998. Malaria: A re-emerging disease in Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 4:398-403.
233. Nevill CG, Some ES, Mungala VO, Mutemi W, New L, Marsh K, Lengeler C, Snow RW, 1996. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Tropical Medicine & International Health* 1(2) : 139-146.
234. N'Guessan R., Knols B.G., Penetier C., Rowland M., 2008. DEET microencapsulation: a slow-release formulation enhancing the residual efficacy of bed nets against malaria vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 102(3): 259-62.
235. Oliveira S.G., Bottecchia M., Bauzer L.G.S.R., Souza N.A., Ward R.D., Kyriacou C.P., Peixoto A.A., 2001. Courtship song genes and speciation in sandflies. *Mem Instituto Oswaldo Cruz* 96, 403-405.
236. OMS, 1957. comité d'experts du paludisme, 6^e édition. Genève : OMS-Série Rapport technique n°123.
237. OMS, 1992. Résistance des vecteurs aux pesticides. Genève : OMS, 1992 Série Rapport technique n°123.

238. Oomen J.M.V., de Wolf J., Jobin W.R., 1994. Health and irrigation. Incorporation of Diseases-Control Measures in irrigation, a Multi-faceted task in design, construction, operation. International Institute for land reclamation and improvement (ILRI), Wageningen, the Netherlands.
239. Oppenoorth F.J., 1985. Biochemistry and physiology of resistance *In*: Kerkut G.A., Gilbert L.I. (eds), *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology Oxford-Pergamon*, 12: 731-773.
240. Park Ross G.A., 1936. Insecticide as a major measure in control of malaria. *Quart Bull. Inf. Health Org. League of Nations*, 5: 813-822.
241. Pennetier C., Corbel V., Boko P., Odjo A., N'Guessan R., Lapied B., Hougard J.M., 2007. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malaria J.* 29, 6-38.
242. Pennetier C., Corbel V., Hougard J.M., 2005. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72: 739-744.
243. Persiani A., Di Deco M.A., Petrangeli G., 1986. Osservazioni di laboratorio su polimorfismi da inversioni da incroci tra popolazioni diversi di *Anopheles gambiae* s.s. *Ann Ist Super Sanita.*, 22(1): 221-223.
244. Petrarca V., Verduyck J., Coluzzi M., 1987. Observations on the species of the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal River Basin. *Med. Vet. Entomol.*, 1: 303-312.
245. Pinto J., Lynd A., Elissa N., Donnelly M.J., Costa C., Gentile G., Caccone A., Do Rosario V.E., 2006. Co-occurrence of East and West African *kdr* mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Med. Vet. Entomol.*, 20: 27-32
246. Pinto J., Lynd A., Vicente J.L., Santolamazza F., Randle N.P., Gentile G., Morenos M., Simard F., Charlwoods J.D., Rosario V.E., Caccone A., della Torre A., Donnelly M.J., 2008. Multiple origins of knockdown resistance Mutations in the Afrotropical mosquito vector *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* 2 (11): e1243. doi:10.1371/journal.pone.0001243.
247. Pock Tsy J-M.L., Duchemin J-B., Marrama L., Rabarison P., Le Goff G., Rajaonarivelo V., Robert V., 2003. Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria Journal*, 2: 33 (<http://www.biomedcentral.com/1475-2875/2/33>).
248. Poinot D., Charlat S., Merçot H., 2003. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models to the facts. *Bioessays*, 25: 259-265.
249. Prapanthadara L., Hemingway J., Kereman A.J., 1995. DDT-resistance in *An. gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania based on DDT dehydrochlorinase activity of glutathione-S-transferases. *Bull. Entomol. Res.*, 85: 267-274.
250. Quesneville H., Nouaud D., Anoxlabéhère D., 2003. Detection of new transposable elements families in *Drosophila melanogaster* and *An. gambiae* genomes. *J. Mol. Evol.*, 57: 1-10.
251. Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J., Collins F.H., 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenya *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.*, 95: 491-497.
252. Reimer LJ, Tripet F, Slotman M, Spielman A, Fondjo E, 2005. An unusual distribution of the *kdr* gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Mol Biol.*, 14 (6): 683-688.

253. Robert V., 1989. La transmission du paludisme humain: la zone des savane d'Afrique de l'Ouest. Thèse Université Paris 6, 325p.
254. Robert V., Awono-Ambene H.P., Thioulouse J., 1998. Ecology of larval mosquito, with special reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in market-garden wells in the urban area of Dakar, Senegal. *J. Med. Entomol.*, 35: 948-955.
255. Robert V., Carnevale P., 1991. Influence of deltamethrin treatment of the bed nets on malaria transmission in the Kou valley, Burkina Faso. *Bull WHO*, 69: 735-740.
256. Robert V., Carnevale P., Ouédraogo V., Petrarca V., Coluzzi M., 1985. La transmission du paludisme humain dans un village de savane du Sud-Ouest du Burkina Faso. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 68: 107-121.
257. Robert V., Gazin P., Boudin C., Molez J-F., Ouédraogo V., Carnevale P., 1985. La transmission du paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo-Dioulasso. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 65 (2): 201-214.
258. Robert V., Gazin P., Ouédraogo V., Carnevale P., 1986. Le paludisme urbain à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Cah. ORSTOM Sér. Ent. Med. Parasitol.*, Vol XXIV (2): 121-128.
259. Robert V., Macintyre K., Keating J., Trape J-F., Duchemin J.B., Warren M., Beier J.C., 2003. Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 68: 169-176.
260. Robert V., Ouari B., Ouédraogo V., Carnevale P., 1988a. Etude écologique des culicidés adultes et larvaires dans une rizière en vallée du Kou, Burkina Faso. *Acta Tropica*, 45: 351-359.
261. Robert V., Petrarca V., Carnevale P., Ovazza L., Coluzzi M., 1989. Analyse cytogénétique du complexe *An. gambiae* dans la région de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 64: 290-311.
262. Robert V., Petrarca V., Coluzzi M., Boudin C., Carnevale P., 1991. Etude des taux de parturité et d'infection du complexe *An. gambiae* dans la rizière de la Vallée du Kou, Burkina Faso. Le Paludisme en Afrique de l'Ouest. Paris : ORSTOM : 17-35.
263. Robert V., Verhave J.P., Ponnudurai T., Louwé L., Scholtens P., Carnevale P., 1988b. Study of the distribution of circumsporozoite antigen in *Anopheles gambiae* infected with *Plasmodium falciparum*, using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 389-391.
264. Rogan W., Chen A., 2005. Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet*, 366: 763-73.
265. Ronsseray S., Josse T., Boivin A., Anxolabéhère D., 2003. Telomeric transgenes and Trans-silencing in *Drosophila*. *Genetica*, 117: 327-335.
266. Ross R., 1906. Malaria in Greece. *J. Trop. Med.*, 9: 341-347.
267. Rossi P., Belli A., Mancini L., Sabatinelli G., 1986. Enquête entomologique longitudinale sur la transmission du paludisme à Ouagadougou, Burkina Faso. *Parassitologia*, 28: 1-15.
268. Rugemalila J.B., Wanga C.L., Kilama W.L., 2006. Sixth Africa malaria day in 2006: how far have we come after the Abuja Declaration? *Malaria J*, 5:102 doi:10.1186/1475-2875.
269. Sabatinelli G., Bianchi S., Majori G., Papakay M., 1991. Utilisation du poisson larvifère *Poecilia reticulata* sur la transmission du paludisme en RFI des Comores. *Ann. Parasitol. Hum. Coomp.*, 66: 84-88
270. Sabatinelli G., Rossi P., Belli A., 1986. Etude sur la dispersion d'*An. gambiae* dans une zone urbaine à Ouagadougou, Burkina faso. *Parassitologia*, 30 : 178-179.
271. Sachs J., Malaney P., 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature*, 41: 680-685.

272. Sagnon, N'F., Costantini C., della Torre A., Coluzzi M., 2000. Random distribution of larval populations of sympatric members of the *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso. SOIPA XXI (abstr.) *Parassitologia* 42: 157.
273. Schilcher F.V., 1977. A mutant which changes courtship song in *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genet.* 7, 251-259.
274. Scholte E-J., Ng'habi K., Kihonda J., Takken W., Paaijmans K., Abdulla S., Killeen G.F., Knols B.G., 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 3008: 1641-1642.
275. Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H., 1993. Identification of single specimens of *An. gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49: 520-529.
276. Sharakhov I.V., Sharakhova M.V., Mbogo C.M., Koekemoer L.L., Yan G., 2001. Linear and spatial organisation of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics*, 159: 211-218.
277. Sharp B.L., Ridl FC., Govender D., Kullinski J., Kleinschmidt I., 2007. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, 6:52 doi:10.1186/1475-2875-6-52.
278. Sinègre G., Babinot M., Vigo G., Gaven G., Julien J.L., 1993. *Bacillus sphaericus* et démoustication urbaine. Bilan de cinq années d'utilisation expérimental de la spécialité Sphérimos dans le sud de la France. Doc. EILDm n°62, 21p.
279. Sissoko M.S., Dicko A., Briët O.J.T., Sissoko M., Sagara I., Keita H.D., Sogoba M., Rogier C., Touré Y.T., Doumbo O.K., 2004. Malaria incidence in relation to rice cultivation in the irrigated Sahel of Mali. *Acta Tropica*, 89: 161-170.
280. Smith S.C., Joshi U.B., Grabowsky M., Selanikio J., Nobiya T., Aapore T., 2007. Evaluation of Bednets After 38 Months of Household Use in Northwest Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(Suppl 6): 243-248.
281. Smith T., 1995. Proportionality between light trap catches and biting densities of malaria vectors. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 11: 377-378.
282. Snow R.W., 2000. The burden of malaria: understanding the balance between immunity, public health and control. *J. Med. Microbiol.*, 49: 1053-1055.
283. Snow R.W., Jawara M., Curtis C.F., 1987. Observations on *Anopheles gambiae* s.l. during trial of permethrin treated bed nets in the Gambia. *Bull. Entomol. Res.*, 77: 279-286.
284. Snow R.W., Marsk K., 1995. Will reducing malaria transmission alter malaria mortality among Africa children? *Parasitol. Today*, 11: 188-190.
285. Snow R.W., Rowan K.M., Lindsay S.W., Greenwood B.M., 1988. A trial of bednets (mosquito nets) as a malaria control strategy in a rural area of The Gambia, West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 212-215.
286. Snow W.F., 1983. Mosquito production and species succession from an area of irrigated rice fields in The Gambia, West Africa. *J. Trop. Med. Hyg.*, 86: 237-245.
287. Soderlund D.M., Bloomquist J.R., 1990. Molecular mechanism of insecticide resistance. In: Tabashnik B.E. and Roush R.T. (eds) *Pesticides Resistance in Arthropods*. New York: Chapman and Hall: pp 58-96.
288. Sogoba N., Vounatsou P., Doumbia S., Bagayoko M., Touré M.B., Sissoko I., Traoré S.F., Touré T.Y., Smith T., 2007. Spatial analysis of malaria transmission parameters in the rice cultivation area of office du Niger, Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(6): 1009-1015.
289. Sperança M.A., Capuno M.A., 2007. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era- A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 4: 425-433.

290. Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky N.J., 2004. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *Am J Trop Med Hyg.*, 70(6): 591-6.
291. Sullivan R.T., 1981. Insect swarming and mating. *Florida Entomologist* 64, 44-65.
292. Swallengrebel NH., Anneke S., de Meillon B., Malaria investigation in Transvaal and Zululand. *Publ. S. Afr. Inst Med. Res.*, XXVIII: 245-276.
293. Tinto H., Sanou B., Duchemin J-C, Ouédraogo J-B, Van Overmeir C., Erhart A., Van Marck E., Guiguemdé T.R, d'Alexandro U., 2005. Usefulness of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of *in vivo* chloroquine resistance in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73 (1): 171-173.
294. Touré Y.T., 1982. Etude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. *Cahiers ORSTOM, sér. Entomol. Méd. Parasitol.*, 20 (2): 125-131.
295. Touré Y.T., 1984. Sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides dans la zone du barrage de Sélingué. *Parassitologia*, 26: 311-318.
296. Touré Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maïga H.M., Sankaré O., Sow M., Di Deco, Coluzzi M., 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali West Africa. *Parassitologia*, 40: 477-511.
297. Touré Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maïga H.M., Sankaré O., Sow M., Di Deco, Coluzzi M., 1994. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae s. str.* in Mali, West Africa. *Genetica* 94: 213-223.
298. Trape J.F., Rogier C., 1996. Combatting malaria mortality and morbidity by reducing transmission. *Parasitol Today*, 12: 236-240.
299. Trape J-F., 1986. L'impact de l'urbanisation sur le paludisme en Afrique centrale. Thèse Université de Paris Sud, 409p.
300. Trape J.F., Lefebvre-Zante E., Legros F., Ndiaye G., Bouganali H., Druilhe P., Salem G., 1992. Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47(2): 181-189.
301. Trape J-F., Zoulani A., 1987. Malaria and urbanization in central Africa: the example of Brazzaville. Part II: Results of entomological surveys and epidemiological analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 10-18.
302. Tripet F., Guimogo D., Traoré S., Lanzaro G.C., 2004. The wing beat hypothesis of reproductive isolation between members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) does not fly. *J. Med. Entomol.*, 41: 375-384.
303. Tripet F., Thiemann T., Lanzaro G.C., 2005. Effect of seminal fluids in mating between M and S forms of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.*, 42 (4): 596-603.
304. Tripet F., Touré Y.T., Guimogo D., Lanzaro G.C., 2003. Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* revealed by DNA analysis of transferred sperm. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 1-5.
305. Tripet F., Touré Y.T., Taylor C.E., Norris D.E., Dolo G., Lanzaro G.C., 2001. DNA analysis transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, 10: 1725-1732.
306. Tripet F., Wright J., Cornel A., Fofana A., Mcabee R., Meneses C., Reimer L., Slotman M., Thiemann T., Dolo G., Traore S., Lanzaro G., 2007. Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and resistance evidence of its emergence in the Bamako form *Anopheles gambiae ss.* *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76: 81- 87.

307. Tripet F., Wright J., Lanzaro G., 2006. A new high-performance PCR diagnostic for the detection of pyrethroid knockdown resistance *kdr* in *Anopheles gambiae*. *Am J Trop Med Hyg.*, 74(4): 658-62.
308. Van Bortel W., Barutwanonyo M., Delacoelette C., Coosemans M., 1996. Motivation to acquire and use impregnated mosquito in a stable malaria zone in Burundi. *Trop Med. Int. Health*, 1: 71-80.
309. Vercruysse J., 1985. Etude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans le bassin du fleuve Sénégal. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 65(2): 171-179.
310. Vercruysse J., Jancloes M., Van den Velden L., 1983. Epidemiology of seasonal malaria in an urban area of Senegal. *Bull. World Health Org.*, 61: 821-832.
311. Verhaeghen K., Van Bortel W., Roelants P., Backeljau T., Coosemans M., 2006. Detection of the East and West African *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. *Malaria Journal*, 5:16.
312. Vulule J.M., Beach R.F., Atieli F.K., McAllister J.C., Brogdon W.G., Roberts J.M., Mwangi R.W., Hawley W.A., 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenya villages using permethrin-impregnated nest. *Med. Vet. Entomol.*, 13(3): 239-244.
313. Walter J. R., Aimin C., 2005. Health risks and benefits of bis (4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet*, 366: 763-773.
314. Weill M., Chandre F., Brengues C., Manguin S., Akogbeto M, Pasteur N., Guillet P., Raymond M., 2000. The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* ss through introgression. *Insect Mol. Biol.*, 99: 451-455.
315. Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., Raymond M., 2003. Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423 (6936): 136-137.
316. Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M., 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.*, 13: 1-7.
317. White G.B., 1974. Biological effects of intraspecific chromosomal polymorphism in malaria vector populations. *Bull. World Health Org.*, 50: 299-306.
318. White G.B., 1985. *Anopheles bwambae* n. sp, a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex. *Syst. Entomol.*, 10: 501-522.
319. WHO, 1995. Vector control for malaria and other vectors-born diseases. *Technical Report Series*, 857: 91p.
320. WHO, 2002. Scaling-up Insecticide-Treated Netting program in Africa. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2002, Publication, WHO/CDS/RBM, 2002, 43p.
321. WHO/Roll Back Malaria, World Health Organization, and United Nations Children Fund: The Africa malaria report 2003. Geneva: WHO, 2003.
322. Wilkes, T.J., Matola, Y.G., Charlwood, J.D., 1996. *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med. Vet. Entomol.*, 10: 108-110.
323. Wilson D.B., 1936. Report on Malaria Unit Tanga, 1933-1934. Nairobi, Kenya: the Government Printer.
324. Wirtz R.A., Zavala F., Charoenvit Y., Campbell G.H., Burkot T.R., Schneider I., Esser K.M., Beaudoin R.L., Andre G., 1987. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for Elisa development. *Bull WHO* 65: 39-45.

325. Wiseman R.H., Symes C.B., McMahon J.B., Teesdale C., 1939. Report on a malaria survey of Mombassa, Nairobi, Kenya: The Government Printer.
326. Wondji C., Simard F., Fontenille D., 2002. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol. Biol.*, 11: 11-19.
327. Worrall E., Hill J., Webster J., Mortimer J., 2005. Experience of targeting subsidies on insecticide-treated nets: what do we know and what are the knowledge gaps? *Trop Med Int Health*, 10 (1): 19-31.
328. Yamamoto D., Jallon J.M., Komatsu A., 1997. Genetic dissection of sexual behavior in *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 551-558.
329. Yawson A.E., McCall P.J., Wilson M.D., Donnelly M.J., 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med Vet Entomol*, 18: 372-377.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Protocoles détaillés des PCR utilisées

PCR diagnostique *An. gambiae* s.l.

LIN2003

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

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

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

Amorces

UN GTGTGCCGCTTCCTCGATGT
 AG CTGGTTTGGTCGGCAGGTTT
 AA AAGTGTCTTCTCCATCCTA
 AM GTGACCAACCCACTCCCTTGA

Conditions PCR

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

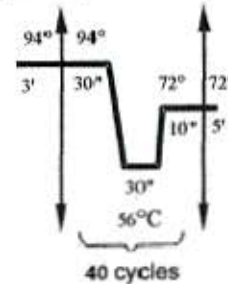
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05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

Amplification :

3' [30", 30", 10"]_{40x} 5' @ 56°C

Taille attendue

- 2- *An. gambiae* : 390 bp,
- 3- *An. arabiensis* : 315 bp
- 4- *An. melas* : 464 bp



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

LIN 2003

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

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

Amorces

R3 : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R5 : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B/S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

Conditions PCR

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

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

Amplification :

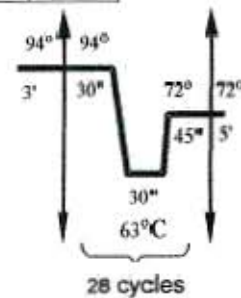
3' [30", 30", 45"]₂₈ 5' @ 63°C

Taille attendue

R3/R5 : ~1300 bp

M : 727 bp

S : ~475 bp



Mutation Kdr

LIN, 2003

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

Kdr : phénotype « Knockdown resistance »

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

Amorces

D1 ATAGATTCCCCGACCATG
 D2 AGACAAGGATGATGAACC
 D3 AATTTGCATTACTTACGACA
 D4 CTGTAGTGATAGGAAATTTA

Conditions PCR

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

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

Amplification :

Taille attendue

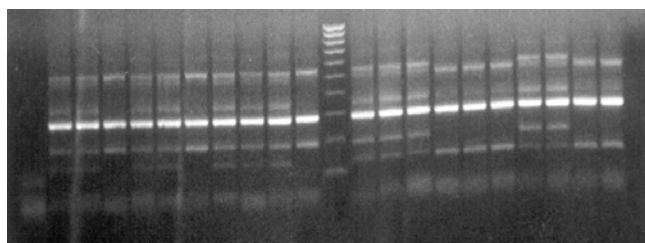
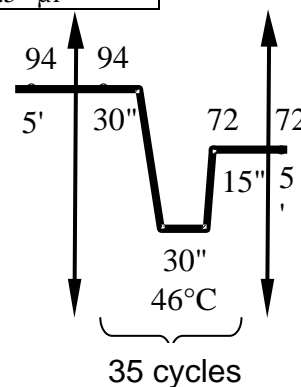
D1/D2 : 293 bp

D1/D3 : 195 bp

D2/D4 : 137 bp

Résistant

Sensible



Mutation Ace 1 chez Anopheles

Isa et Alphonsine, juin 2003

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

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

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

Amorces
Ex3AGdir GATCGTGGACACCGTGTTCG
Ex3AGrev AGGATGGCCCGCTGGAACAG

Conditions PCR

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

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer Ex3AGdir (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Primer Ex3AGrev (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.06 µl
ddH ₂ O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.6 µl

Amplification :

3' [30", 30", 30"]₃₅ 5' @ 62°C

Taille attendue

Ex3AG : 541 bp

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

Digestion enzymatique

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

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

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

Tailles attendues

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



ANNEXE 2 : Protocoles détaillés des ELISA –CSP et ELISA Repas de sang

ELISA - CSP

(Circumsporozoite protein de Plasmodium)

LIN, janv 2003

D'après Wirtz, Burkot et al. technique Fontenille LIN Mpl 2002

- 01 - SI NECESSAIRE PREPARER LES TAMPONS PBS - BB - TWEEN 20 - NP 40 +BB.
- 02 - PREPARER LES MOUSTIQUES (Tête - Thorax dans tube numéroté)
* Ajouter 20 µl de NP 40/BB Laisser au moins **1 H** (ou la nuit au réfrigérateur)
- 03 - PREPARER LE PLAN DE LA PLAQUE SUR LA FEUILLE (N° des moustiques, date, ...)
- 04 - **BROYER** LES MOUSTIQUES : 2 fois 190 µl de BB (conservation des tubes à -20°C)
- 05 - SI NECESSAIRE RECONSTITUER LES ACm de capture (cf. fiche), garder à -20°C
- 06 - SENSIBILISER LES PLAQUES ELISA
 - a) Préparer les solution d'ACm de capture aux dilutions voulue : il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande
 - b) - vortexer

	CAPTURE Pour 1 plaque		Pour 3 plaques
<i>p. falciparum</i> :	15 µl/5 ml PBS	f :	45 µl/15 ml PBS
<i>p. vivax 210</i> :	5 µl/5 ml PBS	v 210 :	15 µl/15 ml PBS
<i>p. vivax 247</i> :	10 µl/5 ml PBS	v 247 :	30 µl/15 ml PBS
<i>p. malariae</i>	60 µl/5 ml PBS	m :	180 µl/15 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml PBS	o :	45 µl/15 ml PBS

b) Mettre 50 µl/puits (à pipette 8 canaux, pte jaune) de chaque ACm de capture

* SCREEN : mélange des plasmodiums a tester (n x 50 µl)
* monospécifique : uniquement du plasmodium étudié (1 x 50 µl)
Laisser la nuit sur la pailleasse (ou le W.E. à 4°C).

- 07 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER
- 08 - METTRE 200 µl de BB par puits (screen ou monospécifique)
pendant **1 H** sur pailleasse.
Pendant ce temps faire décongeler les moustiques à tester (Tête Thorax dans BB)
- 09 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER
- 10 - METTRE 50 µl du broyat de moustique par puits. Bien vérifier qu'on met dans le bon puit.
Laisser pendant **2 H** sur pailleasse.
- 11 - Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les ACm CONJUGUES,
si nécessaire reconstituer le lyophilisat (cf. fiche)
- 12 - VIDER LA PLAQUE. LAVER 2 FOIS AU PBS/TWEEN 20
- 13 - METTRE 50 µl/puits de l'ACm CONJUGUE, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 µl)
LAISSER 1 H sur pailleasse

ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**, : il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande

Pour 3 plaques

CONJUGUES Pour 1 plaque

<i>p. falciparum</i> :	7,5 µl/5 ml BB	f :	22,5 µl/15 ml BB
<i>p. vivax 210</i> :	10 µl/5 ml BB	v 210	30 µl/15 ml BB
<i>p. vivax 247</i> :	2 µl/5 ml BB	v 247 :	6 µl/15 ml BB
<i>p. malariae</i>	15 µl/5 ml PBS	m :	45 µl/15 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml BB	o :	45 µl/15 ml BB

14 - Environ 5 minutes avant la fin de l'heure, préparer le **SUBSTRAT de la peroxydase** (selon Lhuillier, Sarthou *et al*) :

Pour 3 plaques :

* 5 mg d'**Ortho-tolidine** dans 0,25 ml de **N,N-diméthyl formamide**

* 30 ml de **Tampon citrate**

* 12 µl de **H2O2** à 10% (ou 4 µl à 30% , ou 6 µl à 20%).

15 - **VIDER LA PLAQUE. LAYER 4 FOIS AU PBS/TWEEN 20**

16 - **METTRE 100 µl/puits de SUBSTRAT**

17 - **INCUBER 30 minutes A OBSCURITE SANS TOUCHER** (coloration bleue 620 nm)

18 - Blocage par 50 µl d'**acide sulfurique 4N** : Coloration jaune :

19-**Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa**

ELISA REPAS DE SANG

LIN, janv 2003

Technique Fontenille D., d'après Beier JC *et al.* (et Sarthou pour la coloration)
Fev 2002, LIN

- 01 - Préparer le **Tampon "Repas de sang"** (à garder à + 4°C, 1 à 2 semaines)

Pour **1/2 litre** : - 2,5 g de caséine dans 50 ml de NaOH 0,1N;
faire bouillir jusqu'à totale dissolution
- ajouter 450 ml de PBS
- ajouter 0,025 % Tween 20 (soit 125 µl/1/2 l)
- ajouter 0,05 g Thiomerosal
- ajouter 0,01 g Phenol rouge

Agiter 2 h

- préparer le **Tampon Citrate pH4** :

Pour **1 litre** :

Acide citrique, 1 H ₂ O	11,77 g
Hydroxyde de Sodium	4,48 g

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution.

Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide Chlorhydrique 1N. Compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée.

- 02 - Avec **SPOTS** (Confetti sur papier filtre) I Avec **ABDOMENS COUPES**
* Découper le spot, le mettre I * Broyer dans 250 µl de PBS
env. dans 0,8 ml de PBS I
(selon la qualité probable de sang) I * ajouter environ 750 µl de PBS
* Vortexer 1 ou 2 fois I
* Laisser au moins 1 h I

- 03 - Préparer les **témoins positifs** : sang dilué au 1/100 en moyenne
10 µl de sérum d'espèce dans 1 ml de PBS (homme (1/100), poulet (1/200), bœuf (1/100),
mouton (1/30), chèvre (1/30), porc (1/100), cheval (1/100), chien (1/100), rat,)

- 04 - **Sensibiliser les plaques**
Mettre 50 µl de solution de sang à tester par puits (un moustique par colonne)

- 05 - **Incubation 3 h** à la température de la pièce ou la nuit à + 4°C

- 06 - **Préparer les anticorps** spécifiques d'espèces **marqués** à la peroxydase :
reconstituer les IgG marquées selon la notice. Garder au congélateur.

Pour **une plaque** il faut :

50 µl X 12 = 600 µl (+50 µl) = **650 µl** de solution de chaque IgG marquées

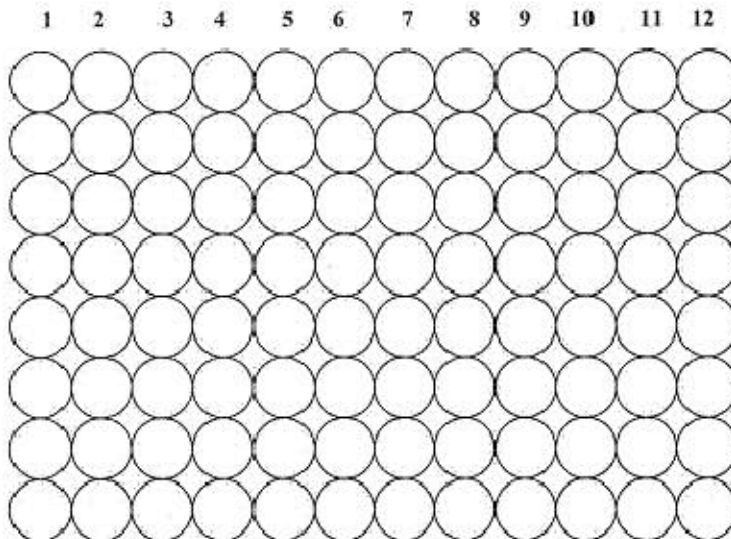
Dilutions à faire (dilution à vérifier par un damier, fonction de la marque) :

Homme:	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon pour TROIS plaques
Bœuf:	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Poulet:	1/2000	1 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Mouton:	1/500	4 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Cheval:	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Porc:	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Chien:	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Rat:	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon

- 07 - Ajouter dans chaque tube d'IgG marquées les **sérums hétérologues** au 1/1000^{ème}. Exemple: Tube anti homme : aux AC marqués anti-homme dans 4 ml tampon -> ajouter 4µl de sérum de bœuf + 4µl de sérum de poule + 4µl de sérum de mouton + 4µl de sérum de cheval + 4µl de sérum de porc + 4µl de sérum de chèvre + 4µl de sérum de chien etc.. (tous les autres sérum sauf Homme)

SAUF pour Mouton et Chèvre : ne PAS mettre de sérum de mouton avec AC marqués anti-chèvre
ne PAS mettre de sérum de chèvre avec AC marqués anti-mouton

- 08 - Laver 2 fois au PBS-Tween
- 09 - Distribuer 50 µl par puits de solution d'IgG marquées. Mettre une IgG par rangée
- 10 - Incubation 1 h à RT sur la paillasse
- 11 VIDER LA PLAQUE. LAVER 4 FOIS AU PBS/TWEEN 20
- 12 - 10 minutes avant la fin de l'incubation préparer le substrat de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou *et al*):
Pour 3 plaques :
* 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
* 30 ml de Tampon citrate
* 12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30%).
- 13 - Distribuer 100µl de substrat par cupule
- 14 - Incubation à l'obscurité, pendant 30 minutes (coloration bleue 620 nm)
- 15 - Blocage par 50 µl d'acide sulfurique 4N : Coloration jaune
- 16 Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa



Anticorps marqués à la peroxydase, pour commande chez Sigma

Anticorps	Référence Sigma	Page catalogue 2003	Quantité	Prix 2003
Anti-Bovine	A5295	302	1 ml	106,87 €
Anti-Human	A8794	1049	1 ml	155,00 €
Anti-Pig	A5670	1650	1 ml	99,70 €
Anti-Chicken	A9046	463	1 ml	114,18 €
Anti-Goat	A5420	965	1 ml	104,88 €
Anti-Sheep	A3415	1852	1 ml	99,24 €
Anti-Dog	A6792	714	1 ml	99,50 €
Anti-Rat	A9037	1787	1 ml	91,23 €

SELECTION D'ARTICLES

Article 1

Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccoloni D., Duchemin J-B., Rajaonarivelo V., **Dabiré K. R.**, Adja-Akré M., Ceainu C., Le Goff G., Simard F. (2003). Systématique et biologie des Anophèles vecteurs de *Plasmodium* en Afrique, données récentes. *Rev. Med. Trop.*, 63: 247-253

SYSTEMATIQUE ET BIOLOGIE DES ANOPHELES VECTEURS DE PLASMODIUM EN AFRIQUE, DONNEES RECENTES

D. FONTENILLE, A. COHUET, P.H. AWONO-AMBENE, C. ANTONIO-NKONDJIO, C. WONDJI, P. KENGNE, I. DIA, D. BOCCOLINI, J-B. DUCHEMIN, V. RAJAONARIVELO, R. DABIRE, M. ADJA-AKRE, C. CEAINU, G. LE GOFF, F. SIMARD

Med Trop 2003 ; 63 : 247-253

RESUME • Un renouveau des recherches sur les vecteurs de *Plasmodium* en Afrique et le développement des techniques de génétique et biologie moléculaire, en particulier sous l'impulsion de l'OMS et du programme PAL du Ministère français de la recherche, a permis de mieux connaître la biologie et la systématique des principaux groupes de vecteurs. Cet article fait le point sur le complexe *Anopheles gambiae* et les formes M et S d'*An. gambiae* s.s., sur les espèces du groupe *An. funestus* et le polymorphisme génétique d'*An. funestus*, sur les quatre espèces du groupe *An. nili*, sur les deux espèces probables du complexe *An. moucheti* et sur *An. mascarensis*.

MOTS-CLES • Anophèles - Paludisme - Afrique - Spéciation.

SYSTEMATICS AND BIOLOGY OF ANOPHELES MOSQUITO VECTOR OF PLASMODIUM IN AFRICA: NEW DATA

ABSTRACT • Renewed interest in research on *Plasmodium* vectors in Africa and development of genetic and molecular biology techniques has been spearheaded by the WHO and the PAL+ program of the French research ministry. New findings have led to a better understanding of the systematics and biology of the main vector groups. The purpose of this article is to describe the newest data on the *Anopheles gambiae* complex and the M and S forms of *An. gambiae* s.s., on species in the *An. funestus* group and genetic polymorphism of *An. funestus*, on the two probable species in the *An. moucheti* complex, and on *An. mascarensis*.

KEY WORDS • Anopheles – Malaria – Africa – Speciation.

La transmission des *Plasmodium* et la biologie des principaux vecteurs en Afrique sont connues dans leurs grandes lignes depuis plus de 50 ans (1). La description puis l'identification des espèces vectrices se faisait alors sur des critères morphologiques, et des sous-divisions intitulées sous-espèces, formes, races, variétés, etc. étaient signalées sur la base de critères géographiques, comportementaux, de niveau de transmission palustre ou de petites différences morphologiques à un stade de développement donné de l'anophèle.

Dès le début du XX^e siècle, deux formes d'*Anopheles gambiae* Giles, 1902, étaient reconnues, une se développant en eau douce, l'autre en eau saumâtre. Plus tard, l'étude des croisements entre populations d'eau salée et d'eau douce (2), et l'étude de l'héritabilité de la résistance à la dieldrine par des croisements entre populations sensibles et résistantes à cet insecticide (3), ont permis de démontrer que *An. gambiae* était un ensemble d'espèces (d'abord nommées *An. gambiae* A, *An. gambiae* B, *An. melas*, *An. merus*), différentes génétiquement mais identiques morphologiquement. C'est ce qu'on appelle un complexe d'espèces. Puis, *An. gambiae* A lui-même (*An. gambiae* s.s.) s'est avéré être un regroupement de formes chromosomiques, les cytotypes, jusqu'à ce que récemment on découvre que ces cytotypes se regroupaient en au moins deux formes, M et S, dites moléculaires, pouvant être considérées comme deux vraies espèces (4) Les études se focalisent maintenant sur l'étude du génome d'*An. gambiae*.

« Jusqu'où iront-ils ? » entend t'-on parfois. Est-il nécessaire d'approfondir autant pour lutter contre le paludisme ? N'est ce pas un simple hobby d'entomologiste ?

S'il est vrai que les entomologistes ont la description facile, c'est que la « Nature » elle-même s'en est donnée à cœur joie dans la diversité. Près de 900 000 espèces d'insectes sont déjà signalées, représentant plus de 80 % des espèces animales décrites. 10 000 nouvelles espèces d'in-

• Travail du réseau de recherche PAL+ « *Anopheles d'Afrique* » (D.F., directeur de recherche IRD, Montpellier ; A.C., étudiante en thèse, IRD, Montpellier ; P.A.A., Chercheur IMPM, Yaoundé, Cameroun ; C.A.-N., étudiant en thèse, OCEAC, Yaoundé, Cameroun ; C.W., étudiant en thèse, OCEAC, Yaoundé, Cameroun, P.K. chercheur, IRD-Université Montpellier 2, Montpellier ; I.D., chercheur IRD - Institut Pasteur, Dakar, Sénégal ; D.B., Chercheur, ISS, Rome, Italie ; J-B.D., chercheur, Cermes, Niamey, Niger ; V.R., étudiante en thèse, IRD - Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar ; R.D., chercheur, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso ; M.A.-A., étudiant en thèse, Centre Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire ; C.C., chercheur, Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar ; G.L.G., Technicien, IRD - Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar, F.S., Chargé de Recherche, IRD - OCEAC, Yaoundé, Cameroun.

• Correspondance : D. FONTENILLE, LIN, IRD, BP 64501, 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier, Cedex 5, France • Fax : +33 (0)4 67 54 20 44 • E-mail : courriel : didier.fontenille@mpl.ird.fr •

sectes sont publiées chaque année, et on estime entre 2 et 30 millions le nombre d'espèces restant à découvrir. A titre d'exemple, da Cunha Ramos et Brunhes, dans un ouvrage à paraître en 2003 décrivent 48 nouvelles espèces malgaches de moustiques du genre *Uranotaenia* (5).

En ce qui concerne les vecteurs de Plasmodium, cette recherche de la précision n'est pas qu'un pur exercice académique visant à ajouter un nom dans un catalogue. Bien sûr, il serait plus simple de se contenter d'un seul vecteur de Plasmodium (l'*Anopheles*), mais la réalité est beaucoup plus complexe. La connaissance de la systématique a un intérêt très concret dans les stratégies de contrôle actuelles et futures. Viendrait-il à l'idée d'un parasitologiste de regrouper dans une même entité les 4 Plasmodium humains, à un bactériologiste de dire que toutes les souches d'*Echerichia coli* se valent, à un virologiste que les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont équivalents en terme de pathogénicité ? De la même manière, il y a souvent des différences extrêmement importantes en terme de transmission palustre entre deux espèces d'anophèles d'un même complexe. Leur biologie, et par la même les méthodes de contrôle à mettre en place, ne sont pas les mêmes, sans parler de la possibilité que ces différentes espèces ou populations transmettent des génotypes de Plasmodium de pathogénicité, virulence, phénotype clinique différents.

Par ailleurs, si le concept d'espèce au sens biologique que lui donne Mayr (6) «une espèce est un groupe de populations naturelles réellement ou potentiellement inter-fécondes, isolées du point de vue reproductif des autres groupes équivalents», est utile pour décrire et élaborer des stratégies de lutte, ce sont bien les populations spatio-temporelles de vecteurs (c.a.d. des individus d'une même espèce en un lieu et un temps donnés), en relation avec les populations humaines et plasmodiales qui constituent l'unité réellement fonctionnelle d'un système vectoriel.

Le programme PAL+ du Ministère français de la Recherche a permis à un réseau d'entomologistes médicaux français et africains de conduire des recherches sur les vecteurs africains et malgaches, et d'explorer cette complexité. Cet article présente des données récentes obtenues entre 2000 et 2003 sur les principaux groupes ou complexes d'anophèles vecteurs en Afrique.

LE COMPLEXE ANOPHELES GAMBIAE

Le complexe *An. gambiae* regroupe aujourd'hui sept espèces : *An. gambiae* et *An. arabiensis*, deux des vecteurs majeurs de plasmodium en Afrique, ainsi que *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* et *An. quadriannulatus* B récemment décrits en Ethiopie par Hunt et al. (7).

An. melas, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* et *An. quadriannulatus* B, ont un rôle nul ou faible dans l'épidémiologie de la transmission du paludisme. Leur distribution est localisée. En revanche *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont une aire de répartition extrêmement vaste sur

tout le continent africain, *An. gambiae* étant plutôt adapté aux zones de forêt et de savane humide alors qu'*An. arabiensis* peuple les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara (8). La zone de recouvrement de ces deux espèces est cependant très importante et on les trouve souvent en sympatrie. De plus, elles apparaissent extrêmement bien adaptées à l'homme et son environnement, d'une part en termes de préférences trophiques, puisqu'elles présentent toutes les deux un très fort taux d'anthropophilie; d'autre part, c'est auprès de l'homme qu'elles trouvent les gîtes larvaires et les gîtes de repos qui leur conviennent le mieux (9-11).

Le démantèlement de ce complexe d'espèces s'est fait initialement par l'étude des croisements entre populations-espèces à biologie et/ou répartition différentes, la plupart des croisements donnant des mâles F1 stériles (7, 12). Puis l'étude du polymorphisme des chromosomes polytènes par la technique cytogénétique a révélé l'existence d'inversions chromosomiques diagnostiques, permettant de caractériser les différents membres du complexe (13). On dispose aujourd'hui d'un test PCR (*Polymerase Chain Reaction*) spécifique d'espèce, basé sur le polymorphisme observé au niveau des ADN ribosomiaux (rDNA). Cet outil moléculaire permet d'identifier rapidement les spécimens collectés sur le terrain à n'importe quel stade de leur développement (14).

Le potentiel adaptatif d'*An. gambiae* s.s. à des environnements très différents est en grande partie lié à la présence d'inversions chromosomiques polymorphes observées notamment sur le chromosome 2. Cinq « formes chromosomiques » ont ainsi été définies en Afrique de l'Ouest: les formes Forêt, Savane, Bamako, Bissau et Mopti (13, 15, 16) qui se répartissent principalement en fonction du degré d'aridité du milieu. Ainsi, la forme Forêt, caractérisée par l'arrangement standard (pas d'inversion) sur les deux bras du chromosome 2, peuple les environnements de forêt et de savane les plus humides, les formes Savane ou Mopti se retrouvant quant à elles dans des environnements plus secs, voire très arides.

Depuis la fin des années 90, plusieurs équipes de recherche ont appliqué une approche moléculaire à cette problématique de spéciation chez *An. gambiae*. Ainsi l'étude des fragments intergéniques des rDNA, a permis de définir des sites RFLP différenciant Mopti d'une part et Savane-Bamako d'autre part. Il a alors été possible de synthétiser des amorces pour une PCR spécifique permettant de révéler deux profils différents qu'on a appelés M et S (17, 18). Si au Mali, au Burkina-Faso et en Côte d'Ivoire tous les spécimens Mopti appartiennent à la forme M alors que Savane et Bamako présentent toujours le profil S, ce n'est pas le cas dans les autres régions d'Afrique (4). Cependant, quelles que soient les régions, il a été clairement démontré que les flux de gènes entre la forme M et la forme S sont très réduits, démontrant un phénomène de spéciation en cours (4, 18, 19).

Dans le Sud Cameroun l'ensemble des individus capturés se rattache cytologiquement à la forme chromosomique « forest ». En revanche, ils se répartissent entre

formes moléculaires M et S, parfois dans le même village. Ainsi, dans le village de Simbock, où les deux formes sont sympatriques, une analyse de la différenciation génétique basée sur le polymorphisme de *loci* microsatellites, montre que les populations M et S sont significativement différentes. De plus, le fait qu'aucun hybride MS n'ait été trouvé confirme que dans cette région au moins, la séparation en deux espèces distinctes est en voie d'achèvement (20). Nos travaux en cours s'intéressent maintenant aux causes et aux mécanismes génétiques à l'origine de cette spéciation et à l'étude d'éventuelles différences de capacité et compétence vectorielle entre ces espèces naissantes.

Ces recherches devraient être facilitées par l'accès récent à la séquence presque complète du génome d'*An. gambiae*. En effet l'intérêt d'*An. gambiae*, comme vecteur et comme modèle, a conduit un consortium d'équipes à réaliser son séquençage par une stratégie de *shotgun* (séquençage aléatoire global). Deux banques BAC génomiques ont été constituées, une à partir de moustiques entiers, l'autre à partir des ovaires. Les plasmides contenaient des inserts de trois tailles (2,5 kb, 10 kb et 50 kb). La séquence de ce génome a été publiée en 2002 (21). Malgré des problèmes méthodologiques dus au polymorphisme de départ des moustiques utilisés pour le séquençage, 8987 scaffolds (séries de séquences positionnées) ont été validés pour 278 mégabases qui coderaient pour environ 14 000 gènes. La connaissance, même imparfaite, du génome a permis de classer les protéines prédites par les outils bio-informatiques, en grands groupes d'intérêt, par exemple récepteurs liés à l'olfaction, protéines liées à l'immunité des anophèles, ou liées à la digestion des repas de sang, ou encore intervenant dans la résistance aux insecticides. Tous les gènes codant pour ces protéines pourraient être autant de nouvelles cibles pour le contrôle de la transmission.

LE GROUPE ANOPHELES FUNESTUS

Les espèces du groupe *An. funestus* sont mal connues. On sait, depuis les années 1930, que ce groupe se compose de plusieurs espèces proches qui ne peuvent être différenciées que par de très discrets caractères sur les larves ou les adultes. *An. funestus*, *An. confusus*, *An. leesoni*, *An. rivulorum* et *An. brucei* sont déterminables au stade larvaire, alors que les espèces du sous groupe *funestus* : *An. funestus*, *An. parensis*, *An. aruni* et *An. vaneedeni* peuvent être identifiés par de petites différences morphologiques chez les adultes (10). Leur biologie et leur capacité vectorielle sont très différentes. A l'exception d'*An. funestus*, ces espèces semblent essentiellement zoophiles. Des *Plasmodium* humains n'ont été trouvés que chez *An. funestus* qui est un excellent vecteur, à capacité vectorielle élevée, et très rarement chez *An. rivulorum* en Tanzanie (22). *An. vaneedeni* a pu être infesté expérimentalement (23).

L'identification précise de l'espèce dans le groupe est donc d'une très grande importance pour la lutte anti-vectorielle. Ainsi, en Tanzanie et en Afrique du Sud, alors que des traitements par pulvérisations intra-domiciliaires

avaient éliminé *An. funestus*, quelques spécimens persistaient. Selon la région, il s'est avéré, par une étude minutieuse des individus persistant après traitement, qu'il s'agissait d'*An. parensis*, *An. rivulorum* ou *An. vaneedeni*. Depuis 1998, plusieurs techniques de biologie moléculaire permettent de différencier des espèces du groupe *An. funestus*. Koekemoer et al. ont développé des méthodes basées sur la PCR-RFLP puis la PCR-SSCP, puis ce groupe a proposé récemment une PCR multiplexe basée sur des différences de séquences dans les ITS2 du rDNA, et qui permet d'identifier *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. rivulorum*, *An. leesoni* et *An. parensis* (24-26).

En 2003, Cohuet et Coll (27) ont mis en évidence, sur des critères biologiques, morphologiques et génétiques un nouveau taxon, proche de *An. rivulorum*, présent du Burkina Faso au Cameroun et se différenciant bien des populations d'*An. rivulorum* d'Afrique du Sud où l'espèce a été décrite initialement. Ce nouveau taxon nommé provisoirement «*An. rivulorum-like*» ne semble pas avoir de rôle vecteur. La PCR multiplexe a été complétée par une amorce spécifique du taxon «*An. rivulorum-like*» et rend donc à présent possible l'identification de 6 espèces du groupe *An. funestus*.

A l'intérieur même de l'espèce *An. funestus* il est important de savoir si toutes les populations, caractérisées par leur structure génétique, ont la même compétence et capacité vectorielle. *An. funestus* est très polymorphe, biologiquement et génétiquement. Des études de cytogénétique réalisées du Sénégal à Madagascar ont montré l'extrême hétérogénéité de cette espèce, qui présente au moins 11 inversions chromosomiques paracentriques sur les chromosomes 2, 3 et 5 (28-31).

Au Burkina Faso, de forts déséquilibres d'Hardy-Weinberg couplés à des déséquilibres de liaisons significatifs entre certaines inversions chromosomiques, ont conduit Costantini et Coll (32) à émettre l'hypothèse de l'existence de deux formes chromosomiques sympatriques dénommées Kiribina et Folonzo avec un polymorphisme contrasté, témoignant probablement d'un phénomène de spéciation en cours chez *An. funestus*.

Au Sénégal, ce sont trois populations qui peuvent être individualisées sur la base des inversions chromosomiques. Deux de ces formes chromosomiques se trouvent en sympatrie, avec un fort déficit d'hybrides suggérant, comme au Burkina Faso, deux populations génétiquement isolées (31). Les mêmes observations ont été faites au Cameroun, où une forme chromosomique est présente dans le Nord et une autre au Sud, avec un fort déficit d'hybrides en zone de recouvrement (Cohuet et Coll non publié). Toutes ces observations d'Afrique de l'Ouest, suggèrent des flux de gènes restreints entre les formes chromosomiques, alors qu'au Kenya (33) ou à Madagascar la différenciation en «*cytotypes*» est beaucoup moins nette.

L'analyse des structures génétiques des populations basée sur la comparaison des fréquences génotypiques d'allèles microsatellites a donné des résultats à première vue contradictoires avec ceux de la cytogénétique. Les différentes populations sont apparues beaucoup moins isolées

génétiqnement que ne le laissait penser la structuration caryotypique. Même dans les zones hybrides du Sénégal et du Cameroun, où les formes chromosomiques étaient structurées, l'équilibre de Hardy-Weinberg a été respecté. Ces résultats suggèrent que les inversions chromosomiques sont essentiellement une réponse adaptative à l'environnement, et que des flux de gènes entre formes existent, même si les hybrides sont rares, probablement à cause de la perturbation de la méiose liés aux réarrangements chromosomiques chez ces individus, ou à une capacité reproductive inférieure des hybrides.

La question sur laquelle nous travaillons maintenant est de savoir si la restriction des échanges génétiques due aux inversions chromosomiques est suffisante pour générer un phénomène de spéciation, qui serait génétiquement observable en dehors des inversions concernées.

LE GROUPE *ANOPHELES NILI*

Anopheles nili est largement répandu en Afrique tropicale (33) et apparaît comme le vecteur majeur de Plasmodium dans certaines zones rurales forestières en Afrique centrale (34). Les larves d'*An. nili* s.l. sont typiques des végétations bordant les rives des rivières et les fleuves de ces zones forestières. Des variations morphologiques, écologiques et éthologiques ont été observées dans les populations d'*An. nili* par plusieurs auteurs (9, 35, 36) suggérant qu'*An. nili* s.l. est un groupe d'espèces. Sur la base des critères morphologiques, trois espèces, *An. nili* s.s., *An. somalicus*, et *An. carnevalei* ont été décrites au sein de ce groupe. Très récemment, Awono-Ambene *et Coll* ont mis en évidence une nouvelle forme morphologique dénommée «forme *Oveng*», en zone forestière du Sud Cameroun (résultats non publiés).

Cependant, l'identification précise des membres du groupe *An. nili* est souvent difficile, voire impossible, dans les conditions de terrain, en raison de différences morphologiques mineures sur les larves ou les adultes, parfois rendues peu visibles lorsque les femelles ont perdu des écailles suite à leur capture. De ce fait, la distribution de chaque espèce ainsi que leur degré d'implication dans la transmission du paludisme sont mal connus.

Afin de vérifier la pertinence de la classification morphologique dans le groupe *An. nili*, nous avons examiné les variations de séquences des régions ITS1 et ITS2 (*Internal non coding Transcribed Spacer 1* et 2) et du domaine D3 de l'ADN ribosomique de différentes espèces ou formes de ce groupe. L'analyse a concerné *An. nili* s.s., *An. carnevalei*, *An. somalicus* et la «forme *Oveng*» capturés au Cameroun, de même que des spécimens du Burkina Faso, de Côte d'Ivoire et du Sénégal.

L'analyse de séquences de ces régions ITS1, ITS2 et domaine D3 de rDNA des espèces et formes a révélé quatre groupes de génotypes, qui correspondent bien aux 3 espèces et à la «forme *Oveng*». La comparaison des séquences de groupe à groupe, d'ITS2 par exemple, a permis d'obtenir des distances génétiques (d) variant de 0.14

à 0.20. Ces valeurs de distances sont supérieures à celles qu'on observe généralement entre populations ou individus de la même espèce, et sont de niveau inter-spécifique, similaires à ce qu'on observe entre espèces du groupe *An. funestus* (26, 37) ou du complexe *An. quadrimaculatus* (37). En ce basant sur la variation de séquence d'ITS2 des espèces du groupe *An. nili*, une méthode d'amplification par PCR allèle spécifique a été développée (39).

La PCR multiplexe développée, en permettant l'identification à tous les stades, y compris de spécimens mal conservés, facilite l'étude de la répartition, de la biologie et du rôle vecteur des 4 espèces connues du complexe *An. nili*, à travers l'Afrique.

Nous disposons pour le moment de très peu d'information sur *An. somalicus*, qui semble exophile et zoophile, et ne joue donc probablement aucun rôle dans la transmission des Plasmodium. Ce n'est pas le cas d'*An. nili*, d'*An. carnevalei* et de la «forme *Oveng*», qui sont tous 3 vecteurs. En effet, des taux d'infestation des glandes salivaires dépassant 3 % ont pu être observés chez *An. nili*, et des taux entomologiques d'inoculation de plus de 100 piqûres infectantes par homme par an ont été signalés. Une étude conduite en 2002 dans un village du Sénégal oriental a montré que 56 piqûres infectantes par homme par an pouvaient être dues à cette espèce, que l'on avait négligé jusqu'à présent dans ce pays (40). De même *An. carnevalei* est peu connu. Des individus infectés par *P. falciparum*, ont été capturés sur homme, démontrant ainsi son rôle vecteur et son caractère, au moins en partie, anthropophile. Ce moustique a été signalé au Cameroun et en Côte d'Ivoire, mais sa répartition doit être beaucoup plus large.

En ce qui concerne la «forme *Oveng*», les résultats morphologiques, biologiques et génétiques permettent de conclure sans ambiguïté que nous sommes en présence d'une nouvelle espèce à part entière (Awono-Ambene *et Coll*, non publié). Cette nouvelle espèce, dont la biologie est encore peu connue, sera dénommée *An. ovengensis*, du nom du village *Oveng* situé dans la forêt de Campo au Sud Cameroun. Des femelles ont été capturées piquant l'homme pendant la nuit. Le taux d'agressivité variaient entre 50 et 300 piqûres par homme par nuit, le long des rivières où étaient situés les gîtes. Cette espèce a été très rarement capturée au repos à l'intérieur des maison suggérant un comportement plutôt exophile. Des taux d'infestation plasmoidale moyens de 0,4 à 1,9 % ont été observés dans le Sud Cameroun.

LE COMPLEXE *ANOPHELES MOUCHETI*

An. moucheti s.l. est un vecteur important du paludisme dans les localités situées le long des cours d'eau en Afrique équatoriale (9). Les études effectuées dans le groupe *An. moucheti* ont permis d'identifier 3 formes morphologiques : *An. moucheti moucheti* (la forme typique), *An. moucheti nigériensis* et *An. moucheti bervoetsi* décrit pour la première fois en République Démocratique du Congo (RDC). Lors de sa mise au point sur le groupe *An. moucheti*

au Cameroun, Brunhes *et Coll* ont considéré, sur la base des critères morphologiques, qu'*An. m. nigériensis* était synonyme d'*An. m. moucheti* et qu'*An. m. bervoetsi* était une sous espèce d'*An. m. moucheti* (41). Plus récemment, des études isoenzymatiques et des suivis de descendance ont montré que différentes populations géographiques du Cameroun, regroupant les 3 formes morphologiques, appartenaient à une unique espèce (42).

Malgré ces données, le statut taxonomique et le rôle vectoriel d'*An. moucheti* au niveau africain restaient flous. Pour y voir plus clair, nous avons analysé et comparé les séquences de plusieurs régions d'ADN notamment les fragments ITS1, ITS2 et D3 de l'ADN ribosomique, et cytochrome b mitochondrial de spécimens d'*An. moucheti* capturés au Cameroun, en RDC et en Ouganda. Les spécimens d'*An. moucheti* du Cameroun ont montré un faible niveau de variation nucléotidique, sans corrélation avec les formes morphologiques, confirmant la probable homogénéité d'*An. moucheti* dans ce pays.

De même, la diversité génétique entre les spécimens d'*An. moucheti* d'Ouganda et du Cameroun, pourtant géographiquement éloignés, est très faible ($d=0.001$) et suggère que les populations de ces deux pays appartiennent au même taxon. En revanche, les séquences des spécimens d'*An. m. bervoetsi* de RDC sont très différentes de ceux du Cameroun ou d'Ouganda, les distances génétiques entre spécimens du Cameroun et de RDC atteignant jusqu'à 0.15 pour la séquence ITS1. Ces valeurs sont largement supérieures aux valeurs de divergence intra-espèces que l'on trouve dans la littérature. Des résultats préliminaires utilisant les marqueurs microsatellites (43) montrent également des différences importantes entre les populations du Cameroun et de RDC. Il apparaît donc, qu'à l'échelle africaine, on soit en présence d'au moins deux taxons. Dans le but d'étudier la répartition géographique des membres du groupe, et leur rôle dans la transmission palustre, une PCR allèle spécifique du groupe *An. moucheti* a été développée pour distinguer *An. moucheti* d'*An. m. bervoetsi*.

ANOPHELES MASCARENSIS

Anopheles mascarensis, est un moustique endémique de Madagascar et de l'Archipel des Comores (Anjouan et Mohéli). Il a été reconnu comme vecteur de Plasmodium en 1990, à partir d'échantillonnage de l'Ile Sainte Marie, sur la côte Est de Madagascar. Depuis, il a été retrouvé porteur de *P. falciparum* dans plusieurs régions du Sud et de l'Est de la grande île (44, 45).

Malgré de nombreuses recherches, cette espèce n'a en revanche jamais été trouvée infectée sur les hautes terres, où elle apparaît essentiellement zoophile et exophile. La question s'est donc naturellement posée de savoir si les populations côtières, de régions plus chaudes, et les populations des hautes terres appartenaient à la même espèce. Deux hypothèses ont été confrontées, la première étant la présence de deux espèces différentes, dont une non vectrice

sur les hautes terres, la seconde hypothèse attribuant ces différences d'infectivité essentiellement à des capacités vectorielles différentes de populations colonisant des milieux écologiquement et climatiquement très différents.

La comparaison morphométrique entre des spécimens de la côte et des hautes terres n'a pas permis de mettre en évidence de différence. Plusieurs analyses génétiques ont été entreprises portant sur des comparaisons de séquences des fragments ITS et D3 du rDNA, et du gène de la cytochrome oxydase II sur le DNA mitochondrial. Seul ce dernier marqueur est polymorphe, les deux précédents étant strictement identiques dans les différentes populations testées. Ces analyses ont été complétées par une étude basée sur 6 amorces RAPD, déterminant 19 marqueurs.

Tous les résultats concordent et n'apportent aucun argument en faveur de la présence de plusieurs unités taxonomiques chez *An. mascarensis* à Madagascar. Les différences de comportement et de taux d'infestations observés entre populations géographiques seraient essentiellement dus à des environnements différents. Il convient donc d'en tenir compte dans les stratégies de lutte anti-vectorielle à Madagascar.

CONCLUSION

La diversité des écosystèmes africains, et les changements qu'ils connaissent sous l'effet des activités humaines, font que les systèmes vectoriels palustres sont très variés, et en perpétuelle évolution. La systématique des vecteurs de Plasmodium reflète bien cette diversité et, alors que l'on croyait bien connaître les vecteurs majeurs, on s'aperçoit, par des observations de terrain approfondies, renforcées par des études de génétique et de biologie moléculaire, que la situation est plus complexe que prévue. De vraies espèces cryptiques existent parmi les complexes *An. gambiae*, *An. nili* et *An. moucheti*. Chez *An. gambiae* s.s. des populations sont structurées, montrant des phénomènes de spéciation en cours. D'autres observations sont pour le moment plus difficiles à interpréter, reflétant probablement des adaptations locales de populations à divers environnements sans que des barrières génétiques aient encore pu se mettre en place, comme chez *An. funestus*. Enfin d'autres espèces, telle que *An. mascarensis*, paraissent homogènes. La connaissance des espèces et des populations est nécessaire si on veut rendre la lutte anti-vectorielle la plus efficace possible. Par ailleurs la compréhension de la génétique des populations, de la systématique et de la phylogénie des espèces vectrices, pourra permettre de retracer l'histoire naturelle et l'évolution des systèmes vectoriels palustres en Afrique ■

Remerciements • Nous tenons à remercier Louis Mukwaya, Vincent Robert, Zeinab Annan, Thierry Baldet, Fabrice Chandre, pour leur participation à ce travail, sur le terrain ou au laboratoire. P.H. Awono-Ambene, C. Antonio-Nkondjio et C. Wondji ont bénéficié de financements OMS-TDR. L'essentiel des résultats présentés a été obtenu grâce à un financement PAL+ du Ministère Français de la Recherche.

REFERENCES

- 1 - MACDONALD G - The epidemiology and control of malaria. Oxf. Univ Press ed, Londres, 1957, 201 p.
- 2 - PATERSON HE - Direct evidence for the specific distinctness of form A, B and C of the *Anopheles gambiae* complex. *Cahiers ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie* 1965; **3-4** : 179-180.
- 3 - DAVIDSON G - The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex. *Rivista di Malariologia* 1964; **13** : 167-183.
- 4 - DELLA TORRE A, FANELLO C, AKOGBETO M *et Coll* - Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 2001; **10** : 9-18.
- 5 - DA CUNHA RAMOS H, BRUNHES J - Insecta Diptera Culicidae Uranotaenia, Collection Faune de Madagascar, volume 91, IRD Éditions - CIRAD - Publications scientifiques du MNHN, 2003.
- 6 - MAYR E - Systematics and the origin of species. University press ed, Columbia, 1942.
- 7 - HUNT RH, COETZEE M, FETTENE M - The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; **92** : 231-235.
- 8 - COETZE M, CRAIG M, LE SUEUR D - Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* 2000; **16** : 74-77.
- 9 - GILLIES MT, DE MEILLON B - The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). The South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 2nd Ed., 1968, 343pp.
- 10 - GILLIES MT, COETZEE M - A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara. The South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 1987, 143 pp.
- 11 - COLUZZI M - *Plasmodium falciparum* en Afrique subsaharienne. Spéciation récente des vecteurs, transmissibilité, évolution de la pathogénèse / contrôle de la maladie et capacité vectorielle. *Ann Inst Pasteur Actualites* 2002; 81-99.
- 12 - WHITE GB - *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974; **68** : 278-301.
- 13 - COLUZZI M, SABATINI A, PETRARCA V, DI DECO MA - Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; **73** : 483-497.
- 14 - SCOTT JA, BROGDON WG, COLLINS FH - Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993; **49** : 520-529.
- 15 - COLUZZI M, PETRARCA V, DI DECO MA - Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* 1985; **52** : 45-63.
- 16 - TOURE YT, PETRARCA V, TRAORE SF *et Coll* - The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 1998; **40** : 477-511.
- 17 - FAVIA G, TORRE AD, BAGAYOKO M *et Coll* - Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 1997; **6** : 377-383.
- 18 - FAVIA G, LANFRANCOTTI A, SPANOS L *et Coll* - Molecular characterization of ribosomal DNA (rDNA) polymorphisms discriminating chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 2001; **10** : 19-23.
- 19 - CHANDRE F, MANGUIN S, BRENGUES C *et Coll* - 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* 1999; **41** : 319-322.
- 20 - WONDJI C, SIMARD F, FONTENILLE D - Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol* 2002; **11** : 11-19.
- 21 - HOLT RA *et Coll* - The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; **298** : 129-149.
- 22 - WILKES TJ, MATOLA YG, CHARLWOOD JD - *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol* 1996; **10** : 108-110.
- 23 - DE MEILLON B, VAN EEDEN GJ, COETZEE L *et Coll* - Observation on a species of the *Anopheles funestus* subgroup, a suspected exophilic vector of malaria parasites in northeastern Transvaal, South Africa. *Mosq News* 1977; **37** : 657-661.
- 24 - KOEKEMOER LL, COETZEE M, HUNT RH - HpaII endonuclease distinguishes between two species in the *Anopheles funestus* group. *Insect Mol Biol* 1998; **7** : 273-277.
- 25 - KOEKEMOER LL, LOCHOUARN L, HUNT RH, COETZEE M - Single-strand conformation polymorphism analysis for identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *J Med Entomol* 1999; **36** : 125-130.
- 26 - KOEKEMOER LL, KAMAU L, HUNT RH, COETZEE M - A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66** : 804-811.
- 27 - COHUET A, SIMARD F, TOTO JC *et Coll* - Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon, and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg* 2003 (in press).
- 28 - LOCHOUARN L, DIA I, BOCCOLLINI D *et Coll* - Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; **92** : 607-612.
- 29 - BOCCOLINI D, SABATINI A, SANOGO E *et Coll* - Chromosomal and vectorial heterogeneities in *Anopheles funestus* from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* 1994; **36 Suppl 1** : 20.
- 30 - BOCCOLINI D, SAGNON N, TOURE YT - Chromosomal polymorphism in *Anopheles funestus* and description of new inversions in Burkina Faso and Mali. *Parassitologia* 1998; **40 Suppl 1** : 14.
- 31 - DIA L, LOCHOUARN L, BOCCOLINI D *et Coll* - Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* 2000; **7** : 179-184.
- 32 - COSTANTINI C, SAGNON N, ILBOUDO-SANOGO E *et Coll* - Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* 1999; **41** : 595-611.
- 33 - KAMAU L, HUNT R, COETZEE M - Analysis of the population structure of *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from western and coastal Kenya using paracentric chromosomal inversion frequencies. *J Med Entomol* 2002; **39** : 78-83.
- 34 - HAMON J, MOUCHET J - Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. *Med Trop* 1961; **21** : 643-660.
- 35 - CARNEVALE P, LE GOFF G, TOTO JC, ROBERT V - *Anopheles nili* as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon. *Med Vet Entomol* 1992; **6** : 135-138.
- 36 - BRUNHES J, LE GOFF G, GEOFFROY B - Afrotropical anopheline mosquitoes. III. Description of 3 new species: *Anopheles carnevalei* sp. n., *An. hervyi* sp. n. and *An. dualaensis* sp.n. and resurrection of *An. rageai* Mattingly and Adam. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; **15** : 552-558.
- 37 - HACKETT BJ, GIMNIG J, GUELBEOGO W *et Coll* - Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol* 2000; **9** : 369-374.
- 38 - CORNEL AJ, COLLINS FH - PCR of the ribosomal DNA intergenic spacer regions as a method for identifying mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. In «Species diagnostics protocols PCR and other nucleic acid methods. Methods in molecular Biology». Vol 50. CLAPP JP, éditeur. Humana press ed, NJ Totowa, 1996, pp 321-332.

- 39 - KENGNE P, AWONO-AMBENE P, ANTONIO-NKONDJIO C *et Coll* - Molecular identification of members of the *Anopheles nili* group, African malaria vectors. *Med Vet Entomol* 2003; **17** : 167-174.
- 40 - DIA I, DIOP T, RAKOTOARIVONY I *et Coll* - Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera : Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol* 2003; **40** : (sous presse).
- 41 - BRUNHES J, LE GOFF G, MANGA L, GEOFFROY B - Anophèles afro-tropicaux. IV - Mise au point sur les espèces et sous-espèces du groupe *Anopheles (Cellia) mouchei*; réhabilitation d'*An. (C.) multinctus* et d'*An. (Cellia) garnhami basilewskyi*. *Annales de la Société entomologique de France* 1998; **34** : 397-405.
- 42 - ANTONIO-NKONDJIO C, SIMARD F, COHUET A, FONTENILLE D - Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles mouchei*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric South Cameroon populations. *Infection, genetics and evolution* 2002; **45** : 1-4.
- 43 - ANNAN Z, KENGNE P, BERTHOMIEU A *et Coll* - Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the mosquito *Anopheles mouchei*, malaria vector in Africa. *Molecular Ecology Notes* 2003; **3** : 56-58.
- 44 - FONTENILLE D, CAMPBELL GH - Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar ? *Am J Trop Med Hyg* 1992; **46** : 28-30.
- 45 - MARRAMA L, LAVENTURE S, RABARISON P, ROUX J - *Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947) : vecteur principal du paludisme dans la région de Fort dauphin (Sud-Est de Madagascar). *Bull Soc Pathol Exot* 1999; **92** : 136-138.
-

Article 2

Diabaté A., Brengues C., Baldet, T., **Dabiré K.R.**, Hougard J.M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J., Chandre F. (2004). The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop. Med. Int. Health*, 9 (12): 1267-1273

The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and *de novo* phenomena

A. Diabate¹, C. Brengues², T. Baldet³, K. R. Dabiré¹, J. M. Hougard², M. Akogbeto⁴, P. Kengne², F. Simard⁵, P. Guillet⁶, J. Hemingway⁷ and F. Chandre⁴

1 Institut de Recherche en Sciences de la Santé/Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

2 Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles/Institut de Recherche pour le Développement-Montpellier, Montpellier Cedex, France

3 CIRAD-EMVT, Programme ECONAP, campus international de Baillarguet, Montpellier Cedex, France

4 Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou, Cotonou, Bénin

5 Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale/Institut de Recherche pour le Développement, Yaoundé, Cameroun

6 World Health Organization, Geneva, Switzerland

7 Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK

Summary

During extensive sampling in Burkina Faso and other African countries, the Leu-Phe mutation producing the *kdr* pyrethroid resistance phenotype was reported in both *Anopheles gambiae* *ss* and *A. arabiensis*. This mutation was widely distributed at high frequency in the molecular S form of *A. gambiae* while it has been observed at a very low frequency in both the molecular M form and *A. arabiensis* in Burkina Faso. While the mutation in the M form is inherited through an introgression from the S form, its occurrence is a new and independent mutation event in *A. arabiensis*. Three nucleotides in the upstream intron of the *kdr* mutation differentiated *A. arabiensis* from *A. gambiae* *ss* and these specific nucleotides were associated with *kdr* mutation in *A. arabiensis*. Ecological divergences which facilitated the spread of the *kdr* mutation within the complex of *A. gambiae* *ss* in West Africa, are discussed.

keywords pyrethroids, *kdr* mutation, introgression, *Anopheles gambiae* *ss*, *Anopheles arabiensis*, molecular forms, Burkina Faso, Africa

Introduction

Pyrethroids are a large group of highly insecticidal compounds. They have been widely used in controlling many insect pests since the 1970s. However, their important use in the last 20 years has led to the development of resistance in many insect species (Dong 1996). One main resistance mechanism is reduced target-site sensitivity to these compounds in the insect nervous system, known as knockdown resistance (*kdr*). The *kdr* has been first reported against dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in the early 1950s in houseflies (Busvine 1951; Milani 1954), then lately in various insects, such as *Musca domestica* (Williamson *et al.* 1993), *Blattella germanica* (Dong & Scott 1994), *Heliothis virescens* (Taylor *et al.* 1993; McCaffery *et al.* 1995). This phenotype results from a single point mutation in a gene that encodes the sodium channel (Williamson *et al.* 1996).

Pyrethroid resistance was first reported in *Anopheles gambiae* *ss* in Côte d'Ivoire (Elissa *et al.* 1993). It was probably selected by the intensive use of DDT and, later

pyrethroids for cotton crop protection (Chandre *et al.* 1999a; Diabaté *et al.* 2002a). As in several other insect species, a single nucleotide substitution [leucine (TTA) to phenylalanine (TTT)] in the *p*-sodium channel gene is the mutation responsible for pyrethroid resistance in *A. gambiae* *ss* from West Africa (Martinez-Torres *et al.* 1998). A second *kdr* mutation on the same amino acid [leucine (TTA) to serine (TCA)], produces pyrethroid resistance in *A. gambiae* *ss* from East Africa (Ranson *et al.* 2000) and recently pyrethroid resistance because of a mono-oxygenase-based mechanism was observed in both *A. funestus* and *A. gambiae* *ss* (Hargreaves *et al.* 2000; Etang *et al.* 2003). Following the availability of a rapid polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostic test (Martinez-Torres *et al.* 1998), several studies were conducted to estimate the prevalence and assess the current distribution of the Leu to Phe mutation in natural *A. gambiae* populations (Chandre *et al.* 1999b; Weill *et al.* 2000; Della Torre *et al.* 2001). This mutation was observed, sometimes reaching high frequencies, in the

A. Diabate *et al.* **Kdr mutation in *Anopheles gambiae* complex**

S molecular form of *A. gambiae ss* only, while it was not observed in sympatric and synchronous M form mosquitoes, or in *A. arabiensis* (Brooke *et al.* 1999; Chandre *et al.* 1999a). This strengthened earlier evidences for genetic heterogeneity within *A. gambiae ss*, formerly split into five chromosomal forms (Coluzzi *et al.* 1985; Touré *et al.* 1998). The issue of reproductive isolation of the M and S forms of *A. gambiae ss* (and, more broadly, of incipient speciation within this mosquito species) is a moot point and it is still unclear whether these forms can actually be considered as 'true' species (Gentile *et al.* 2001; Della Torre *et al.* 2001; Taylor *et al.* 2001; Triplet *et al.* 2001; Wondji *et al.* 2002; Diabaté *et al.* 2003a). A few years after the *kdr* mutation was described in the S molecular form of *A. gambiae ss*, it was reported in the M form in the forest belt of the littoral of Benin (Fanello *et al.* 2000). Subsequent molecular analysis of the DNA sequence of a large upstream intron suggested that this mutation arose in the M form through genetic introgression from the S form (Weill *et al.* 2000). Despite an extensive survey of this phenomenon in *A. gambiae* M form, the mutation was observed at high frequency only in the littoral forest belt of West Africa, while it was rare inland (Fanello *et al.* 2000; Weill *et al.* 2000; Della Torre *et al.* 2001; Diabaté *et al.* 2002b, 2003b; F. Chandre, unpublished data). The introgression event and subsequent spread could be a recent and ongoing process in this mosquito population.

We aimed at reporting in this paper, the detection of the Leu-Phe mutation in *A. arabiensis* and its distribution within the *A. gambiae* complex in Burkina Faso. We investigated whether this mutation has arisen in *A. arabiensis* through genetic introgression or through a *de novo* mutation by looking at the polymorphism of the intron upstream of the mutation.

Materials and methods

Mosquito populations

Larvae of *A. gambiae sl* were collected in Burkina Faso from 26 sites throughout the country. Because larvae samples can be biased with respect to *kdr* (there may be high levels of consanguinity among larvae from the same pool), special effort was made to collect large samples from different breeding sites and pooling them. The larvae were kept in the laboratory until adults emerged before proceeding to PCR analysis. *Anopheles arabiensis* was sampled from several African countries: Burkina Faso, Benin, Mali, Mauritania, Cameroon, Sudan, Chad, Kenya, Mozambique, Mauritius Island, Reunion Island, Madagascar Island, Djibouti. Mosquitoes were identified morphologically before PCR analysis.

DNA diagnostic test for *kdr* alleles in single mosquito

Genomic DNA was extracted from single mosquitoes according to Collins *et al.* (1987). Overall 10–50 ng of genomic DNA were combined in a 25 µl total volume with four primers Agd1, Agd2, Agd3 and Agd4 according to Martinez-Torres *et al.* (1998). The PCR conditions were 30 s at 94 °C, 30 s at 48 °C and 30 s at 72 °C for 45 cycles. Amplified fragments were analysed by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

PCR identification of the *A. gambiae* complex

Each single mosquito was PCR identified for *A. gambiae* complex determination according to Scott *et al.* (1993). The genomic DNA was mixed with the four primers AA (specific for *A. arabiensis* species), AG (specific for *A. gambiae ss* species), AM (specific for *A. melas* and *A. merus*) and UN (common for all the species) in a total volume of 25 µl. The PCR was carried out with a programme of 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. Ten microlitres of amplified product were run onto an 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining under UV light.

M/S taxon determination

About 10–50 ng of genomic *gambiae s.s.* DNA were PCR amplified according to Favia *et al.* (2001) using primers R3, R5, Mopint and B/Sint. The PCR conditions were 30 s at 94 °C, 30 s at 63 °C and 30 s at 72 °C for 25 cycles with a final extension step at 72 °C for 7 min. Amplification products were run in a 1.4% agarose gel. The results were analysed as described in Favia *et al.* (2001) to determine M or S taxon.

Intron sequence determination

The *kdr* and knockdown-susceptible (*kds*) alleles were separately amplified and sequenced. Resistant allele was amplified using the primers I1dir (5'-AATTTGCAT TACTTACGACA-3', Weill *et al.* 2000) and Agd3 (5'-AATTTGCATTACTTACGACA-3'), according to Martinez-Torres *et al.* (1998). For the susceptible allele, we determined a new reversed primer, AgdS (5'-AATTTG CATTACTTACGACT-3'), located at the same place than Agd3, from the position 312 of the sequence published by Martinez-Torres *et al.* (1998), but different from one base, at the 3'-extremity (on the *kdr* point mutation). The end of this primer, as Agd3, is located into the intron 2, which is situated only 4 bp apart downstream of the *kdr* mutation.

A. Diabate *et al.* *Kdr* mutation in *Anopheles gambiae* complex

About 10–50 ng of genomic DNA were combined with I1dir (Weill *et al.* 2000) and Agd3 (Martinez-Torres *et al.* 1998) for the *kdr* allele and, separately I1dir and AgdS for the susceptible one. The PCR conditions were 30 s at 94 °C, 30 s at 63 °C and 30 s at 72 °C for 35 cycles with a final extension at 72 °C during 10 min. PCR fragments were gel purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) then automated sequencing was performed using the same primers.

Results

Distribution of the *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso

Sampling was conducted throughout Burkina Faso (26 localities) to assess geographical distribution of the *kdr* mutation in both *A. gambiae* ss and *A. arabiensis*. Overall, 546 *A. gambiae* S form specimens, 795 *A. gambiae* M

forms and 232 *A. arabiensis* specimens were analysed for the *kdr* Leu-Phe mutation with a minimum of 50 specimens per village (Figure 1). A total of 571 additional *A. arabiensis* specimens were collected from 11 different countries (Benin, *n* = 15; Mali, *n* = 10; Mauritania, *n* = 40; Cameroon, *n* = 50; Sudan, *n* = 30; Chad, *n* = 30; Kenya, *n* = 30; Mozambique, *n* = 136; Mauritius Island, *n* = 60; Reunion Island, *n* = 100; Madagascar Island, *n* = 30; Djibouti, *n* = 70) and analysed for the same mutation. In a total of 26 localities sampled in Burkina Faso, the molecular S form was detected in 22 sites, the M form in 20 sites and *A. arabiensis* in 18 sites. While the molecular M form is widely distributed throughout the country, the S form and *A. arabiensis* are observed preferentially in humid and dry areas, respectively. The *kdr* mutation was found in the molecular S form wherever present and its frequency ranged from 0.17 to 0.96 (Figure 1). In the M form, the mutation was observed in just one site namely VK7 at a frequency of 0.02 (four

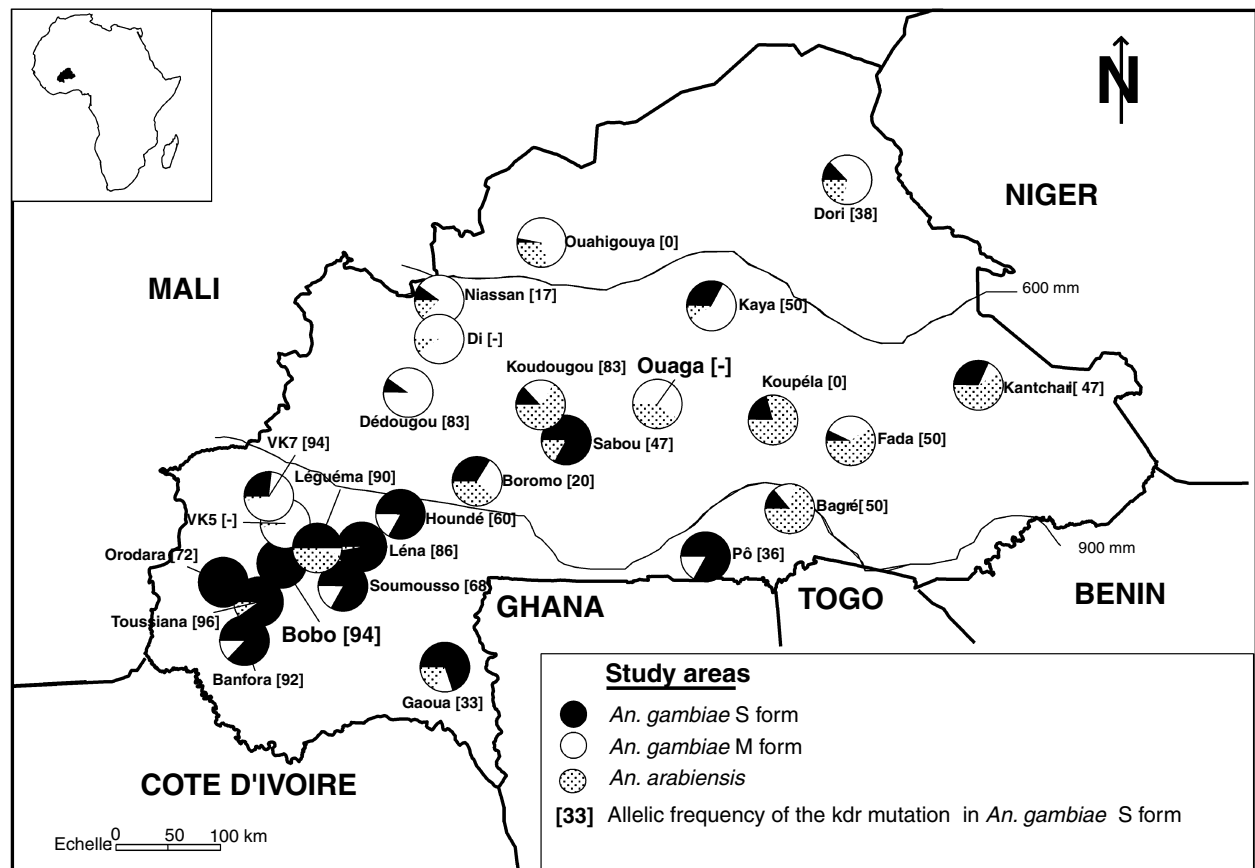


Figure 1 Geographic distribution and resistance profile of *Anopheles gambiae* s.l. to pyrethroids and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in Burkina Faso.

A. Diabate *et al.* **Kdr mutation in *Anopheles gambiae* complex**

heterozygous of 173 specimens analysed for the *kdr* mutation). Despite large and extensive sampling, the *kdr* mutation was observed in a single *A. arabiensis* specimen from Burkina Faso.

Intron polymorphism of susceptible and resistant *A. gambiae* ss and *A. arabiensis*

To better understand the history of the *kdr* allele in both *A. gambiae* M form and *A. arabiensis*, we sequenced 540 bp of the intron upstream the sodium channel gene near the *kdr* mutation. Both alleles were sequenced in 69 mosquitoes (*A. gambiae* S form, $n = 15$; *A. gambiae* M form, $n = 20$ and *A. arabiensis*, $n = 34$). *Anopheles gambiae* ss specimens were collected in the villages of Léna and VK7 in Burkina Faso (Figure 1). *Anopheles arabiensis* specimens were from Burkina Faso, Sudan, Cameroon and Mauritius Island. The Leu-Phe mutation (TTA-TTC) was observed in both *A. gambiae* ss and *A. arabiensis* in all resistant alleles ($n = 30$). A leucine residue was found in susceptible alleles at amino acid 1014 regardless of the species ($n = 108$). No Leu-Ser (TTA-TCA) substitution was detected, as described in East Africa resistant *A. gambiae* ss (Ranson *et al.* 2000). Two polymorphic sites (positions 702 and 896) differentiated the two molecular forms as previously reported in Weill *et al.* (2000). However, both M and S forms displayed the T-C combination at positions 702–896, associated with the *kdr* allele (Table 1). The same pattern was observed with the susceptible allele in *A. gambiae* S form, while the susceptible *A. gambiae* M form consistently displayed C-C or C-A combinations. Three positions (824–830–835) were found to consistently differentiate *A. arabiensis* from *A. gambiae*

Table 1 Discriminating nucleotides (702–896) in the upstream intron of the knockdown-resistant (*kdr*) mutation within M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* ss in Burkina Faso

	Susceptible (Leu)			Resistant (Phe)		
	C-A	C-C	T-C	C-A	C-C	T-C
M taxon						
VK7	4	27	0	0	0	5
Léna	0	4	0	–	–	–
Total	4	31	0	0	0	5
S taxon						
VK7	–	–	–	0	0	16
Léna	0	0	6	0	0	8
Total	0	0	6	0	0	24

Polymorphism observed in position 702 and 896. A T-C combination is observed in both molecular S and resistant molecular M form while the susceptible M form consistently displayed C-A or C-C combination.

Table 2 Discriminating nucleotides (494–824–830–835) between *Anopheles gambiae* ss and *A. arabiensis* in the upstream intron of the *kdr* mutation

Forms/species	Country	Allele	N	Nucleotide position			
				494	824	830	835
<i>A. gambiae</i> S form	Burkina Faso	<i>kds</i>	6	T	T	G	A
		<i>kdr</i>	24	T	T	G	A
<i>A. gambiae</i> M form	Burkina Faso	<i>kds</i>	35	T	T	G	A
		<i>kdr</i>	5	T	T	G	A
<i>A. arabiensis</i>	Burkina Faso	<i>kds</i>	12	T	A	A	T
		<i>kdr</i>	17	G	A	A	T
	Soudan	<i>kdr</i>	1	G	A	A	T
		<i>kds</i>	8	T	A	A	T
	Cameroon	<i>kds</i>	10	G	A	A	T
		<i>kds</i>	6	T	A	A	T
	Mauritius	<i>kds</i>	6	G	A	A	T
		<i>kds</i>	8	G	A	A	T

kds, knockdown-susceptible (Leu); *kdr*, knockdown-resistant allele (Phe); N, number of allele sequenced.

ss (Table 2). Nucleotide at position 494 was fixed in *A. gambiae* ss and polymorphic in *A. arabiensis*. Because the sequence of nucleotides at positions 824–830–835 was specific to *A. arabiensis* in both resistant and susceptible alleles, the *kdr* mutation in *A. arabiensis* is likely to be a *de novo* event rather than the result of introgression.

Discussion

After extensive sampling, the Leu-Phe *kdr* mutation was detected in both *A. gambiae* ss and *A. arabiensis* in Burkina Faso. This mutation was widely distributed at high frequency in the molecular S form, but occurred at a very low frequency in both *A. arabiensis* and the molecular M form of *A. gambiae* ss.

The unequal distribution of the resistant phenotype in *A. arabiensis* and the molecular M and S forms of *A. gambiae* ss is probably the result of differential insecticide pressure selection. The distribution and temporal dynamics of the molecular S form should expose it to higher insecticide selection pressure (Diabaté *et al.* 2002a). As the *kdr* mutation confers cross-resistance to both DDT and pyrethroids, it is likely that the present pattern of this resistance allele distribution in *A. gambiae* ss is a consequence of the important use of DDT in cotton crops in the 1960–1970s, replaced by pyrethroids in the 1980s. The *kdr* mutation has probably been selected some time ago in West Africa, as DDT-resistant, *A. gambiae* ss were reported there in the 1960s (Hamon *et al.* 1968). This, coupled with subsequent pyrethroid exposure, may explain why the *kdr* mutation is observed at such a high frequency in West Africa.

A. Diabate *et al.* **Kdr mutation in *Anopheles gambiae* complex**

A substitution of the same amino acid in various species of insects is rather a rare event. However, the *kdr* mutation has been reported in many species of insects (Dong 1996; Williamson *et al.* 1996; Jamroz *et al.* 1998; Martinez-Torres *et al.* 1998; Ranson *et al.* 2000; Enayati *et al.* 2003). The leucine replacement by an other amino acid is the most common and that suggests that the leucine residue is very important in the recognition and/or binding of pyrethroids and DDT (Ranson *et al.* 2000). The occurrence *de novo* of this mutation in *A. arabiensis* in a sympatric area with highly resistant *A. gambiae ss*, suggests that the hybridization rate between these two sibling species is very low (Touré *et al.* 1998; Taylor *et al.* 2001). Interestingly, the same mutation found in both M and S forms is resulting from an introgression from one form to the other (Weill *et al.* 2000). We believe that the *kdr* mutation distribution in *A. gambiae* complex provides some indication on the level of gene exchange between and within these species and thus is an important genetic marker to assess the reproductive isolation within this complex of species. Of course, a larger sample size of *kdr-arabiensis* would have strengthened our results, but it is worth noting that overall 803 *arabiensis* specimens were analysed for the *kdr* mutation. Furthermore, *kdr-gambiae* resistance is already observed at very high frequencies in Benin and Burkina Faso where both *A. gambiae ss* and *A. arabiensis* are sympatric. That suggests that the *kdr* mutation in *A. arabiensis* is certainly a recent and ongoing process. The patchy distribution of the *kdr* mutation in the molecular M form of *A. gambiae ss* in West Africa is unclear and raises the question of the origin and frequency of resistance in natural M populations. It may be a recent and unique event, which arose in this form through introgression from the S form in the forest belt and subsequently spread inland. However, the current pattern of distribution of the resistant M populations of *A. gambiae ss* do not support this hypothesis. Highly resistant M populations are observed alongside the littoral while low resistance levels are recorded in only a few and discrete places inland. According to Black and Lanzaro (2001) gene flow with partial reproductive isolation among molecular forms occurs only in certain geographical locations or during certain seasons. If that is true, then the current patchy distribution of the *kdr* mutation in the M form of *A. gambiae ss* is probably resulting from different events of introgression within *A. gambiae ss*. Introgression has probably occurred when *A. gambiae* M and S forms are found in sympatry at high densities, but where one form is predominant (Diabaté *et al.* 2003b). The *kdr* mutation distribution in relation with the dynamic of both molecular and chromosomal forms of *A. gambiae ss* in a wide scale including the ecological description has not been thoroughly investigated. Such a study may be helpful to

understand the ongoing process of the *kdr* mutation in *A. gambiae ss*.

The report of *kdr* in *A. arabiensis*, another major malaria vector in Africa, is of great significance at both fundamental and applied levels. Its potential impact on the efficacy of malaria vector control interventions will have to be evaluated and results taken into consideration by malaria control programmes. The very low frequency of this allele in both *A. arabiensis* and in the M form of *A. gambiae ss* suggests that these were recent phenomenon, but it may spread quickly in these mosquitoes in areas of intensive insecticide use. Further, characterization throughout the range distribution of the *A. gambiae* complex will be very informative to understand the history and the contrasting distribution of this new allele in mosquito field populations.

Acknowledgements

The authors are grateful to J. Etang, B. Bouchité, J. Vulule, R. Masendu, A. Ouari, S. Mamourou, S. Souleymane, K. Tahirou, M. Niama, O. Abdoulaye, G. Le Goff, P. Rabarison, J. Grunewald, R. Gopaul, N. Kimingar, M.A. Homeida, D. Benzerroug for help in mosquito collection. We thank M. Weill for her comments. Also highly appreciate the collaboration of the different villages where mosquitoes have been sampled. This investigation received financial assistance from the Institut de Recherche et de Développement (IRD), the Multilateral Initiative on Malaria (MIM) and from WHO/TDR (Task Force on Impregnated Materials, Project no. 970523).

References

- Black WC IV & Lanzaro GC (2001) Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae ss*: introgressive hybridization, adaptative inversions or recent reproductive isolation? *Insect Molecular Biology* **10**, 3–7.
- Brooke BD, Hunt RH, Koekemoer LL, Dossou-Yovo J & Coetzee M (1999) Evaluation of a polymerase chain reaction assay for detection of pyrethroid insecticide resistance in the malaria vector species of the *Anopheles gambiae* complex. *Journal of the American Mosquito Control Association* **15**, 565–568.
- Busvine JR (1951) Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* **168**, 193–195.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C *et al.* (1999a) 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**, 319–322.
- Chandre F, Darriet F, Manga L *et al.* (1999b) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bulletin of WHO* **77**, 230–234.

A. Diabate *et al.* **Kdr mutation in *Anopheles gambiae* complex**

- Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Be-sansky NJ & Finnerty V (1987) A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **37**, 37–41.
- Coluzzi M, Petrarca V & Di Deco MA (1985) Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll etino di Zoologia* **52**, 45–63.
- Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M *et al.* (2001) Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Molecular Biology* **10**, 9–18.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F *et al.* (2002a) The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *An. gambiae* sl in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**, 617–622.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F *et al.* (2002b) First report of the *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* **44**, 157–158.
- Diabaté A, Baldet T, Brengues C *et al.* (2003a) Natural swarming behaviour in the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **97**, 1–4.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F *et al.* (2003b) *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. *Journal of Medical Entomology* **40**, 195–198.
- Dong K (1996) A single amino acid change in the *para*-sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 93–100.
- Dong K & Scott JG (1994) Linkage of *kdr*-type resistance and the parahomologue sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 647–654.
- Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY & Yao K (1993) Resistance of *Anopheles gambiae* ss to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Annales de La Societe Belge de Medecine Tropicale* **73**, 291–294.
- Enayati AA, Vatandoost H, Ladonni H, Townson H & Hemingway J (2003) Molecular evidence for a *kdr*-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology* **17**, 138–144.
- Etang J, Manga L, Chandre F *et al.* (2003) Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology* **40**, 491–497.
- Fanello C, Akogbeto M & della Torre A (2000) Distribution of the knockdown resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**, 132.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I & Louis C (2001) Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Molecular Biology* **10**, 19–23.
- Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR & Caccone A (2001) Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* **10**, 25–32.
- Hamon J, Subra R, Sales S & Coz J (1968) *Présence dans le Sud-Ouest de la Haute Volta d'une population d'Anopheles gambiae 'A' résistante au DDT*. Organisation Mondiale de la Santé, WHO/Mal/68.657, 10 p.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J & Coetzee M (2000) *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology* **2**, 181–189.
- Jamroz RC, Guerrero FD, Kammlah DM & Kunz SE (1998) Role of the *kdr* and super-*kdr* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 1031–1037.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS *et al.* (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*Kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* **7**, 179–184.
- McCaffery AR, Holloway JW & Gladwell RT (1995) Nerve insensitivity resistance to cypermethrin in larvae of the tobacco budworm *Heliothis virescens* from USA cotton field populations. *Pesticide Science* **44**, 237–247.
- Milani R (1954) Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT: correlazione tra abbatimento e mortalità in *Musca domestica* L. *Rivista Parasitologia* **15**, 513–542.
- Ranson H, Jensen B, Wang X, Prapanthadara L, Hemingway J & Collins FH (2000) Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* **9**, 499–507.
- Scott JA, Brogdon WG & Collins FH (1993) Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **49**, 520–529.
- Taylor MFJ, Heckel DG, Brown TM, Kreitman ME & Black B (1993) Linkage of pyrethroid insecticide resistance to sodium channel locus in the tobacco budworm. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **23**, 763–775.
- Taylor C, Touré YT, Carnahan J *et al.* (2001) Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* **157**, 743–750.
- Touré YT, Petrarca V, Traoré SF *et al.* (1998) The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* **40**, 477–511.
- Triplet F, Touré YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G & Lanzaro GC (2001) DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology* **10**, 1725–1732.
- Weill M, Chandre F, Brengues C *et al.* (2000) The *kdr* mutation occurs in the mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology* **9**, 451–455.

A. Diabate *et al.* **Kdr mutation in *Anopheles gambiae* complex**

- Williamson MS, Denholm I, Bell CA & Devonshire AL (1993) Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics* **240**, 17–22.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA & Devonshire AL (1996) Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics* **252**, 51–60.
- Wondji C, Simard F & Fontenille D (2002) Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Molecular Biology* **11**, 11–19.

Authors

Abdoulaye Diabaté (corresponding author) and **Dabiré K. Roch**, Laboratoire de Parasitologie-Entomologie, IRSS/Centre Muraz, BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Tel.: (226) 97 01 02; Fax: (226) 97 04 57; E-mail: a_diabate@hotmail.com, dabire_roch@hotmail.com

Cécile Brengues, **Pierre Kengne** and **Jean-Marc Hougard**, Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles/Institut de Recherche pour le Développement-Montpellier, 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France. Tel.: 033 467041924; E-mail: cecile.brengue@mpl.ird.fr, pierre.kengne@mpl.ird.fr, jean-marc.hougard@mpl.ird.fr

Thierry Baldet, CIRAD-EMVT, Programme ECONAP, campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex, France. Tel.: 033 467593903; E-mail: thierry.baldet@cirad.fr

Martin Akogbeto and **Fabrice Chandre**, Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou/Institut de Recherche pour le Développement 06, BP 2604 Cotonou, Bénin. Tel.: 0229 330825; E-mail: akogbeto@leland.bj, fabrice.chandre@ird.fr

Frédéric Simard, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale/Institut de Recherche pour le Développement, BP 288 Yaoundé, Cameroun. Tel.: 0237 2232232; E-mail: out_of_cameroun@yahoo.fr

Pierre Guillet, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. E-mail: guilletp@who.ch

Janet Hemingway, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK. Tel.: 044 1517053107; E-mail: hemingway@liverpool.ac.uk

Article 3

Dabiré K.R., Fournet F. Ouari A., Cussac M, Pierre Meyer (2007). Persistence of larval habitats during dry period in urban areas of Ouagadougou, Burkina Faso. *J. Vect. Ecol.* (soumis)

Persistence of larval habitats during the dry period in urban area from Ouagadougou capital of Burkina Faso

Roch K. Dabiré ^{1*}, Florence Fournet², Ali Ouari¹, Maud Cussac², Pierre Meyer²

¹Institut de Recherche en Science de la Santé/Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso,
Burkina Faso

²Institut de Recherche pour le développement, IRD/UR178, BP 182, Ouagadougou, Burkina
Faso

*Corresponding author: IRSS/Centre Muraz
BP 390, Bobo-Dioulasso
Burkina Faso

e-mail: dabire_roch@hotmail.com

Abstract

In Ouagadougou town, annually few cases of malaria morbidity were referred to primary health offices during the dry period. To provide formal health data on the prevalence of malaria during this period, parasitological investigations were carried out in those areas where patients were originated. To better understanding this local malaria occurrence, entomological survey was also conducted in April 2006 both in peripheral areas and old-central quarters suspected to disseminate breeding sites sustaining malaria vectors development. Vectors were collected using CDC traps and indoors insecticide spraying. Larval prospect has been also done elsewhere water outdoor purposes have been found. The results revealed that adult anophelines were rare. Indeed less than five *Anopheles gambiae* s.l. was caught either by CDC traps or indoor spraying. However more than the half of breeding sites prospected were productive and were mainly located in the peripheral agglomerations. Among 115 larva of *An. gambiae* s.l. analysed by PCR, 59% (n=68) were identified as *An. arabiensis* vs 39% (n=45) as *An. gambiae* M molecular form. Two mosquitoes were analysed as *An. gambiae* S molecular form constituting less than 1% of total mosquitoes tested. These results showed clearly even though only few adults' mosquitoes were caught, that malaria vectors development was sustained throughout the year by some permanent or temporal human borne breeding sites. The vector adaptability during dry season and the urban malaria transmission were discussed.

Keywords: malaria vectors, dry season, larval habitats, *Anopheles gambiae* s.l., Ouagadougou, Burkina Faso.

Introduction

Nowadays urbanisation process is still experimenting in many African countries constituting the most profound challenge attempted in Africa. Generally the urban landscape management is expected to reduce the risk of vector development by reducing or fully eradicating suitable breeding sites decreasing thus malaria transmission. Indeed before any insecticide was invented, vector control meant mainly environmental management by drying up the swamps. This is not the case in urban agglomeration in Africa where some precarious peripheral quarters outstretched central modern buildings. The pattern of houses dispersion and landscape management is more rural than modern generating numerous semi permanent water purposes suitable to vectors development throughout the town. This increased the risk of vector proliferation in urban areas where theoretically malaria transmission must be neglect as considered by health policy as seasonal and rural affecting particularly children in rural regions. Because of its lower prevalence in urban agglomeration, populations living in town are exposed to a risk of severe malaria due mainly to a delayed acquisition of immunity against malaria affection. Indeed it can be ascribed that 200 millions of populations living in town in Africa corresponding to 25% of the African global population are exposed permanently to malaria infection (Keiser et al., 2004). Projecting the extension of urbanisation process, towards 2025 more than 50% of African population will live in towns (UNDP, 2002). The adaptation of malaria vectors to urban areas in Africa has been well documented and local circumscribed malaria transmission had been reported in many cities (Chinery, 1984; Robert et al., 2003). This situation could probably be ascribed to the house package made with unsuitable materials such as local mud and also to the failure of landscape management disseminating breeding sites favoring thus vector-human contact.

In the latest decade, vegetable growth has been expanded in the peripheral belts of many towns implementing concomitantly some multiple breeding sites such as degraded gutters or permanent human borne small purposes used to make brick or to water vegetable crops (Trappe & Zoulani, 1987; Khaemba et al., 1994; Robert et al., 1998). All these factors are contributing to maintain anophelines beyond to rainy period. In many African towns such as Dakar or Accra, anophelines had been observed surviving in wide range of habitats including polluted water source such as nitrate treated water dedicated to vegetable growing (Chinery, 1984, 1990; Robert et al., 1998). In opposite the presence of detergent in breeding water was associated in the reduction of anophelines development in Brazzaville and Maroua respectively in Congo and Cameroon (Trape & Zoulani, 1987; Barbazan et al., 1998).

In Burkina Faso, about 42% of global morbidity referred to health centers were ascribed to malaria affecting mainly 0-5 year's aged children. In fact this vulnerable group represented 66% of hospitalised patients and 70% of death were caused by malaria (DEP, 2004). However since 1980 towards, no study was dedicated to malaria transmission in Ouagadougou even though few papers had reported a heterogeneous malaria transmission cycle around some urban dams being rare in central districts (Rossi et al., 1986). In order to provide health database to be correlated to the urbanisation pattern in Ouagadougou, global health investigations including parasitological studies were conducted in 2004. From these prospects it had been clearly shown that malaria prevalence reached in mean 21% within the 0-12 year's old group varying greatly from one district to another. Indeed this prevalence was higher reaching 28% in peripheral quarters decreasing to 11% in the central districts (Assi et al., 2005). But entomological data sustaining this information were lacking. The aim of this work is to provide entomological data allowing to well document the database intended to map the distribution of disease according to urbanisation pattern.

This paper presents the preliminary results on the diversity of breeding sites disseminated throughout the town during April 2006 the hottest month of the dry season.

Material and methods

Study area features

Four districts were chosen for the entomological investigation because representing different houses physiognomy and urbanisation degree i) old urbanised district, ii) recent urbanised district with more space between house iii) peripheral condensed quarter and iv) peripheral more extended houses. These parameters were considered as indicators in the dissemination of breeding sites favourable to mosquito's development.

Dapoya is an old colonial district located in the centre of the town. It was characterised by condensed houses with numerous households. It is surrounded by large dam collecting polluted domestic water and also rainfalls. During dry season the partial evaporation offers fertile areas in the layer of the dam suitable to vegetable cropping which is intensively developed during this dry period. Breeding sites are mainly constituted by temporal purposes created by dam evaporation and by wells made in the dam bed to water vegetables. Some domestic water collection channels are disseminated across the district

Tanghin a former rural village near Ouagadougou is now connected to the urban agglomeration since 1980. It is limited in the North by some rural village and separated from Dapoya the center district by the same dam sharing the same type of breeding sites. In addition some spring- borne pools can be found numerously throughout the district offering water resource for mosquito development. As a relatively recent urban district, it shares some rural characteristics with the rural villages such as more spaces between houses and the existence of spring for water resource.

Yamtenga is a recent eastern peripheral non-urbanised district without formal limit with the urban districts and waiting for the urbanisation process. It is characterised by non space condensed houses built with local materials such as mud giving a precarious houses. One permanent and large swamp occurs in the centre of the district constituting the principal breeding site. In addition we find some domestic pool and some spring-borne pools disseminated through the agglomeration.

Zongo is a recent peripheral non-urbanised area connecting the town in the western side. It is characterised by dispersed houses. It is across by a natural accidental ravine. This ravine has been exploited to store water using to make bricks. These pools disseminated in the bed of the ravine conserved non-polluted water exposed to the sun. They constituted the main breeding sites permitting the development of anophelines. Some pools were also observed closing to spring points.

Mosquito adult collections

Collections were carried out between 20.00 and 06.00h inside and just outside of four houses throughout the expected productive breeding sites using CDC traps. Indoor resting females were caught by spraying insecticide aerosols into four houses closer to CDC sampling houses between 6h00 and 9h00 during four consecutive days. Female mosquitoes were knocked-down onto, and immediately retrieved from white sheets laid down on the floor of sprayed huts.

Larva collections

All water collections were numbered and prospected for the occurrence of mosquito larva identified based on larva standard morphological identification key. A productivity index estimated from 0 to 6 was assigned to each breeding site using dipping technique.

Their physical characteristics such as pH, temperature, size, depth, water colour and turbidity, sun exposure degree, presence of fauna, type of vegetation were described. Their location was also referenced using geographical positioning system (GPS). After anophelines larva were collected from positive breeding sites and stored into 1.5ml tube containing alcohol 70° dedicated to PCR analyse for species identification. Because of the occurrence of anophelines species other than *An. gambiae* s.l. suspected in Yamtenga large swamp and Zongo ravine, larva were sampled and bred in insectary until adult stage. The adults were lately identified using standard keys as described below.

Laboratory processing of mosquitoes

Anophelines were sorted and assigned to species based on morphological characters using standard identification keys (Gillies and Coetzee, 1987). As only one female was caught by indoor spay, it was not been necessary to test it for the presence of the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum*. When numerously collected per site, some larva were sub-sampled and processed by PCR for molecular identification of species of the *An. gambiae* complex and molecular forms (Scott et al., 1993; Favia et al. 2001).

Results

Prevalence of malaria affection

Except in Yamtenga district, malaria prevalence did not differ significantly between dry and rainy seasons but varying greatly between districts from 30.4% to 9%. In dry season the prevalence value was paradoxally low in Yamtenga district and the most highest in Zongo district ($P<0.05$). No difference was observed between the two urban districts, Dapoya and Zongo.

In opposite in rainy season, except the central urban district, malaria prevalence did not differ significantly between districts reaching a mean value of 30.4%. It was lower in Dapoya district with 10%.

Mosquito identification

No anophelines were caught by the CDC-traps irrespective of the district. Only two anophelines (one male and one female) were caught in indoor collection in the Yamtenga district. Exclusively mosquitoes belong the genus *Culex* were caught either by CDC traps or by indoor spraying whatever the district prospected. They were mainly dominated by *C. quinquefasciatus* representing 95.9%. *C. decens* reaching 4.1% were also collected only in indoor spraying from Zongo and Dapoya districts. Some sandflies belonging to the *Psychodidae* family such as *Phlebotomus dubosqui* and *Sergentomya* sp. were caught both in CDC and indoor spraying in all districts.

Mosquitoes emerged from the larva collection were also identified at adult stage. In addition to *An. gambiae* s.l., *An. pharoensis* and *An. rufipes* were identified among emerged adult's mosquitoes from Yamtenga swamp. All mosquitoes provided from Zongo and Dapoya emergency were identified at adult stage as *An. gambiae* s.l. Few *C. annulioris* had been also identified from Zongo polluted pools.

Productivity of breeding sites

No anophelines larva were found in all breeding sites prospected in the central district of Dapoya neither in vegetable growing wells nor in domestic channels where occurred only *Culex* sp. larva. In Tanghin district, anopheline larvae were only collected in brick holes closer to the dam surrounding the district. Globally anophelines larvae were mainly collected from the breeding sites located in the two peripheral non-urbanised areas.

In fact the permanent large polluted swamp and the brick-made ravine respectively in Yamtenga and Zongo districts provided all anophelines (emerged adults from larva collection) which were analysed in PCR. In these two areas, 87.5% of prospected breeding sites were found positive in anophelines (7/8).

PCR analysis

The single female caught at adult stage by CDC trap in Yamtenga has been identified as *An. gambiae* M form. Overall 115 mosquitoes were analysed in PCR either to characterise their species or their molecular form. From 44 mosquitoes issued of larva emergency in Yamtenga, 59% were *An. gambiae* M form vs 41 % as *An. arenbiensis*. No S molecular form was found in Yamtenga. In Zongo district *An. gambiae* s;l. population were rather dominated by *An. arabiensis* representing 76.6% than *An. gambiae* M form with 22.3%. Here only two individuals were analysed as S molecular form representing 3% of total anophelines found in this district. Globally, *An. arabiensis* (59.1%) were significantly more frequent ($\chi^2=12.2$, $df=1$ $P<0.001$) than *An. gambiae* ss (40.8%) mostly represented by *An. gambiae* M form (39.1%). *An. gambiae* S form represented only 1.74% of total anophelines found in Ouagadougou town.

Discussion

According to the parasitological values, malaria prevalence persists all long year in Ouagadougou an urban area. Moreover, these parasitological values did not differ greatly between the two seasons revealing that malaria transmission dynamic does not vary but increases slightly in intensity during the rainy season where the number of positive breeding sites increases significantly with the occurrence of rainy-borne sites. The persistence of malaria affection in this dry period could be partially explained by the survival of malaria vectors sustaining the transmission although they had been found in low abundance.

Indeed the vector composition did not vary greatly with that observed in rainy season because of the presence of the three vectors found during rainy season such as *An. arabiensis*, *An. gambiae* M form and even the S molecular form. The latest vector was known to be rainy-borne vector mainly adapted in wooded savannah rather than flooded and arid areas predominately colonised by *An. arabiensis* and *An. gambiae* M form respectively (Ref). Many studies have shown that *An. gambiae* S molecular form survived the dried conditions by living in hibernation but such mechanisms are not well known (Minakawa et al., 2001). The persistence of this molecular form during April the most dry and hot month of the year seems atypical and the first question could be arisen is how can S molecular form adapt to dry season? If any, what mechanism sustains this adaptation as chromosomal arrangements had been pointed out to direct adaptation to the environment set-ups (Touré et al., 1998). In fact the larva of S form had been collected in sites like rainy-borne breeding sites in peripheral area which ecology was similar to humid savannah. Furthermore, *An. arabiensis* was logically the most frequent vector found during this dry season followed by *An. gambiae* M molecular form. Here these two vectors were adapted in polluted breeding sites such as permanent swamp from Yamtenga which received domestic wastes. Thus the survival of malaria vectors during the dry season re-launches the problematic of urban malaria pointed out since the last decade (Robert et al., 1998; Keating et al., 2003). Globally either in Central Africa or in West Africa, the persistence of larval habitats during dry season was ascribed to the presence of human borne activities such as brick making and peri-urban agricultural activities. These human borne activities created artificial breeding sites which unluckily passed across the drying period maintaining thus vector development predominately in the peripheral districts. This landscape modification will probably modify pattern of malaria transmission which control is as far as focused preferentially toward rural populations.

This situation will probably progress in the ongoing year as many African towns are permanently in urbanisation process creating human activities favourable to mosquitoes development whereas the global socioeconomic of the populations from these precarious districts did not improve.

This landscape modification must be monitored and controlled by a system of planning permission to prevent vector proliferation.

Acknowledgment

Authors are grateful to the people of the four districts of Ouagadougou for their helpful assistance during this study.

Table 1: Malaria prevalence (%) throughout Ouagadougou districts in 2004.

Districts	Dry season	Rainy season	Mean
Yamtenga	9.0 [5.8-12.2] a	24.6 [19.5-29.8] a	16.4 [13.4-19.5] a
Zongo	30.4 [24.2-36.5] b	32.6 [27.2-38.1] a	31.7 [27.6-35.7] b
Dapoya	18.6 [11.6-25.7] ab	10.4 [6.6-14.2] b	13.0 [9.6-16.5] a
Tanghin	21.5 [16.0-27.0] b	34.0 [28.1-39.9] a	28.2 [24.1-32.3] b

Data with the same letter are not significantly different, P>0.05

Table 2: CDC traps and indoor insecticide spray collections.

Mosquitoes genus	Zongo		Dapoya		Tanghin		Yamtenga	
	CDC	Indoor	CDC	Indoor	CDC	Indoor	CDC	Indoor
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Culex</i> sp	14	32	217	32	16	40	253	19
Others	3	14	0	1	6	3	14	0

Table 3: Repartition of *An. gambiae* s.l. and molecular M and S forms of *An. gambiae* s.s. throughout the districts.

Districts	<i>An. gambiae</i> S	<i>An. gambiae</i> M	<i>An. arabiensis</i>	Total
Dapoya	0	0	0	-
Zongo	2 (3)	15 (22.3)	50 (76.6)	67
Tanghin	0	4 (100)	0	4
Yamtenga	0	26 (59)	18 (41)	44
Total	2 (1.74)	45 (39.1)	68 (59.1)	115

References

1. Amerasinghe FP, Konradsen F, van der Hoek W, Amerasinghe PH, Gunawardena JPW, Fonseka KT, Jayasinghe G., 2001. Small irrigation tanks as a source of malaria mosquitoes vectors: a study in North Central Sri-Lanka. *IWMI Research Report 57*. International Water Management Institute, Colombo.
2. Assi SB, Meyer PE, Rogier C, Fournet F, Salem G, Henry MC, 2005. Social and spatial disparities of malaria in Ouagadougou (Burkina Faso). *XVIe International Congress for Tropical Medicine and Malaria*, Marseille, France, 11-15 Sept. 2005.
3. Barbazan P, Baldet T, Darriet F, Escaffre H, Haman Djoda H, Hougard JM, 1998. Impact of treatments with *Bacillus sphaericus* on *Anopheles* populations and the transmission of malaria in Maroua, a large city in a savannah region of Cameroon. *J Am Mosq Contr Assoc*, 14:33-39.
4. Beier J.C., Asiago C.M., Onyango F.K. and Koros J.K., 1988. Elisa absorbance cut-off method affects malaria sporozoite rate determination in wild Afrotropical *Anopheles*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2:259-264.
5. Chinery WA, 1984. Effects of ecological changes on the malaria vector *Anopheles funestus* and the *Anopheles gambiae* complex of mosquitoes in Accra, Ghana. *J Trop Med Hyg* 87: 75–81.
6. Chinery WA, 1990. Variation in frequency in breeding of *An. gambiae s.l.* and its relationship with in-door adult mosquito density in various localities in Accra, Ghana. *J Trop Med Hyg*, 87, 75-81.
7. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sideén-Kiamos I, Louis C, 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Mol Biol* 10 : 5-3.
8. Gillies MT & Coetze M, 1987. A Supplement to Anophelinae of Africa South of the Sahara. South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
9. Gillies MT & De Meillon B, 1968. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
10. Keating J, Macintyre K, Mbogo C, Githeko A, Regens JL, Swalm C, Ndenga B, Steinberg LJ, Kibe L, Githure JI, Beier JC, 2003. A geographic sampling strategy for studying relationships between human activity and malaria vectors in urban Africa. *Am J Trop Med Hyg* 68: 357–365.

11. Keiser J, Utzinger J, Caldas de Castro M, Smith TA, Tanner M, Singer BH, 2004. Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control. *Am J Trop Med Hyg* 71 (suppl 2), 118-127.
12. Khaemba BM, Mutani A, Bett MK, 1994. Studies on the anopheline mosquitoes transmitting malaria in a newly developed highland urban area: a case study of Moi University and its environs. *East Afr Med J* 71: 159–164.
13. Minakawa N., Githure J.I., Beir J.C., Yan G., 2003. Anopheline mosquito survival strategies during the dry period in western Kenya. *J. Med. Entomol.*, 388-392.
14. Robert V, Awono-Ambene HP, Thioulouse J, 1998. Ecology of larval mosquito, with special reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in market-garden wells in the urban area of Dakar, Senegal. *J Med Entomol* 35: 948–955.
15. Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, Beier JC, 2003. Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 68: 169–176
16. Rossi P, Belli A, Mancini L, Sabatinelli G, 1986. Enquête entomologique longitudinale sur la transmission du paludisme à Ouagadougou, Burkina Faso. *Parassitologia*, 28 : 1-15.
17. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 49, 520-529.
18. Trape JF, Zoulani A, 1987. Malaria and urbanization in central Africa: the example of Brazzaville. Part II: Results of entomological surveys and epidemiological analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 10–18.
19. UNDP, 2002. *World Urbanization Prospects: the 2001 Revisions*. New York: Population Division Department of Economics and Social Affairs of the United Nations.
20. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y *et al.* 1987. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for Elisa development. *Bull. WHO*, 65: 39-45.

Article 4

Dabiré K.R., Diabaté A., Agostinho F., Alves F., Faye O., Manga L., Baldet T. (2008)
Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (kdr) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 101(2): 119-123

ENTOMOLOGIE MÉDICALE

Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (kdr) in Guinea-Bissau, West Africa.

K.R. Dabiré (1), A. Diabaté (1, 2), F. Agostinho (3), F. Alves (3), L. Manga (4), O. Faye (5) & T. Baldet (6)

(1) Laboratoire de parasitologie et d'entomologie médicale, IRSS/Centre Muraz BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. E-mail : dabire_roch@hotmail.com

(2) Laboratory of malaria and vector research / NIAID / NIH, Rockville, Washington, États-Unis d'Amérique.

(3) Laboratoire national de santé publique, Bissau, Guinée Bissau.

(4) OMS AFRO, Brazzaville Congo.

(5) OMS, Bureau regional, Ouagadougou, Burkina Faso / Université Cheikh-Anta-Diop, Dakar, Sénégal.

(6) CIRAD UPR16, Campus de Baillarguet Montpellier, France.

Manuscript n° 3109. "Entomologie médicale". Reçu le 3 mai 2007. Accepté le 25 septembre 2007.

Résumé : Distribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* et du gène de résistance aux pyrèthrinoides (mutation kdr) en Guinée-Bissau, Afrique de l'Ouest.

Une étude entomologique a été réalisée en 2002 dans quatre localités couvrant différents faciès écologiques de la Guinée Bissau : Buba Tombao (forêt), Gabu (savane), Cacheu (mangrove) et Bissau (urbain) afin i) d'étudier la distribution des membres du complexe *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) ii) d'évaluer le statut de résistance de ces vecteurs du paludisme aux insecticides (perméthrine 0.75%, DDT 4%) et enfin iii) de rechercher la présence et la distribution de la mutation kdr au sein de ces populations.

Les femelles de moustiques adultes issues de captures matinales intérieures ont été testées suivant les procédures OMS (kit de bio essai et papier imprégné) afin d'évaluer leur statut de résistance aux insecticides. Les spécimens testés ont été identifiés et caractérisés pour la présence de la mutation kdr par PCR.

En Guinée Bissau, dans les localités étudiées, le complexe *An. gambiae* est dominé par *An. gambiae* s.s. (avec les deux formes moléculaires S et M représentées) vivant en sympatrie sur le littoral avec une faible proportion d'*An. melas*. Les populations d'*An. gambiae* s.s. exposées aux deux insecticides se sont révélées sensibles quelle que soit leur provenance. La mutation kdr Leu-Phe a été détectée en de très faibles fréquences seulement dans deux localités situées respectivement en zone urbaine (Bissau) et en savane (Gabu). Cette mutation est présente uniquement dans la forme moléculaire S à Gabu (avec une fréquence allélique de 0.14) et dans les deux formes moléculaires M et S à Bissau avec des fréquences alléliques respectives de 0.06 et de 0.02.

Ces résultats suggèrent que les populations d'*An. gambiae* s.s., vecteur le plus fréquent du paludisme en Guinée Bissau, demeurent encore sensibles aux pyrèthrinoides et au DDT 4%. Ce statut de sensibilité ainsi que la fréquence des gènes de résistance tel que le kdr doivent être surveillés dans le futur particulièrement dans les zones urbaine et de savane soumises à une utilisation intensive d'insecticides.

Summary:

An entomological survey conducted in 2002 in Guinea Bissau aimed i) to study the distribution of the members of *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae) throughout four ecological areas extended from mangrove to savannah ii) to evaluate the insecticide susceptibility status of these malaria vectors exposed to permethrin 0.75% and DDT4%, and finally iii) to investigate the occurrence and the spread of the Leu-Phe knock down resistance (kdr) gene associated with pyrethroid and DDT resistance within these vector populations.

Adult female mosquitoes issued from indoor morning collections were tested using WHO procedures, test kits and impregnated papers to assess their insecticide susceptibility status. Tested specimens were identified by PCR assays and characterized for the kdr gene.

Malaria vectors were mainly dominated elsewhere by *An. gambiae* s.s. (both S and M molecular forms) living in sympatry with low proportion of *An. melas* in the littoral. *An. gambiae* s.s. tested populations were fully susceptible both to permethrin 0.75% and to DDT 4% irrespective to their location and ecotypes. The Leu-Phe kdr mutation was detected in low frequency only in two sites respectively urban (Bissau) and Guinea-savannah (Gabu) areas. It occurred only in the S molecular form in Gabu (at the frequency of 0.14) and both in the S and M molecular forms in Bissau at the frequency of 0.06 and 0.02 respectively. These results suggested that the populations of *An. gambiae* s.s., the most frequent malaria vector in Guinea Bissau, still remain cross-susceptible to pyrethroids and DDT. This susceptibility status and the frequency of resistance mechanism such as the kdr mutation must be monitored in the future particularly in the urban and savannah areas with continuous and intensive use of insecticides.

Anopheles gambiae s.s.
gène kdr
sensibilité aux insecticides
Buba Tombao
Gabu
Cacheu
Bissau
Guinée Bissau
Afrique de l'Ouest

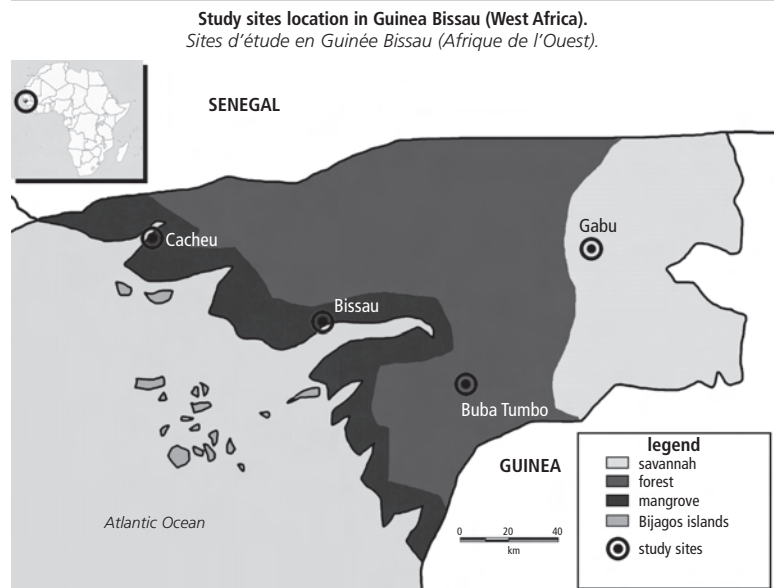
Anopheles gambiae s.s.
kdr gene
insecticide susceptibility
Buba Tombao
Gabu
Cacheu
Bissau
Guinea Bissau
West Africa

Introduction

Malaria is one of the most serious vector-borne diseases affecting millions of people, mainly in Africa. More than 90% of the deaths, resulting from malaria occurred particularly in children aged 1-5 (30). Despite the huge burden and the absence of a viable vaccine for the moment, few tools are available to control this disease. Current policy options include direct treatment of patient with anti-malarial drugs together with preventive method aiming at reducing human vector-contact by indoor sprays as well as using mainly insecticide-treated nets (ITNs). However big efforts have been made in many African malaria-endemic countries such as “Roll Back Malaria” (RBM) partnership, but only less than 2% of children sleep under ITNs (31). Indeed the ITNs were considered as one of the major tools in the global control of malaria focused on the intervention targeted at adult anophelines. Its efficacy was proved through many studies mentioning the reduction of mortality in the target populations such as in 1-5 year-old children (5, 11). Unfortunately knock-down resistance (*kdr*) conferring resistance to pyrethroids and cross resistance to DDT as first reported in *Anopheles gambiae* s.s. populations in Côte d’Ivoire (12), has been observed, spreading out mainly in West Africa from Mali to Nigeria (2, 3, 4, 8, 29, 33). This mutation resulting from one single point mutation (Leucine TTA to Phenylalanine TCA) was probably associated prior with the intensive use of DDT and lately with pyrethroids, used for crop protection particularly in cotton areas and in lower proportion to the domestic use of insecticides against nuisance (4, 8). The Leu-Phe *kdr* mutation is detected at a high frequency in the M molecular form of the *An. gambiae* s.s. populations present on the littoral of West Africa especially in Benin and Côte d’Ivoire (Chandre, com. pers.). Inland, in the savannah zone, the *kdr* mutation predominates in the S molecular form of *An. gambiae* being rare either in the M molecular form or in *An. arabiensis* populations (9). Although some studies indicated that ITNs remained efficient to carry out vector control in *kdr*-pyrethroid resistance area (6, 18) some decrease of ITNs efficiency has been observed recently among *kdr*-M molecular forms of *An. gambiae* s.s. in coastal Benin (23).

If some countries in West Africa, due of the implementation of scientific and technical logistics, are able to provide information on malaria transmission, distribution of members of the *An. gambiae* complex and vector resistance status including distribution of the *kdr* gene, little is known in other countries such as Guinea Bissau, Liberia or Sierra Leona facing social and political trouble. In the context of generalized spread of pyrethroid-treated nets (ITNs) and general use of pyrethroids in cotton crops, it is crucial to better know the specific identity and resistance status of vector populations in each country and ecological zones. This study initiated by the African Network in Vector Resistance (ANVR) supported by WHO, was dedicated to the investigation of the occurrence and spread of Leu-Phe *kdr* resistance in poor investigated countries of West Africa such as Guinea Bissau where little is done in malaria vector characterization and control. We report here the distribution of the members of *An. gambiae* complex and the spread of the Leu-Phe *kdr* gene within these vector populations across different ecological zones in Guinea Bissau.

Figure 1.



Materials and methods

Location of sampling sites

Guinea Bissau is a small country located in Western Africa, bordering the North Atlantic Ocean, between Guinea and Senegal (12°N, 15°W). Its total area covers 36,120 km² with 1,470,000 inhabitants. This country is swampy along its western coast and low-lying further inland. Four sites corresponding to different ecological set-ups including urban area, mangrove, forest and Guinea-savannah were sampled from September to October 2002 (figure 1).

Bissau capital of Guinea Bissau (15°28'05"W, 11°54'32"N) is an urban agglomeration located in the littoral and surrounded by mangroves and flat lowlands affected by the daily tides. Rice growth is the main agricultural activity and uses few insecticides for crop protection.

Cacheu (16°13'01"W, 12°14'56"N) is also located in the littoral mainly dominated by the mangrove. Here rice is also the main agricultural speculation. Buba (14°50'35"W, 11°39'50"N) is located in the forest with manioc and maize as the predominant crops.

Gabu (14°18'07"W, 12°11'56"N) located in the eastern Guinea-savannah region of the country is dominated by groundnuts and millet growth with some extended fruit trees garden. Cotton is also grown in this area involving the use of pyrethroids replacing DDT formerly used for crop protection.

The country is located in the tropical Guinean climatic zone, generally hot and humid. There are two distinct seasons: monsoonal-type rainy season (June to November) with south-westerly winds; dry season (December to May) with north-easterly harmattan winds. The average annual rainfall ranges from 2,000 mm in the south forest coast to 1,000 mm in the north-east savannah. Malaria is wide spread and holoendemic in the country with a peak of transmission at the end of the rainy season (October-November). A preliminary study has shown that the *Plasmodium* index in children 2-9 years old in villages of the north-western littoral zone in Guinea-Bissau ranged at the end of the rainy season between 44% and 79%. The malaria vectors in the studied villages were identified as *An. gambiae* s.s. and *An. melas*. Both species belonging to the *An. gambiae* complex are anthropophilic, endophilic and

endophilic, and transmit efficiently human malaria parasites (19, 25).

Mosquito collection

Mosquitoes were collected from 4 sites at the end of the rainy season (September and October 2002). Because of the difficulties met during the study period due mainly to the rainfall diluting the larva populations and the swampy environment of most areas (about 20% of inlands were flooded during the rainy season), indoor resting adult females were collected very early in the morning (5h-7h) from human dwellings using manual aspirators and torches. They were kept alive and brought to the National Laboratory of Public Health in Bissau where the insecticide tests were carried out. We noted that un-impregnated mosquito bednets of varying quality, but usually of poor condition, were used in all houses across all the ecological zones by most of the people. This use is directly linked to the highest mosquito nuisance felt by the inhabitants more particularly at this time of the year. It could facilitate the use of ITNs against malaria transmission at a large scale in the country.

Insecticide susceptibility test

The insecticide susceptibility tests were performed on wild age-undetermined females composed of gravid and half gravid anophelines collected in bedrooms as described above using 0.75% permethrin (cis:trans 25:75) impregnated filter papers as recommended by WHO (32). Only mosquitoes from Bissau were tested to DDT 4% to assess pyrethroid/DDT cross resistance because the number of mosquitoes from other localities was too weak and did not permit to do a bioassay. After the 1-h exposure, the mosquitoes were maintained on 10% sucrose solution and final mortality recorded after 24h. Specimens were preserved individually on desiccated silica gel and identified post-mortem as members of *An. gambiae* s.l. using morphological keys (16, 17).

In addition to mortality recovery period, insecticide knockdown effects were recorded after 10, 20, 30, 40 and 60-minute exposures. 56% knockdown times (KDT₅₀ and KDT₉₅) were estimated. They were assigned mortality status, defined as resistant if they showed less than 90% mortality with DDT 4% and less than 95% mortality with permethrin 0.75%. Samples were then kept individually on desiccated tubes after morphological identification (16) for PCR analysis.

To control the quality of the test performed directly with wild age-undetermined mosquitoes in field conditions, the same impregnated papers were tested in the laboratory of Centre Muraz (Burkina Faso) using both standard age (2-3 day old non blood-fed females) and age-undetermined females of the "Kisumu" reference strain of *An. gambiae* s.s. This strain has been maintained in the insectarium at the Centre Muraz since 1999 and is 100% susceptible to the diagnostic concentrations of the insecticide used.

PCR analysis

Females exposed to permethrin 0.75% and also to DDT 4% (only in Bissau) and conserved on silicagel tubes were pooled per mortality status. An average of 30 mosquitoes including 10 from the alive group (if any) out of 20 dead mosquitoes

Table I.

Insecticide susceptibility test on *An. gambiae* s.l. females originated from the four ecological zones in Guinea-Bissau and from Kisumu reference strain including standard age and age-undetermined females (WHO tubes).

Test de sensibilité aux insecticides des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. issues des quatre zones écologiques de la Guinée Bissau et de la souche de référence Kisumu sur âge standard et âge indéterminé (tubes OMS).

study sites	Permethrin 0,75%				DDT 4%			
	n	KDT ₅₀ (min)	KDT ₉₅ (min)	M% status	n	KDT ₅₀ (min)	KDT ₉₅ (min)	M% status
Bissau	102	10	20	97% S	93	55	Nd	95% S
Urban area								
Cacheu littoral	121	11	18	100% S	-	-	-	-
Gabu savannah	101	12	22	96% S	-	-	-	-
Buba Tumbo forest	106	12	22	98% S	-	-	-	-
Kisumu «standard age»	105	17	29	98% S	97	25	41	100% S
Kisumu «age-undetermined»	82	14	27	97% S	76	23	44	99% S

n: number of mosquitoes tested (*An. gambiae* s.l.); KDT_{50/95}: exposure time in minute during that 50% or 95% of individuals exposed to insecticide were knocked down; M%: percentage of mortality recorded 24h after 1h exposure status: s = susceptible (90%<M≤100%)

were randomly sub-sampled among the samples described above and tested by PCR to i) identify the species within the *An. gambiae* complex (23), ii) characterise the molecular forms (M or S) within *An. gambiae* s.s. (14) and finally iii) to detect the Leu-Phe *kdr* mutation (20).

Results

Insecticide susceptibility test

The mortality in control group non-exposed (both Kisumu and wild mosquitoes) to insecticide was consistently less than 5% therefore no Abbott correction was necessary during the analysis. The results of the insecticide susceptibility tests showed that 430 mosquitoes collected across the four localities were susceptible to the diagnostic dosage of permethrin 0.75% with a mortality rate ranging from 97% to 100% (table I). The KDT₅₀ and KDT₉₅ values did not differ significantly from those of the laboratory *An. gambiae* susceptible "Kisumu" strain ($p>0.05$). The mosquitoes from Bissau tested to DDT 4% were also susceptible with a mortality rate reaching 95%. However, the KDT₅₀ value was higher than that of the Kisumu strain ($p<0.05$). The test carried out in the Centre Muraz laboratory with the same impregnated papers used for the field evaluation in Guinea Bissau showed that both laboratory 2 to 5 day-old unfed females and age-undetermined females from Kisumu reference strain were also fully susceptible without any difference between the mortality rates ($p>0.05$).

Distribution of *An. gambiae* complex species and molecular forms

Over all 130 mosquitoes fully composed of females exposed to permethrin 0.75% were tested by PCR. The collection was a mix of the molecular M and S forms except in Cacheu (mangrove zone) where *An. melas* were also found at the frequency of 23%. No specimens of *An. arabiensis* were identified in these samples. Indeed in Bissau the urban area and Buba the forest one, the M molecular form predominated reaching respectively 70% and 90%. In contrast both in Cacheu and Gabu respectively in mangrove and Guinea-savannah areas the S molecular form predominated reaching in proportion 54% and 73%. No M/S heterozygote was found.

Table II.

Species and molecular forms identification and frequency of knockdown resistance (Leu-Phe kdr) mutation among specimens of *An. gambiae* s.l. tested in the four ecological zones in Guinea-Bissau.

Identification des espèces et des formes moléculaires du complexe *Anopheles gambiae* et distribution du gène *kdr* dans les quatre zones écologiques de la Guinée Bissau.

study sites	<i>An. gambiae</i> s.l.		<i>An. gambiae</i> S form		<i>An. gambiae</i> M form		<i>An. melas</i>	
	n	Fkdr	%	Fkdr	%	Fkdr	%	Fkdr
Bissau urban area	30	0,03	30	0,06	70	0,02	-	-
Cacheu mangrove	30	0	54	0	23	0	23	0
Gabu Guinea-savannah	30	0,10	73	0,14	27	0	-	-
Buba Tumbo forest	30	0	10	0	90	0	-	-
total	120	0,03	41,7	0,07	52,5	0,008	5,8	

n: number of females tested in PCR; Fkdr: allelic frequency of *kdr* mutation based on the formula $(2RR+1RS)/(2(RR+RS+SS))$; %: percentage of species and molecular forms of *An. gambiae* complex tested in PCR

Distribution of *kdr* gene

On the whole the Leu-Phe *kdr* gene was found at low frequency averaging 0.07 in the S form and 0.008 in the M form and occurred only in two localities, Bissau (urban) and Gabu (Guinea-savannah). No *kdr* was detected in *An. melas* specimen. The relatively highest frequency (0.14) of *kdr* was exclusively observed in the S molecular form at Gabu where also the relative low mortality rate has been obtained with permethrin 0.75%. The two other specimens exhibiting the *kdr* genotype were found in the urban area from Bissau at the frequency of 0.03. No *kdr* gene was found in the mangrove and forest sites (table II).

Discussion

Our study confirmed that *An. gambiae* s.s. was the most abundant malaria vector in Guinea Bissau and revealed that the two molecular forms (M and S) lived in sympatry in varying frequencies. Indeed the S molecular form was found largely distributed in the Guinea-savannah and the littoral mangrove but in low proportion in the forest and the littoral-urbanised areas dominated by the M form. *An. melas* was found only in one site (mangrove) because it breeds preferentially in salt water. In West and Central African littoral, both *An. melas* and *An. gambiae* s.s. constituted efficient vectors of *P. falciparum* (2). In extreme environment (mangrove swamps), *An. melas* could be the exclusive present malaria vector (10, 22). Its frequency decreases classically either in urban environment even in littoral as in Bissau city, particularly during the rainy season (15), or inland in forest and savannah zones. Previous studies conducted in the urban area of Bissau have already revealed the predominance of *An. gambiae* s.s. and the rarity of *An. melas* indoors (24, 25). Overall these two species were known to transmit malaria in Guinea Bissau (18).

No *An. arabiensis* was found in our samples due mainly to the sampling period occurring during the rainy season. Indeed in the past, Petrarca et al. (26) collected few individuals of this species only in dry season. In Sudanese savannahs of West Africa *An. arabiensis* is well spread living in sympatry with *An. gambiae* s.s. (7, 20) being the most abundant in Sahelian zone. This malaria vector adapted to dried environment is relatively rare in Guinea-savannah zone. Its absence in Gabu in the present study can be due also to the low sample size and to the sampling methods ie indoor morning collections as *An. arabiensis* is less endophagic and endophilic than *An. gambiae* s.s.. These preliminary results on the malaria vector distribution in Guinea-Bissau agree with reports from

other comparable parts of West Africa. It reflects the situation at the end of the rainy season when mosquito populations and malaria transmission usually peak in tropical regions. Although the proportion of mosquitoes collected during the dry season should be lower, the frequencies of *An. gambiae* M form, *An. gambiae* S form and *An. melas* in each of the ecological zone should be comparable (3). Results of insecticide susceptibility test indicate that the malaria vector populations in Guinea Bissau still remain fully susceptible to pyrethroids and also to DDT although the KDT₅₀ and KDT₉₅ values obtained with the latter in Bissau suggest a decrease of DDT susceptibility in *An. gambiae* s.s.

populations. Even though the test was done directly on wild age-undetermined females these results agreed with the findings from a relatively recent study in this country reporting the efficacy of ITNs on malaria transmission reported by Jaenson et al. (19).

The molecular detection of the Leu-Phe *kdr* mutation indicated that the *kdr* gene is present for the moment at low frequency maintaining the susceptibility status revealed by the bioassay. Indeed compared to the *kdr* frequencies reported from other West African countries ranging from 80 to 95% such as in Côte d'Ivoire, Benin and Burkina Faso where *An. gambiae* s.s. populations have shown resistance to pyrethroids (1, 4, 8, 13), the frequency of this gene in Guinea Bissau is very low. The finding of *kdr* gene in the M molecular form was in accordance with reports from other countries in West Africa mentioning the occurrence of this gene in the M molecular form both in littoral and inland due to genetic introgression from the S molecular form (2, 9). But the presence of the *kdr* mutation both in urban and Guinea-savannah zones in Guinea-Bissau suggest the possibility of its large-scale spreading in the coming years potentially in the cotton growing savannah areas where the use of pyrethroids is relatively intensive. Although it was a very transversal survey, this study provides basic information enable to contribute to vector control management. That is crucial in a global context where debates on large the distribution of ITNs and re-introduction of DDT for indoor spraying (30) are hold to implement malaria vector control. More extensive studies of vectors are required to support the malaria control programme in Guinea-Bissau including accurate species identification, their behaviour and their role played in malaria transmission.

Acknowledgements

This study was conducted thanks to the financial support of the WHO/Afro through ANVR network. We thank the WHO office in Bissau, the PNLN of Ministry of Health of Guinea Bissau for their logistic help during the survey. We are particularly grateful to the PNLN staff for their greatest and helpful assistance facilitating the bioassay performed in the PNLN laboratory.

Références bibliographiques

1. AKOGBETO M & ROMARO R – Infectivité d'*Anopheles melas* vis-à-vis du *P. falciparum* dans le milieu côtier lagunaire du Bénin. *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, 92, 57-61. (<http://www.pathexo.fr/pages/bull-somm/1999-T92/1999-1.html>)
2. AKOGBETO M & YAKOUBOU S – Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull*

- Soc Pathol Exot*, 1999, **92**, 123-130. (<http://www.pathexo.fr/pages/bull-somm/1999-T92/1999-2.html>)
3. AWOLOLA TS, OYEWOLE IO, AMAJOH CN, IDOWU ET, AJAVI MB *et al.* – Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Tropica*, 2005, **95**, 204-209.
 4. CHANDRE F, MANGUIN S, BRENGUES C, DOSSOU-YOVO J, DARRIET F *et al.* – Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ*, 1999, **77**, 230-234.
 5. D'ALESSANDRO U, OLALEYE BO, MCGUIRE W, LANGUEROCK P, BENNETT S *et al.* – "Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of a treated bednet programme". *Lancet*, 1995, **345**, 479-483
 6. DARRIET F, N'GUESSAN R, KOFFI A, KONAN L, DOANNIO JM, CHANDRE F & CARNAVALE P – Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC. *Bull Soc Pathol Exot*, 2000, **93**, 131-134. (<http://www.pathexo.fr/pages/bull-somm/2000-T93/2000-2.html>)
 7. DIA I, DIOP T, RAKOTOARIVONY I, KENGNE P & FONTENILLE D – Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean Zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol*, 2003, **40**, 279-283.
 8. DIABATE A, BALDET T, CHANDRE F, AKOGBETO M, DARRIET F *et al.* – The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *An. gambiae* sl in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, **67**, 617-622
 9. DIABATÉ A, BRENGUES C, BALDET T, DABIRÉ KR, HOU-GARD JM *et al.* – The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health*, 2004, **9**, 1267-1273
 10. DIOP A, MOLEZ JF, KONATE L, FONTENILLE D, GAYE O *et al.* – Role of *Anopheles melas* Theobald (1903) on malaria transmission in a mangrove swamp in Saloum (Senegal). *Parasite*, 2002, **9**, 239-246.
 11. EISELE TP, LINDBLADE KA, WANNEMUEHLER KA, GIMING JE, ODHIAMBO F *et al.* – Effect of sustained insecticide-treated bed net use on all-cause child mortality in an area of intense perennial malaria transmission in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 2005, **73**, 149-156
 12. ELISSA N, MOUCHET J, RIVIERE F, MEUNIER JY & YAO K – Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann Soc Bel Med Trop*, 1993, **73**, 291-294
 13. FANELLO C, PETRARCA V, DELLA TORRE A, SANTOLAMAZZA F, DOLO G *et al.* – The pyrethroid knock down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 2003, **12**, 241-245.
 14. FAVIA G, LANFRANCOTTI A, SPANOS L, SIDEÉN-KIAMOS I & LOUIS C – Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 2001, **10**, 15-23. (doi: 10.1046/j.1365-2583.2001.00236.x)
 15. FONSECA LF, DI DECO MA, CARRARA GC, DABO I, DO ROSARIO V & PETRARCA V – *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) near Bissau City, Guinea Bissau, West Africa. *J Med Entomol*, 1996, **33**, 939-945.
 16. GILLIES MT & COETZEE M – A supplement to the *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). *Publications of the South African Institute for Medical Research*, 1987, **55**. SAIMR, Johannesburg.
 17. GILLIES MT & DE MEILLON B – *The Anophelinae of Africa South of the Sahara*. South Africa Institute of Medical Research, Johannesburg, South Africa, 1968.
 18. HENRY MC, DOANNIO JMC, DARRIET F, NZEYIMANA I & CARNEVALE P – Efficacité des moustiquaires pré-imprégnées de perméthrine Olyset Net® en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoides. II. Évaluation parasitoclinique. *Méd Trop*, 1999, **59**, 355-357.
 19. JAENSON TG, GOMES MJ, BARRETO DOS SANTOS RC, PETRARCA V, FORTINI D *et al.* – Control of endophagic *Anopheles* mosquitoes and human malaria in Guinea Bissau, West Africa by permethrin-treated bed nets. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, **88**, 620-624
 20. LEMASSON JJ, FONTENILLE D, LOCHOUARN L *et al.* – Comparison of behaviour and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a sahelian area of Senegal. *J Med Entomol*, 1997, **34**, 396-403.
 21. MARTINEZ-TORRES D, CHANDRE F, WILLIAMSON MS, DARRIET F, BERGE JB *et al.* – Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 1998, **7**, 179-184. (doi: 10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x)
 22. MORENO M, CANO J, NZAMBO S, BOBUAKASI L, BUATICHÉ JN, ONDO M, MICHA F & BENITO A – Malaria panel assay versus PCR: detection of naturally infected *Anopheles melas* in a coastal village of Equatorial Guinea. *Malar J*, 2004, **6**, 20. (doi: 10.1186/1475-2875-3-20)
 23. N'GUESSAN R, CORBEL V, AKOGBETO M & ROWLAND M – Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, **13**, 199-206. (<http://www.cdc.gov/eid>)
 24. PALSSON K, JAENSON TGT, DIAS F, LAUGEN TL & BJORKMAN A – Endophilic *Anopheles* Mosquitoes in Guinea Bissau, West Africa, in Relation to Human Housing Conditions. *J Med Entomol*, 2004, **41**, 746-732.
 25. PALSSON K, PINTO J, do ROSARIO VE & JAENSON TG – The palpal ratio method compared with PCR to distinguish between *Anopheles gambiae* s.s. and *An. melas* from Guinea Bissau, West Africa. *Acta Trop*, 1998, **15**, 70, 101-107.
 26. PETRARCA V, CARRARA GC, DI DECO MA & PETRANGELI G – The *Anopheles gambiae* complex in Guinea Bissau. *Parassitologia*, 1983, **25**, 29-39.
 27. SCOTT JA, BROGDON WG & COLLINS FH – Identification of single specimens of *An. gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, **49**, 520-529.
 28. SNOW RW, CRAIG M, DEICHMANN U & MARSH K – Estimating mortality and disability due to malaria among non-pregnant population. *Bull World Health Organ*, 1999, **77**, 624-640.
 29. TRIPET F, WRIGHT J, CORNEL A, FOFANA A, McABEE R *et al.* – Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (*kdr*) in Mali, West Africa, and resistance evidence of its emergence in the Bamako form *Anopheles gambiae* ss. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, **76**, 81-87.
 30. WALTER JR & AIMIN C – Health risks and benefits of bis (4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *Lancet*, 2005, **366**, 763-773.
 31. WORLD HEALTH ORGANIZATION – *Scaling-up Insecticide-Treated Netting program in Africa*. Geneva, Switzerland. World Health Organ, 2002, Publication, WHO/CDS/RBM, 2002, 43p.
 32. WORLD HEALTH ORGANIZATION – *Test procedures for insecticides resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides treated surfaces*. WHO/CDS/MAL, 1998, 12p
 33. YAWSON AE, MCCALL PJ, WILSON MD & DONNELLY MJ – Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med Vet Entomol*, 2004, **18**, 372-377

Article 5

Dabiré K.R., Diabaté A., Djogbenou L., Baldet T., Ouari A., N'Guessan R., Ouédraogo J.B., Costantini C., Hougard J.M., Chandre F. (2007). Dynamics of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and occurrence of *ace.1* mutation in Vallée de Kou, a rice growing area from Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (soumis)

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Dynamics of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and occurrence of ace.1 mutation in Vallée de Kou, a rice growing area from Burkina Faso

Article Type: Short Communication

Section/Category:

Keywords: *Anopheles gambiae* ss, molecular forms, kdr, ace.1R, malaria transmission

Corresponding Author: Dr Kounbobr Roch DABIRE, Doctorate 3e cycle

Corresponding Author's Institution: IRSS/Centre Muraz

First Author: Kounbobr Roch DABIRE, Doctorate 3e cycle

Order of Authors: Kounbobr Roch DABIRE, Doctorate 3e cycle; Abdoulaye Diabaté, PhD; Luc Djobgenou, PhD student; Thierry Baldet, PhD; Ali Ouari, Bachelor; Raphaël Nguessan, PhD Student; Jean-Bosco Ouédraogo, PhD; Carlo Costantini, PhD; Jean-Marc Hougard, PhD; Fabrice Chandre, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: An entomological survey carried out in rice growing area during the rainy season from July to December 2005 aimed i) to update the distribution and the circumsporozoite infection rate of the two molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* ii) to update the frequency of the Leu-Phe kdr mutation within these forms and finally iii) to investigate the occurrence of ace.1 mutation.

Mosquitoes collected by indoor manual collection and by human landing catches were counted and morphologically identified. Species and molecular forms of *An. gambiae*, ace.1R and Leu-Phe kdr mutations were determined using PCR techniques. The presence of the circumsporozoite protein of *P. falciparum* was determined using ELISA.

An. gambiae populations were dominated by the M form. However the S form occurred in relative important proportion towards the end of the rainy season with a maximum peak in October at 51%. The sporozoite rates were similar among the two forms towards the end of the rainy season. The frequency of kdr mutation in the S form reached a fixation level while it is still spreading in the M form. Furthermore, the ace.1R mutation occurred predominately in the S form and has just started spreading in the M form. The two mutations occurred concomitantly both in M and S populations.

These results revealed that this rice growing area that formerly was colonised by M susceptible populations is progressively colonised by S molecular living in sympatry with the former. This changes the distribution pattern of insecticide resistance gene frequency with an apparition of two resistance concomitantly in the same populations. Their impact on the use of insecticide treated materials in this area is discussed.

Bobo-Dioulasso, February 7, 2007

Object: Submission of a manuscript in the Transactions

Dear Editor-in -Chief,

We are willing to resubmit the manuscript TRSTMH-D-06-00321 entitled "Dynamics of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and occurrence of *ace.1* mutation in Vallée de Kou, a rice growing area from Burkina Faso" to be reconsidered for publication as a short communication. We guess that this paper will meet the convenience of the editorial requirement and the journal topic.

Best regards

DABIRE Kounbobr Roch

21 **Abstract**

22 An entomological survey carried out in rice growing area during the rainy season from
23 July to December 2005 aimed i) to update the distribution and the circumsporozoite
24 infection rate of the two molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* ii) to update the
25 frequency of the Leu-Phe *kdr* mutation within these forms and finally iii) to investigate
26 the occurrence of *ace.1* mutation.

27 Mosquitoes collected by indoor manual collection and by human landing catches were
28 counted and morphologically identified. Species and molecular forms of *An. gambiae*,
29 *ace.1^R* and Leu-Phe *kdr* mutations were determined using PCR techniques. The presence of
30 the circumsporozoite protein of *P. falciparum* was determined using ELISA.

31 *An. gambiae* populations were dominated by the M form. However the S form occurred in
32 relative important proportion towards the end of the rainy season with a maximum peak in
33 October at 51%. The sporozoite rates were similar among the two forms towards the end of
34 the rainy season. The frequency of *kdr* mutation in the S form reached a fixation level
35 while it is still spreading in the M form. Furthermore, the *ace.1^R* mutation occurred
36 predominately in the S form and has just started spreading in the M form. The two
37 mutations occurred concomitantly both in M and S populations.

38 These results revealed that this rice growing area that formerly was colonised by M
39 susceptible populations is progressively colonised by S molecular living in sympatry with
40 the former. This changes the distribution pattern of insecticide resistance gene frequency
41 with an apparition of two resistance concomitantly in the same populations. Their impact
42 on the use of insecticide treated materials in this area is discussed.

43

44 **Key-words:** *Anopheles gambiae* ss, molecular forms, *kdr*, *ace.1^R*, malaria transmission.

45 **Introduction**

46 Malaria transmission in tropical Africa is mainly dominated by *Anopheles gambiae*
47 complex, including *An. gambiae* as the most anthropophilic vector transmitting malaria in
48 sub-Saharan Africa (Cootzee et al. 2000). Formerly considered as a single species, it began
49 earlier to accumulate genetic heterogeneity's. In the 1980s, cytogenetic studies based on
50 chromosomal inversion arrangements found five incipient chromosomal forms. The
51 suspected role of these inversions was to restrict gene flow among the forms and to provide
52 adaptation to different ecological settings (Coluzzi et al. 1985, 2002). These chromosomal
53 forms appeared more or less genetically isolated in the field, presumably through
54 prezygotic barriers since viable and fertile hybrids have been obtained in the laboratory (Di
55 Deco et al. 1980; Persiani et al. 1986; Touré et al. 1998). However, cytogenetic analysis is
56 not a precise way to evaluate the degree of hybridization between forms because of the
57 presence of cryptic 'heterokaryotypes'. It was observed that Mopti and Savanna cytotypes
58 dominated *An. gambiae* population structure in Burkina Faso (della Torre et al. 2001).
59 Recent studies based on molecular markers such as X-linked ribosomal DNA suggested the
60 existence of only 2 entities within *An. gambiae* referred to as M and S molecular forms
61 (Favia et al. 2001). So far in Burkina Faso and Mali, Mopti and Savanna chromosomal
62 forms coincide with M and S molecular forms (della Torre et al. 2001). As a malaria major
63 vector with high level of polymorphism, *An. gambiae* has been a subject of many
64 investigations such as bio-ecology and insecticide resistance studies (Touré et al. 1994,
65 della Torre et al. 2005; Diabaté et al. 2002, 2003). In Burkina Faso studies of the
66 distribution of chromosomal inversion arrangements twenty years ago (Robert et al. 1985),
67 showed that the Mopti chromosomal form was dominating in Vallée du Kou, a rice
68 growing area in the West region of Burkina Faso cultivated since 1970. Molecular based
69 identification of *An. gambiae* ss populations in this area showed two decades later that the

70 M molecular form predominated throughout the year, although with some temporal
71 variations (Baldet et al. 2003; Diabaté et al. 2002). The S molecular form occurred in low
72 frequency until the end of the rainy season, where it peaked at 24% (Diabaté et al. 2003) as
73 found previously by Robert et al. (1985). A similar pattern was found in Mali (Touré *et al.*
74 1994, 1998). More recently a frequency of 40% S form was observed (Diabaté et al. 2006).
75 But this study gave no frequencies of the two forms throughout the malaria transmission
76 season. The distribution of the Leu-Phe *kdr* mutation, the most spread pyrethroid resistance
77 gene in West Africa, has been found almost only in the S form with a high allelic
78 frequency (0.96) compared to just 0.012 in M form (Diabaté et al. 2002, 2003). Nowadays,
79 it is not evident that either the population structure of *An. gambiae* ss or their pyrethroid
80 resistance level is still remaining at the same level because of the changing of agricultural
81 practises (cotton and vegetable cropping) and the increasing of man made breeding sites
82 such as puddles throughout the village. Furthermore it has been mentioned in the same area
83 the occurrence of G119S mutation named *ace.1^R* allele, another resistance mechanism
84 against organophosphates and carbamates insecticides. This was just highlighted in S
85 populations even though in low level (Diabaté pers. comm.). The objective of this work
86 was to gather recent information on the dynamic of these two forms with particular
87 attention to resistance mechanisms. This information is crucial for a proper evaluation of
88 new insecticides or vector control tools expected to be involved in malaria control and
89 resistance management.

90 Sound

91 **Materials and methods**

92 **Study site**

93 Vallée du Kou (4°25' W, 11°24') is a rice-growing valley comprising 7 villages, with a
94 total of 4,470 habitants surrounded by wooden savannah. The rainy season extends from

95 June to October and the dry season from November to May. The Kou River is a permanent
96 source of irrigation water and there are two rice crops per year from July to November and
97 from January to May. Few insecticides are used on the rice, but huge amount of
98 insecticides are used extensively in cotton fields' located exterior to the rice fields. During
99 the last two years, some producers grew vegetables involving intensive use of insecticides.
100 Mosquito collection has been carried out in the village numbered as seven (VK7), which is
101 located in the end of the rice fields. Some cotton and maize fields were just surrounded this
102 village.

103 The irrigation system and rice fields provide almost year-round mosquito breeding. High
104 densities of *An. gambiae* ss (up to 200 bites/person/night) are recorded during the rainy
105 season (Baldet et al., 2003). The two molecular forms M and S occur in sympatry. The *kdr*-
106 based mechanism conferring resistance to pyrethroids and DDT predominates in the S
107 form (Diabaté *et al.* 2002, 2003).

108

109 **Mosquito collections**

110 Anopheline mosquitoes were sampled during the rainy season from June to December
111 2005 mainly by indoor manual collection for resting mosquitoes and by human landing
112 catches for evaluating sporozoite rate. Two days consecutive human landing catches were
113 ensured in August and October by informed-volunteers who were provided
114 chemoprophylaxis prevention during mosquitoes sampling period. They were also
115 provided free and rapid treatment when suspected clinical signs of malaria according to
116 WHO-recommended regimen on the basis of fever and detectable *Plasmodium falciparum*
117 parasitemia two months after the end of mosquito collections. These two periods
118 correspond to the peak of the M form in July/August and the S form in October. Catches
119 were carried out between 20.00 and 06.00 h inside and just outside of four houses of each

120 village. Indoor resting females were caught manually by aspiration. Anopheles caught by
121 human landing were dissected and the head and thorax preserved to infer infectious status
122 by ELISA. Legs were removed and kept dry for PCR tests. Residual resting indoor females
123 were collected regularly in four houses early in the morning by manual aspirators during
124 four consecutive days per month within the village. Indoor collections carried out from
125 July to December were used to establish the temporal or seasonal of the two forms and
126 their resistance status by PCR.

127

128 **Laboratory processing of mosquitoes**

129 Anophelines were sorted and assigned to species based on morphological characters using
130 standard identification keys (Gillies and De Meillon, 1968). Females referring to *An.*
131 *gambiae* complex were processed by PCR concomitantly for identification of species and
132 molecular forms of *An. gambiae* (Scott et al. 1993; Favia et al. 2001). The Leu-Phe *kdr*
133 based resistance was identified by PCR from genomic DNA following Martinez-Torres et
134 al. (1998). The G119S mutation was detected by PCR according to Weill et al. (2004). The
135 head-thoraces of anopheline females issued from human landing catches were tested for
136 the presence of the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum*, the major
137 malarial parasite occurring in the study area, by enzyme-linked immunosorbent analysis
138 (ELISA) following the protocol of Wirtz et al. (1987). Samples of July and August were
139 pooled together for ELISA process.

140

141 **Results**

142 **Dynamic of the molecular forms**

143 Overall 330 mosquitoes were analysed for identification of species and molecular forms
144 (figure 1). *An. arabiensis* was absent. Both M and S molecular forms occurred. The overall
145 frequency of the molecular M form was higher than that of the S form reaching

146 respectively 69% vs 31% but the dynamic of these forms throughout the collecting period
147 showed some monthly varying frequencies. Except in July and August the frequencies of
148 these two forms did not vary significantly ($F=2.5$, $df=1$, $P=0.16$). Indeed in July all
149 mosquitoes analysed ($n=32$) were only of M form. The S form started appearing toward the
150 end of August in a low frequency of 4% (3/84) reaching a maximum peak of 51% (38/75)
151 in October equalling the frequency of M form (Fig. 1).

152

153 **Sporozoite rate**

154 The sporozoite rate calculated only from two sampling sets (July/August and October) did
155 not reach 9.09% and was supported both by the M and the S molecular forms (table 1). In
156 July and August no specimens of S form were found within the mosquitoes collected so the
157 sporozoite rate was assured logically only by M form reaching 1.7%. In October
158 corresponding to the peak of the S form the sporozoite rate was equally supported by the
159 two forms averaging 3.07% without no significant difference between the two forms
160 ($P=0.31$)

161 .

162

163 **Distribution of the *kdr* gene**

164 An average of 40 mosquitoes were analysed monthly for the *kdr* mutation (Table2). The
165 *kdr* mutation occurred in both of the M and S forms with varying frequencies in the M
166 form. *Kdr* frequency was higher in S form irrespective the month ($\chi^2=6.14$, $df=2$, $P<0.02$)
167 reaching 0.98 in mean and ranged from 0.96 to 1 throughout its occurrence period. The
168 mean frequency of this mutation in the form M was 0.13 and ranged from 0 to 0.32
169 throughout the six months. Only eight mosquitoes from the M form were identified in
170 September and November as homozygous RR for this mutation vs. 15 hybrids RS overall.

171 In the S form the homozygous RR predominated irrespective the month contributing thus
172 to achieve the fixation process of this allele in the populations of S form.

173

174 **Distribution of the *ace.1^R* gene**

175 60 mosquitoes were analysed for the *ace.1* mutation from September and October 2005,
176 corresponding to an average of 30 mosquitoes per month (Table 3). This mutation was
177 detected in low frequency in the M form with one heterozygous RS per month
178 corresponding respectively to a mean frequency of 0.033. Conversely in the S form, this
179 mutation occurred in a relative high frequency comparing to the M form ($\chi^2= 6.75$, $df=1$,
180 $P<0.01$) with an equal mean of 0.36 per month. One individual among the S form was
181 detected as a homozygous RR for this mutation in September. In the S form, except two
182 individuals characterised as SS, all individuals carrying *ace.1* mutation had also the *kdr*
183 mutation, but in heterozygous status. Only one individual was homozygous *ace.1^I/ace.1^I*
184 both for *kdr^r/kdr^r*. Inversely in the M form, the two individual detected as heterozygous
185 *ace.1^I/ace.1^S* for the *ace.1* mutation were homozygous *kdr^S/kdr^S* for the *kdr* mutation.

186

187 **Discussion**

188 In Burkina Faso up today chromosomal and molecular forms of *An. gambiae* ss are tightly
189 correlated (della Torre et al. 2001; 2005). Formerly Robert et al. (1986) studying the
190 distribution of *An. gambiae* ss cytotypes in the rice growth area of Vallée du Kou revealed
191 the predominance of the Mopti chromosomal form. With the advanced progress in
192 molecular genetic, this distribution has been updated by Diabate et al. (2002) pointing out
193 the predominance of the M molecular form corresponding to the Mopti chromosomal form.
194 However the occurrence of the S molecular form (corresponding to the Savanna
195 chromosomal form) has been observed toward the end of the rainy season. Our results

196 followed the same pattern of distribution, but the overall proportion of S form has
197 increased further reaching a maximum of 51% vs. 24% at the same period in 2000 (Diabaté
198 et al., 2003; Baldet et al., 2003). This increase could probably due to human activities
199 creating new habitats for the S population in this area. These activities include especially
200 house building using bricks of banco and muddles taken out from the soil. That increases
201 the number of rain filled breeding sites such as pits, ponds and puddles that are suitable to
202 S form development throughout the village. The changing in the vector population
203 structure may presumably increase the malaria transmission level. Even though the vector
204 population was dominated by M form throughout the year, this form had a low sporozoite
205 rate because of the low parity rate observed within its population (Baldet et al. 2003). The
206 socio-economic conditions of the populations are considerably deteriorated because of the
207 population growth and the bad transaction of rice crops. Thus some torn bednets which do
208 not provide full protection to mosquitoes biting can be observed mostly elsewhere in this
209 area.

210 The *kdr* mutation seemed to not vary (96%) in the S form compared to its frequency in
211 2000 (96%, Diabaté et al. 2002, 2003). This increase is greater in the M form where it was
212 three fold more higher than 2000. Indeed in 2000, *kdr* mutation occurred in low frequency
213 (1.2%) in the M form and all individuals analysed were only heterozygous (RS). Now, the
214 number of homozygous (RR) in the M form is increasing that enhances the overall
215 frequency of this mutation.

216 The high frequency of this gene presumably due to the use of insecticides to protect cotton
217 crop situated at the limit of rice fields. Insecticides may drift or washed from the cotton
218 area to the rice field during heavy rains. During the two past years some rice producers
219 also grew vegetables using insecticides. These applications of agricultural insecticides
220 added to the domestic use of particularly coils and together exerted a selective pressure on

221 the mosquito populations and may thus explain the increase of insecticide resistance genes
222 emergency in that area.

223 Our results showed that *ace.1* mutation is mostly present in S form and less frequent in the
224 M form. This finding suggests that *ace.1* mutation is evolving along the same pathway as
225 *kdr* mutation in this area. Indeed six years ago, *kdr* mutation was found occurring only in
226 the S form and some investigations towards the end of 1999 failed to identify the *kdr*
227 mutation in M molecular form (Diabate et al., 2002). This difference tended to persist
228 because of the strong reproductive barriers between the two forms relevantly pointed out
229 by some authors (Fanello et al. 2000; Gentile et al. 2001; della Torre et al. 2001). In 2000,
230 *kdr* mutation was identified for the first time in M form at a very low frequency (about
231 2%). This *kdr* mutation probably originated in populations of the s form S and may now
232 increase in the M form. As for *kdr*, the *ace.1* mutation occurred probably prior in S form
233 populations and may acquire by M form through introgressive hybridisation. With the
234 exposure of M populations to insecticide pressure, this gene began to spread within this
235 form. Similarly to the *kdr* mutation, this gene will probably increases in frequency within
236 M populations in the coming years. Additional studies are crucial to determine precisely
237 the origin of this gene among M form populations. Alternatively the cost of this gene
238 remains to be evaluated.

239 The reported change in malaria vectors population structure is mainly driven by human
240 activities and will call for modified malaria control strategies. The increasing of S form
241 proportion and the emergence of *ace.1* mutation concomitantly with Leu-Phe *kdr* mutation
242 among the same populations of *An. gambiae* ss is an atypical ecological pattern for an
243 irrigated rice growing area. Even though pyrethroids or carbosulfan treated nets still
244 achieved a good vector control either in experimental huts (Darriet et al. 2000, Asidi et al.
245 2005) or in field trial (Doanio et al. 2003, Henry et al. 2003) our results suggested called

246 for a trial for an insecticidal control. Indeed recent paper from Nguessan et al. (2007) in
247 southern indicated a failure of pyrethroids to control wild *An. gambiae*. In such way, our
248 results provided useful information for field trial as experimental huts dedicated to
249 insecticidal trials were implemented there.

250

251 **Acknowledgements**

252 This study was financially supported by a grant of TDR/RCS re-entry project n°A30821
253 and a partial contribution of Sumitomo® via Anopheles Biology and Control (ABC)
254 network. We are grateful to villagers of Vallée de Kou who made this study possible. We
255 thank Professor Martin Akogbeto of the Centre Entomologique de Cotonou for his support
256 and Joseph Chabi and Sébastien Koudé for their help with the genotyping. Finally we wish
257 to thank Dr O. Skovmand for its helpful suggestions and corrections made to the
258 manuscript.

259

Supplementary Files

[Click here to download Supplementary Files: ref.doc](#)

Table 1: Circumsporozoite protein rate calculated by ELISA for *Plasmodium falciparum* tested in July/August and October 2005 from indoor/outdoor human landing catches

Molecular form of <i>An. gambiae</i>	July/August		October	
	Nb tested	CSPR	Nb tested	CSPR
M	84 (1)	1.19 [0.03-6.46]	54 (1)	1.85 [0.05-9.89]
S	0	-	11 (1)	9.09 [0.23-41.28]

() number of CSP-positive mosquitoes

Table 2: Monthly variation in the frequency of the *kdr* mutation and the relative frequency of the two molecular forms of *Anopheles gambiae* ss

	S form ^a	<i>Kdr</i> ^b	F(R) ^c	M form ^a	<i>Kdr</i> ^b	F(R) ^c
July	0	-	-	32	31SS	0
August	3	3RS	0.50	23	3RS+20SS	0.065
	11.5%			88.5%		
September	23	22RR+1RS	0.98	36	3RR+3RS+30SS	0.125
	39.0%			61.0%		
October	29	25RR+3RS	0.95	33	2RS+31SS	0.04
	46.8%			53.2%		
Nov/December	28	24RR+3RS	0.91	37	5RR+7RS+25SS	0.23
	43.1%			56.9%		
Total	83	71RR+10RS	0.94	161	8RR +15RS+ 137SS	0.097
	34.0%			66.0%		

^a Number of mosquitoes analysed, percentage of molecular forms of *An. gambiae*

^b Genotype of the *kdr* mutation

^c Allele frequency of *kdr* mutation in mosquitoes analysed

Table 3: Variation in the frequency of the *aceI* mutation and the relative frequency of the two molecular forms of *Anopheles gambiae* in September and October 2005

	S form ^a	<i>aceI</i> ^R ^b	F(R) ^c	M form ^a	<i>aceI</i> ^R ^b	F(R) ^c
September	11	1RR+6RS+4SS	0.36	18	0RR+1RS+17SS	0.028
	38%			62%		
October	15	0RR+11RS+4SS	0.36	14	0RR+1RS+13SS	0.036
	52%			48%		
Total	26	1RR+17RS+8SS	0.36	32	0RR+2RS+30SS	0.033
	45%			55%		

^a Number of mosquitoes analysed, percentage of molecular forms of *An. gambiae*

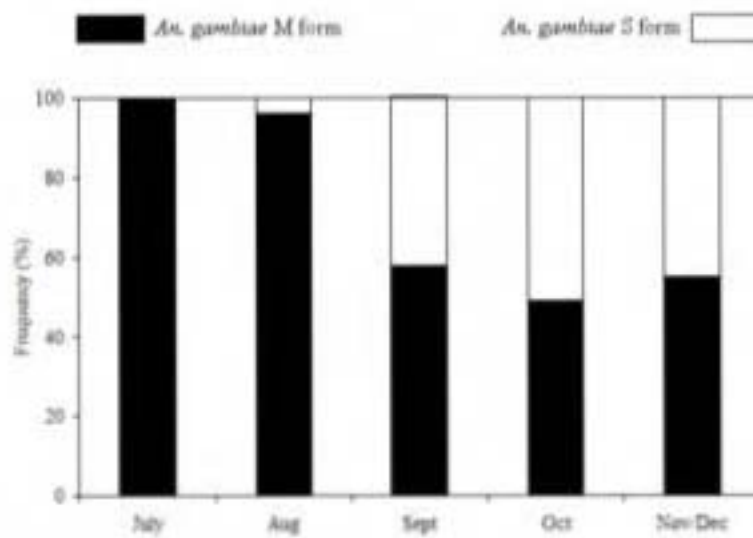
^b Genotype of the *kdr* mutation

^c Allele frequency of *aceI*^R mutation in mosquitoes analysed

Supplementary Files

[Click here to download Supplementary Files: leg.doc](#)

Figure 2



Supplementary Files

[Click here to download Supplementary Files: Revision notes.doc](#)

Article 6

Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Kengne P., Simard F., Costantini C., Chandre F., Hougard J.M., Baldet T. (2007). Distribution of pyrethroid-DDT cross resistance and high inlands spreading of *kdr* mutation among the M molecular form of *Anopheles gambiae* s.s. from Burkina Faso (West Africa). *Malaria Journal* (soumis)

The distribution of pyrethroid-DDT cross resistance in *Anopheles gambiae* s.l. and high inlands spreading of *kdr* mutation among populations of the M molecular form from Burkina Faso (West Africa)

Dabiré K.R.¹, Diabaté A.^{1,5}, Namountougou M.¹, Toé H.¹, Djogbenou L.², Kengne P.³,
Chandre F.², Baldet T.⁴

¹IRSS/Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

²CREC/IRD, Cotonou, Bénin

³Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN)-IRD, 911 Agropolis, BP 5045,
34032 Montpellier Cedex 1, France.

⁴IRD/CIRAD/CREC, Cotonou, Bénin.

⁵Laboratory of Malaria and Vector Research /NIAID/ NIH, Rockville, Washington, USA

Abstract

Transversal surveys carried out from August to October 2006 at 21 localities across different climatic zones of Burkina Faso allowed to update i) the distribution of the members of *Anopheles gambiae* s.l., ii) their resistance status to DDT and pyrethroids and iii) the distribution of Leu-Phe *kdr* associated to pyrethroids/DDT cross-resistance. Globally *An. arabiensis* predominated in the Sudan-sahelian zone overlapping the M form in the central region. The M form predominated from the North extending to the central region in the Sudan-sahelian zone. The S form was distributed following a gradient West-East being more concentrated in the Sudan-savannah zone from the West region. The distribution of the pyrethroids-DDT cross resistance followed also a geographical gradient. Indeed *An. gambiae* s.s. populations were mainly resistant both to permethrin and DDT in the Sudan-savannah being more susceptible in the Sudan-sahelian and sahelian sites. *An. arabiensis* was fully susceptible to permethrin and DDT. Except in Orodara an old cotton growth site, all populations of *An. gambiae* s.l. tested were fully susceptible to deltamethrin whatever their provenance. The frequency of *kdr* ranged from 0.4 to 0.97 in the Sudan-savannah was lower in the Sudan-sahelian and sahelian zones. Compared to the year 2000, the frequency of *kdr* mutation increased greatly in the M molecular form reaching high frequencies (0.6) extended to the Sudan-sahelian zone where it was formerly absent. It increased also in *An. arabiensis* populations even though recorded in one locality averaging a mean value of 0.3 whereas it was formerly reported only from one specimen in 2000. The role of agricultural use of insecticides on the spread of *kdr* gene in *An. gambiae* s.l. in Burkina Faso was confirmed.

Key words: *An. gambiae* s.l., *kdr*, pyrethroid-DDT, cross-resistance, Burkina Faso

Introduction

The two latest decades, the main effort in malaria vector control was focused on the use of insecticide treated nets (ITNs). Indeed ITNs reduced mortality and morbidity in the target populations such as 1-5 old children and pregnant women throughout the malaria endemic areas in Africa (Umberto *et al.*, 1995; Binka *et al.*, 1996; Nevill *et al.*, 1996). To better implement the vector control program, African countries in 2000 committed themselves to provide by the end of 2005 prompt and effective treatment and ITNs for 60% of the people at highest risk of malaria through Roll Back Malaria initiative (WHO, 2002). Such initiatives were expected to be perpetrated in each country by national program against malaria (PNLP) in collaboration with many non governmental organisations (NGOs). But particularly in West Africa, the Leu-Phe- *kdr* mutation conferring pyrethroids /DDT cross resistance phenotype within *An. gambiae* s.l. was observed extending throughout Côte d'Ivoire (Elissa *et al.*, 1993; Chandre *et al.*, 1999), Benin (Akogbeto *et al.*, 1999), Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2002), Mali (Fanello *et al.*, 2003; Tripet *et al.*, 2007), Ghana (Yawson *et al.*, 2005) and Nigeria (Awolola *et al.*, 2005). Even though ITNs still achieve a good control in these pyrethroids-resistant areas (Henry *et al.*, 2005), some decreases of their efficacy have been observed recently within *kdr*-M molecular forms of *An. gambiae* s.s. in coastal Benin (N'Guessan *et al.*, 2007). With respect to progress on prevention, the number of ITNs distributed increased 10-fold during the past 3 years in more than 14 African countries. So, it appears crucial to manage in long terms the efficacy of these ITNs including the long lasting insecticide impregnated nets (LLINs).

Recently many African countries have reverted to the DDT use with apparent successes in their malaria control efforts. In this context, our work is dedicated to provide useful information by updating the resistance status of *An. gambiae* s.l. in Burkina Faso (West Africa) early revealed by Diabaté *et al.* (2002).

These previous works pointed up the spreading of pyrethroids -DDT cross resistance essentially in the populations of the S molecular form from the sustained cotton areas with high level of *kdr* mutation in the populations of the S molecular form. However recent funding revealed also the occurrence of *kdr* mutation either in the M molecular form or in *An. arabiensis* even though in very low frequencies (Diabaté *et al.*, 2004). The ultimate aim of the present study is to follow-up the spreading of the *kdr* mutation within the populations of *An. gambiae* s.l. at the country scale in order to provide accurate information to the national program against malaria (PNLP).

Materials and methods

2.1. Study sites

Burkina Faso covers three ecological zones, ranging from Sudan savannah zone open to arid savannah zone (Sudan-sahel) extends throughout much of the central part and aridland (Sahel) in the north. The northern part experiences a dry season of 6-8 months. Rainfall is heaviest in the south with a relatively short dry season. The varied ecological conditions are reflected in the different systems of agriculture practiced throughout the country, from arable to pastoral. All ecological zones support the existence of *Anopheles* species, the vector of malaria parasites. Thus, malaria is widespread in the country.

2.2. Collection and identification of mosquitoes

Because larvae samples can be biased with respect to *kdr* (there may be high levels of consanguinity among larvae from the same pool), special effort was made to collect adult anopheles using indoor insecticide spray-sheet catches for global malaria vector distribution in 21 sites dispersed out in the 3 eco-climatic zones.

To assess the distribution of the status of resistance to pyrethroids throughout the country anophelines larvae were sampled by transversal collections during the rainy season from September to October 2006 following in 10 sites averaging two sites per climatic zone (table 1). This period related more precisely the use of insecticides in agriculture and also the malaria transmission period. Larvae were collected in each locality from breeding sites such as gutters, tires and swallow wells, pool and standing waters. They were brought back to insectary and reared to adulthood. Anophelines species were identified morphologically using standard identification keys of Gillies and Cootzee (1987).

Insecticide susceptibility test

Susceptibility test was performed on 2-3-day-old females using WHO standard vertical tubes protocol (WHO, 1998). Three insecticide-impregnated papers were used: permethrin 1% (cis:trans = 25:75), deltamethrin 0.05% and DDT 4% (just to assess cross resistance with pyrethroids). To check the efficiency of the papers, the wild mosquitoes were tested against a control reference laboratory colony of *An. gambiae* s.s. called “Kisumu” 100% susceptible to the diagnostic concentration of the three insecticides used. After 1 h exposure, mosquitoes were transferred into insecticides free tubes and maintained on sucrose solution.

Final mortality was recorded 24 h after exposure. The threshold of susceptibility was fixed at 90% for DDT 4% and 95% for the other two active ingredients (WHO, 1998). Dead and survival mosquitoes were grouped separately and stored on silicagel after formally identified as *An. gambiae* s.l. using morphological keys as described above.

PCR analysis

Both mosquitoes used in bioassay and collected by indoor spraying were processed by PCR for species identification and molecular characterisation of M and S forms of *An. gambiae* s.s.

according to Scott *et al.* (1993) and Favia *et al.* (2001) respectively. The *kdr* mutation was amplified and sequenced according to Martinez-Torres *et al.* (1998).

Results

Mortality rates

The insecticide susceptibility test showed varying levels of resistance among mosquitoes sampled from each ecological zone the mortality rate in control (Kisumu strain) was less than 5% so no Abbott correction was necessary during analysis. *An. gambiae* s.l. populations were globally resistant to permethrin 1% and DDT 4% in all sites of the Sudan-savannah zone and in one site of the Sudan-sahelian zone indicating cross-resistance between DDT and pyrethroid insecticide in these localities. In contrast they were fully susceptible in Sudan-sahelian and Sahelian zones free of cotton cropping. The permethrin/DDT resistance distribution overlapped mainly in the areas where the S molecular form predominated. Except in one old cotton cropping area in the Sudan-savannah zone (Orodara), *An. gambiae* s.s. was susceptible to deltamethrin 0.05% irrespective the ecological provenance (figure 1). No *An. arabiensis* had survived to the three insecticides used in bioassay irrespective of their provenance

Distribution of the *kdr* mutation among *An. gambiae* s.l.

In a total of the 21 localities sampled in Burkina Faso, the molecular S and M forms of *An. gambiae* ss were detected in 17 sites and *An. arabiensis* in 10 sites. The distribution of species and molecular forms varied greatly in the country scale following eco-climatic zones. The S molecular form predominated in the Western Sudan-savannah zone whereas the M molecular form occurred more frequently in the Sudan-Sahelian and Sahelian zones with a gradient decreasing from North-East to South-West.

The central areas were characterised by an overlapped repartition of the two forms S and M of *An. gambiae* together with *An. arabiensis* (figure 2). Indeed the M form lived in sympatry with the S form being more adapted in semi-arid and flooded areas of the Sudan-sahelian and Sahelian zones.

Except to the Sahelian site, the *kdr* mutation was found in the two other eco-climatic zones at varying frequencies (figure 2). The mutation was significantly most spread in the S populations of *An. gambiae* from the western Sudan-savannah zone ($\chi^2=25.1$, $df=2$, $P<0.001$) reaching a maximum frequency of 0.97 decreasing to 0.6 in the central Sudan-sahelian zone. In the southern Sudan-savannah zone such as Batié characterised by reduced cotton growing practices, the *kdr* gene occurred at a frequency of 0.33 which was largely inferior to the mean frequency (0.9) observed in this ecological zone. Inversely its frequency was higher respectively 75% and 82% in Kombissiri and Boromo two localities situated in the Sudan-sahelian zone just up the border of the old cotton belt being superior to the mean value observed in this ecological zone (0.6).

In the M form, the *kdr* mutation was observed in 10 sites extended to the Sudan-sahelian zone where it was formerly absent, at a frequency varying from 0.1 to 0.6. These sites were mainly concentrated in the cotton growing areas (figure 2). The proportion of individuals homozygous for *kdr* gene (RR) within this form reached 12% (17/144) and 16% (16/144) of heterozygous (RS) vs. only 2.3% (4/173) of heterozygous reported in 2000. In the year 2000, it has been reported only in one site namely VK7 at the frequency of 0.02 corresponding to an increasing at least of 58% in the present study. Unexpectedly the frequency of this mutation in the M populations was significantly higher in the Sudan-sahelian ($\chi^2=6.56$, $df=2$, $P<0.05$) than in the Sudan-savannah zone (figure 3).

The *kdr* mutation was also found in *An. arabiensis* populations from one site in the south of the Sudan-sahelian zone (Manga) at a relatively high frequency of 0.3.

That was significantly superior to that observed in 2000 from only one specimen by Diabaté *et al.* (2004) in Soumouso, another site located in Sudanian savannah ($\chi^2=4.43$, $df=1$, $P<0.05$). From the three individuals found in the present study holding this mutation, one (1/3) was homozygous (RR).

Globally the frequency of the *kdr* mutation was low in the central sites of the Sudan-sahelian zone surrounding Ouagadougou. The *kdr* frequency was highest in the sudanian areas where also at the operational level the resistance was detected in wild populations of *An. gambiae* s.s. (figure 3). The *kdr* mutation seemed to be the main resistance mechanism involved in the permethrin-resistance as the mortality rate was correlated to the allelic frequency of the *kdr* mutation within the population tested (figure 4).

Discussion

Distribution of malaria vectors in the country scale

Irrespective to the method used in malaria vector control accurate information either on mosquito identification or their geographical distribution are required. Even though most is known on the distribution of *An. gambiae* complex and chromosomal forms in different environmental set-ups in West Africa (Touré *et al.*, 1998; della Torre *et al.*, 2005) the distribution of the molecular M and S forms is still crucial. In Burkina Faso the distribution of these two molecular forms of *An. gambiae* s.s. followed a specific climatic gradient concentrating the S form in the western Sudan-savannah zone whereas the M form predominated in the Sudan-sahelian and Sahelian zones overlapping the distribution of *An. arabiensis* in the central aridlands. This pattern of distribution was similar to that observed in the other West African countries presenting the same eco-climatic set-ups from Mali to Nigeria (Fanello *et al.*, 2003; Yawson *et al.*, 2004; Awolola *et al.*, 2005, della Torre *et al.*, 2005).

But locally in human modified-locale especially into irrigated areas some major variations can occur. Indeed in VK5 and VK7 located in rice growth areas from Sudan-savannah, only the M form was present all year long whereas the two forms were found in sympatry in VK7 during the rainy season. But globally no significant variation was found in the frequency of these molecular forms compared to that observed by Diabaté *et al.* in 2000.

Resistance status and frequency of *kdr* mutation gene

Although ITNs still achieved a good control of *An. gambiae* s.l. populations in *kdr* resistant areas (Darriet *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2005), some decrease of ITNs efficiency have been observed recently within *kdr*-M molecular forms (identified as “forest” cytotype) of *An. gambiae* s.s. in coastal Benin (N’Guessan *et al.*, 2007). But the problematic seemed different inlands where mostly the S form (identified as “savannah” cytotype) carried *kdr* mutation. The earlier results on the efficacy of ITNs reported in Côte d’Ivoire revealed that they still controlled the *kdr*-resistant population of the S form which could have different behaviour in host seeking through the ITNs than the *kdr* M form reported in coastal Benin. Formerly the *kdr* mutation was recorded at very low frequency in the M form population inlands by . Nowadays, it was evident that the frequency of this mutation was progressing in the M form distribution indicated that it occurred at low frequency of 0.02 and was reported only in one locality from the VK7 village in 2002 (Diabaté *et al.*, 2003). Our study confirms that *An. gambiae* s.l. populations are resistant to permethrin and DDT in the major part of Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2002). However the geographical distribution of this resistance shows varying patterns decreasing from Sudan-savannah to Sahelian zones. This could be due to i) that *kdr* gene the main mechanism of pyrethroid resistance identified in West Africa (Chandre *et al.*, 1999, Diabaté *et al.*, 2004) is associated to the S and now to the M molecular forms largely distributed in the south-western region and to ii) the intensive agricultural use of

insecticide in these areas selecting thus resistance as revealed by Diabaté *et al.* (2002). Indeed the south-western region of Burkina Faso includes the cotton belt covering more than 90% of cotton cropping surface of the country.

Additionally the *kdr* mutation was found increasing among the M molecular populations in 10 sites extended from the cotton growing belt to the Sudan-Sahelian zones. This result suggests a high spread of *kdr* mutation in this form formerly found only in one site from VK7 in Sudan-savannah at the frequency of 0.006 in 1999 and 0.02 (4/173) in 2000 (Diabaté *et al.*, 2003).

Less than ten years, this mutation occurring in the M form probably through genetic introgression as already shown (Diabaté *et al.* 2004) from the S form is still spreading quickly across the Sudan-savannah zone extending to some cotton growth areas of the Sudan-Sahelian zone as indicated by the proportion of homozygous individuals (17 RR+16 RS) and by its relatively high frequency (0.3 in 2006 vs 0.02 in 2000). Of course the high spread of this mutation within the M form is well known and described in the littoral (Fanello *et al.*, 2000) but its high spreading inland is recent and must be investigated in large scale in other similar ecological conditions in West Africa. Indeed previous works carried out locally in Burkina Faso predicted its quicker spreading in the M populations if exposed to high insecticide pressure (Diabaté *et al.* 2004). The frequency of this mutation increased also greatly within *An. arabiensis* populations (1RR+3RS) compared to the year 2000 where only one individual was reported holding this mutation after extended investigation in Soumousso a humid savannah locale (Diabaté *et al.*, 2004).

The occurrence of homozygous specimen suggests that this gene is still spreading. This result seems surprising because the present locality even though situated in Sudan-Sahelian zone is not exposed to more insecticide pressure compared to the western regions.

Overall the *kdr* frequency was higher in the western region located in the Sudan-savannah zone. This zone presented also low mortality rates to permethrin and DDT in operational level. The role of agriculture on resistance selection is also well confirmed (Lin, 1988; Diabaté *et al.*, 2002) by this present study because either the resistance level or the *kdr* frequencies were lower in the Sudan-Sahelian and Sahelian sites even they developed vegetable growth using insecticides but in low scale. These results suggest also that domestic use of insecticides such as coils and aerosols by households to protect themselves against mosquito's nuisance is very secondary in the resistance gene selection because all cities located out the cotton belt were free or presented very low frequency of *kdr*. The domestic use of insecticides must be determinant if the localities were situated in intensive agriculture zone acting thus in synergy rather than principal role of pressure. If it is true that the occurrence of *kdr* mutation resulted from to the S molecular form which had developed early pyrethroid-DDT cross resistance, the high spreading of this mutation both in M form and *An. arabiensis* is very worrying. Indeed the resistance will be extended in the Sudan-Sahelian and Sahelian zones mostly dominated by the M form of *An. gambiae* and *An. arabiensis*. Of course the main ITNs used in this area were deltamethrin impregnated nets, but more efforts can be done for the management of *kdr* resistance.

Conclusion

This work summarises the distribution of pyrethroid-DDT cross resistance in the malaria major vector. Indeed while tendency in vector control is favourable to the reintroduction of DDT in indoor sprays, this work provides crucial information in vector resistance status pointing up a cross resistance between pyrethroid and DDT throughout Burkina Faso and could constitute a technical background for health policy makers.

Acknowledgements

This study was supported by the Multilateral Initiative against Malaria MIM project 60098A and partially by a grant of CDC/Atlanta. We are grateful to villagers of all localities who facilitated the sampling sessions. We thank also Ouari Ali and Ouédraogo Ali for help in mosquito collection.

References

- Akogbeto M., Yakoubou S., 1999b. Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa [article in French]. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 92: 123-30.
- Alonso P.C., 1991. The effect of insecticide- treated nets on mortality of Gambian children. *The Lancet* 337, 1499-1502
- Awolola T.S., Oyewole I.O., Amajoh C.N., Idowu E.T., Ajayi M.B., Oduala A., Manafa O.U., Ibrahim K., Koekemoer L.L., Coetzee M., 2005. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Tropica*, 95, 204-209
- Binka F.N., Kubaje A., Adjuik M., Williams L.A., Lengler C., Maude G.H., Arma G.E., Kajihra B., Adiamo J.H., Smith P.G., 1996. "Impact of permethrin treated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial". *Trop. Med. Int. Health* (1), 147-154.
- Chandre, F, Manguin, S., Brengues, C., Dossou-Yovo, J., Darriet, F, Diabaté, A., Carnevale, P., Guillet, P., 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull. World Health Organ.* 77, 230-4.

- Corbel V., N'Guessan R., Brengues C., Chandre F., Djogbenou L., Martin T., Akogbéto M., Hougard J.M., Rowland M., 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Bénin, West Africa. *Acta Tropica* 3, 207-216
- Dabiré K.R., Diabaté A., Baldet T., Paré L., Guiguemdé T.R., Ouédraogo J.B., Skovmand O., 2006. Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *Anopheles gambiae* s.s. resistance to pyrethroids. *Malaria Journal*, 5-12 doi : 10.1186/1475-2875-5-12.
- D'Alessandro U., Olaleye B.O., McGuire W., Languerock P., Bennett S., Aikins M.K., Thomson M.C., Cham M.K., Cham B.A., Greenwood B.M., 1995. "Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of a treated bednet programme". *The Lancet* (345), 479-483
- Darriet F., N'Guessan R., Koffi A.A., Konan L., Doannio J.M., Chandre F., et al., 2000. Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC. *Bull Soc Pathol Exot.* 93, 131-4
- della Torre A., Tu Z., Petrarca V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* ss molecular forms. *Insect Bioch. Mol. Biol.* 35, 7055-769
- Diabaté A., Baldet T., Chandre,F., Akogbeto M., Darriet F., Brengues C., Guiguemdé T.R., Guillet P., Hemingway J., Hougard J.M., 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 617-622.

- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K.R., Kengne P., Simard F., Guiguemdé T.R., Guillet P., Hemingway J., Hougard J.M., 2003. Kdr mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. *J. Med. Entol.* 40(2), 195-198.
- Diabaté A., Brengues C., Baldet T., Dabiré K.R., Hougard J.M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J., Chandre F., 2004. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de *novo* phenomena. *Trop. Med. Int. Health* 9 (12), 1267-73
- Elissa N., Mouchet J., Riviere F., Meunier J.Y., Yao K., 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* ss to pyrethroids in Cote d'Ivoire. *Ann Soc Bel Med Trop* 73, 291-294
- Fanello C., Akogbeto M., della Torre A., 2000. Distribution of the knockdown resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 132.
- Fanello C., Petrarca V., della Torre A., Santolamazza F., Dolo G., Coulibaly M., Allouche A., Curtis C.F., Toure Y.T., Coluzzi M., 2003. The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.*, 12:241-245.
- Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sideén-Kiamos I., Louis C., 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 10, 5-3
- Gillies M.T., Coetzee M., 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). *Publications of the South African Institute for Medical Research*, no. 55. SAIMR, Johannesburg.

- Henry M.C., Assi S.B., Rogier C, Dossou-Yovo J., Chandre F., Guillet P., Carnevale P., 2005. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg.* 73, 859-64.
- Lines J.D., 1988. Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes? A look at the evidence. *Parasitol Today* 4(7), S17-20
- Martinez-Torres, 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(2), 179-184
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J., 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. Eds, John Libbey Eurotext Paris, 428p
- Nevill C.G., Some E.S., Mung'ala V.O., Mutemi W., New L., Marsh K., Lengeler C., Snow R.W., 1996. Insecticide-treated bednets reduce the mortality and severe morbidity from malaria among children of the Kenyan coast. *Trop. Med. Int. Health* 1, 137-146.
- 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. *Emerging Infectious Diseases*, (13) 2 www.cdc.gov/eid
- Roll Back Malaria, World Health Organization, and United Nations Children Fund: The Africa malaria report 2003. Geneva: WHO; 2003.
- Scott, J.A., Brogdon, W.G. and Collins, F.H., 1993. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 520-529.

- Touré Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maïga H.M., Sankaré O., Sow M., Di Deco M.A. and Coluzzi M., 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40, 477-511
- Tripet F., Wright J., Cornel A., Fofana A., Mcabee R., Meneses C., Reimer L., Slotman M., Thiemann T., Dolo G., Traore S., Lanzaro G., 2007. Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and resistance evidence of its emergence in the Bamako form *Anopheles gambiae* ss. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76: 81- 87.
- Yawson A.E., McCall P.J., Wilson M.D., Donnelly M.J., 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med Vet Entomol*, 18: 372-377.
- World Health Organisation, 1998. Test procedures for insecticides resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides treated surfaces. WHO/CDS/MAL, 12p.

Table 1: study sites: their geo-references, climatic and environment characteristics and the main cropping practices

Site	Longitude	Latitude	Climatic area	Environment	Main crop
Bama centre VK5*	4.2442 W	11.2314 N	Sudan-savannah	rural	Rice
Bama periphery VK7**	4.2459 W	11.2410 N	Sudan-savannah	rural	Rice/cotton
Soumouso**	4.0243 W	11.0054 N	Sudan-savannah	rural	Cotton
Dori**	0.0134 W	14.0258 N	Sahelian	rural	Food
Gaoua*	3.1025 W	10.1929 N	Sudan-savannah	sub-urban	Food
Banfara**	4.4528 W	10.3736 N	Sudan-savannah	sub-urban	Sugarcane/cotton
Niangoloko*	3.0833 W	10.2667 N	Sudan-savannah	sub-urban	Cotton
Batié**	9.270 W	24.55 N	Sudan-savannah	rural	Food/cotton
Orodara**	4.5429 W	10.5825 N	Sudan-savannah	sub-urban	Fruiterer/cotton
Houndé*	3.3120 W	11.2935 N	Sudan-sahelian	sub-urban	Cotton
Boromo**	2.5519 W	11.4444 N	Sudan-sahelian	sub-urban	Cotton
Dédougou**	3.2739 W	12.2527 N	Sudan-sahelian	sub-urban	Cotton
Nouna*	3.335 W	12.37N	Sudan-sahelian	sub-urban	Cotton
Nanoro*	1.2683 W	18.167 N	Sudan-sahelian	rural	Food
Kaya**	1.0516 W	13.0515 N	Sudan-sahelian	sub-urban	Food
Koupela*	0.2115 W	12.1052 N	Sudan-sahelian	sub-urban	Food
Manga*	1.140 W	10.5N	Sudan-sahelian	sub-urban	Food/cotton
Koubri*	1.2163 W	13.886 N	Sudan-sahelian	rural	Food/market
Kombissiri*	1.204 W	12.1 N	Sudan-sahelian	sub-urban	Food/cotton
Fada-N'Gourma*	0.2139 E	12.0317 N	Sudan-sahelian	sub-urban	Food
Bobo-Dioulasso**	4.1730 W	11.1041 N	Sudan-savannah	urban	Market
Ouagadougou**	1.3040 W	12.2008 N	Sudan-Sahelian	urban	Market

Market: market gardener

Food: food-production culture

*: indoor catches and PCR

** : indoor catches+larva+bioassay and PCR

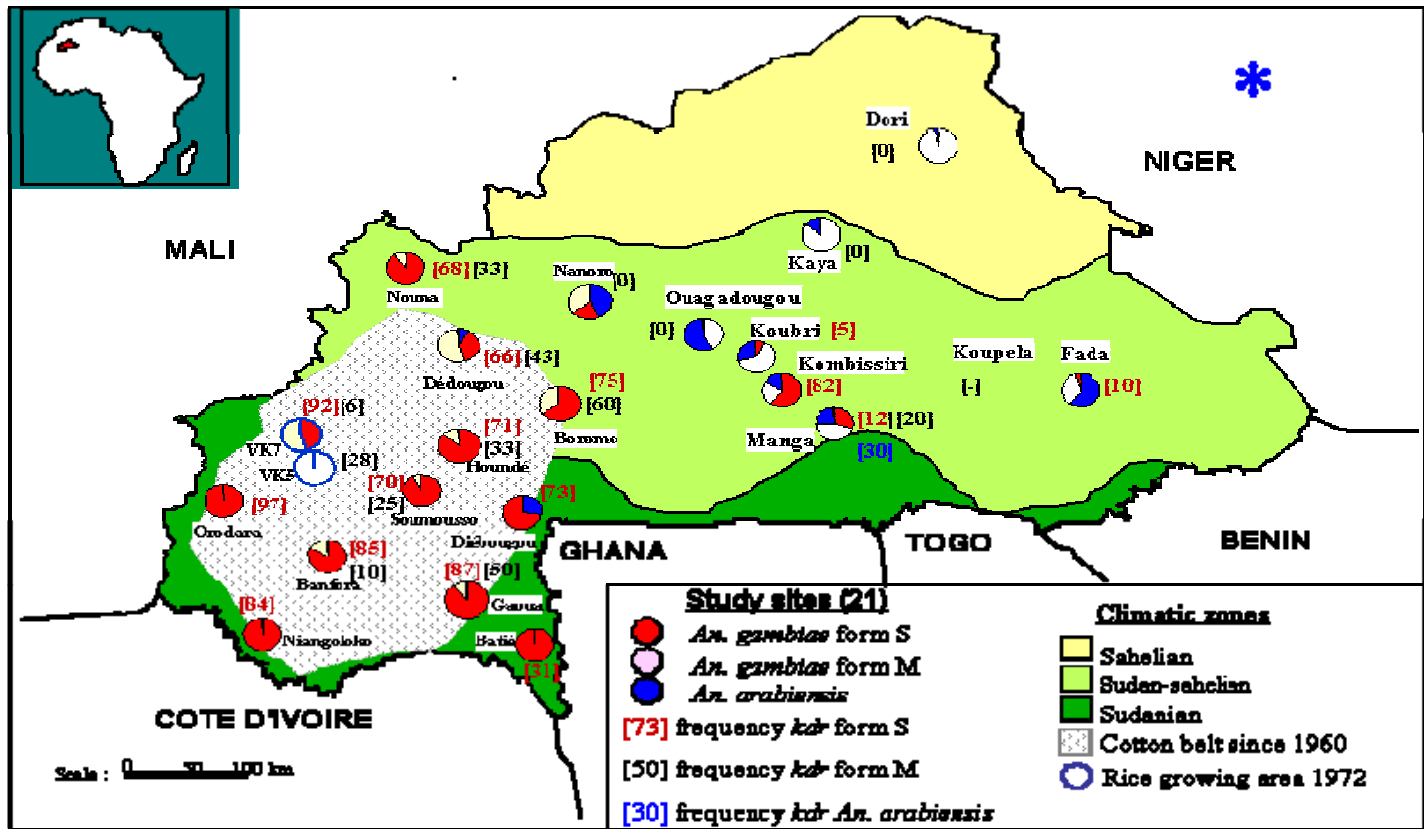


Figure 1: distribution of the frequency of *kdr* mutation in Burkina Faso

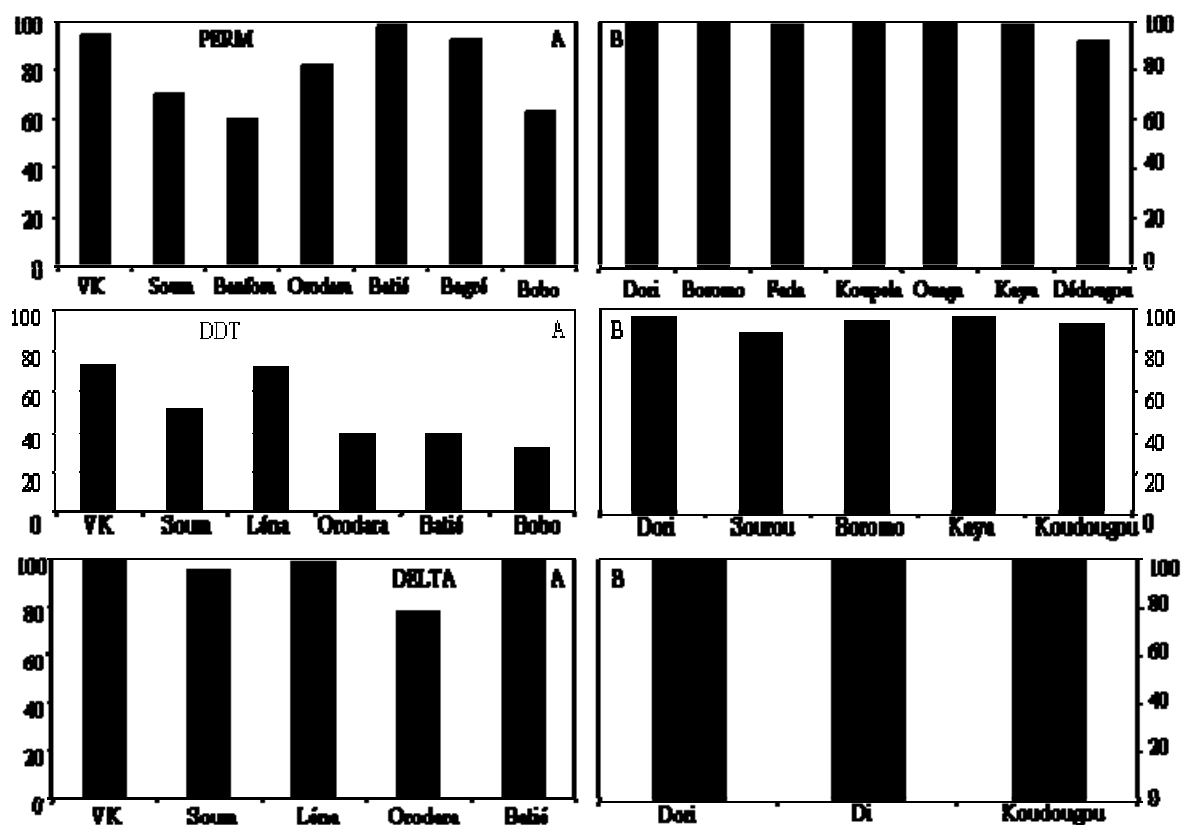


Figure 2: Mortality rates: A: sudan areas, B: sudan-sahelian and sahelian areas

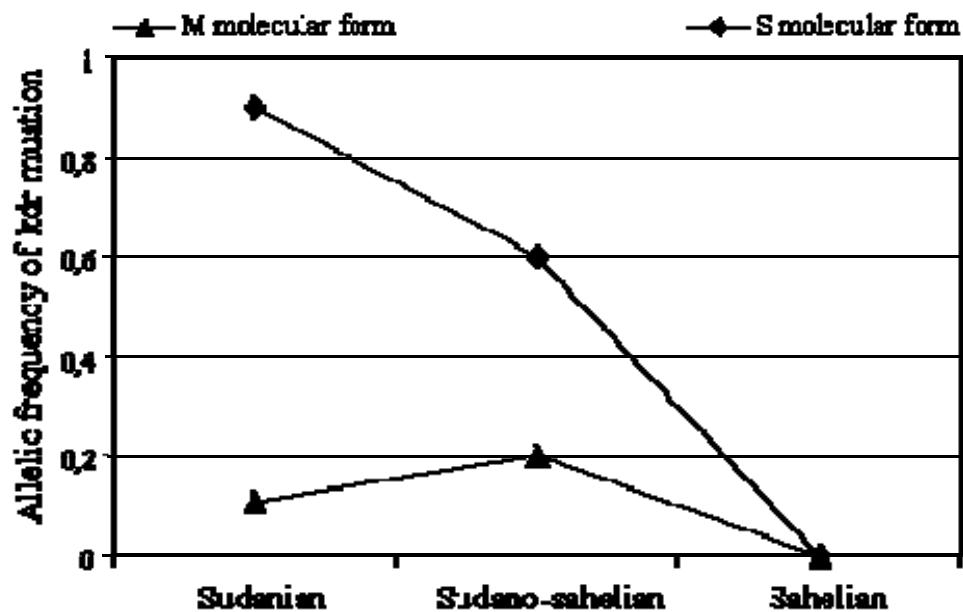


Figure 3: comparison of *kdr* frequency between the three climatic zones

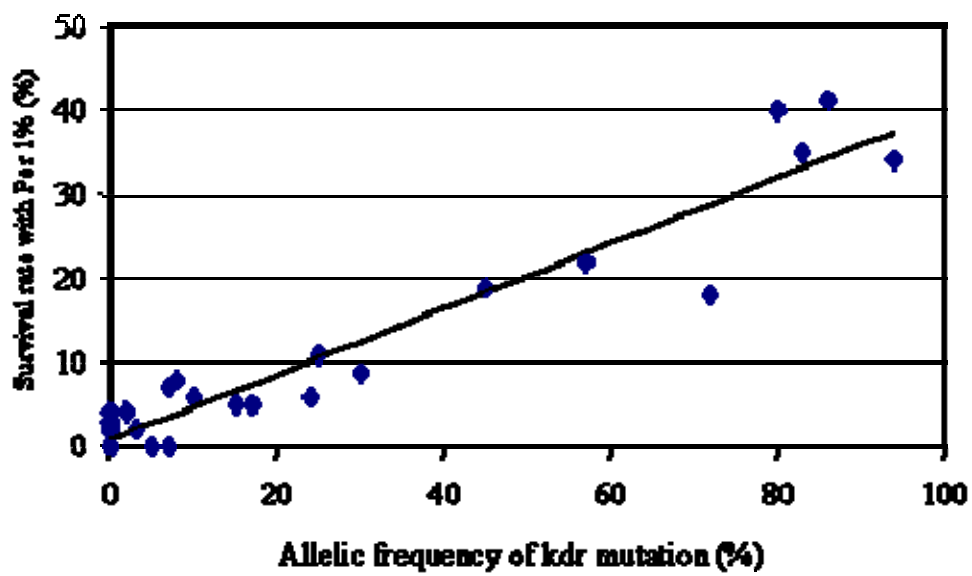


Figure 4: relation between the *kdr* frequency and the mortality rates with permethrin1%

Article 7

Diabaté A., **Dabiré K.R.**, Kengne P., Brengues C., Ouari A., Simard F., Lehmann T. (2006). Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J. Med. Entomol.*, 43: 480-483

Mixed Swarms of the Molecular M and S Forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Sympatric Area from Burkina Faso

ABDOULAYE DIABATÉ,^{1,2} ROCH K. DABIRE,¹ PIERRE KENGNE,³ CECILE BRENGUES,³ THIERRY BALDET,⁴ ALI OUARI,¹ FREDERIC SIMARD,⁵ AND TOVI LEHMANN²

J. Med. Entomol. 43(3): 480–483 (2006)

ABSTRACT The M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* sensu stricto Giles are thought to be reproductively isolated through premating barriers. However, the exact mechanisms of recognition of conspecific partners are unknown. Because mating in *An. gambiae* occurs in swarms, one might expect swarming behavior between the M and S forms to be different and that this probably reduces the risk of contact between males and females of the different forms in areas where they are sympatric. We report the occurrence of four mixed swarms, containing males of M and S forms, out of a total of 26 swarms sampled in Soumouso, a typical savannah village of Burkina Faso, West Africa. However, the frequency of mixed swarms was lower than that expected by chance. This observation suggests partial segregation between the swarms of the molecular forms, which may contribute to their isolation. Because the frequency of mixed swarms seems too high to explain the low frequency of cross-mating and hybrids, we suggest that mate recognition in a swarm is more important than swarm segregation.

KEY WORDS mixed swarms, molecular M and S forms, *Anopheles gambiae*, mating behavior

The issue of reproductive isolation within *Anopheles gambiae* sensu stricto Giles has generated much debate. This species is highly polymorphic and is further subdivided into five forms that differ in their chromosomal inversion arrangements (Coluzzi et al. 1985, Touré et al. 1998, Coluzzi et al. 2002). These chromosomal forms seem more or less genetically isolated in the field, presumably through prezygotic barriers because viable and fertile hybrids have been obtained in the laboratory (Di Deco et al. 1980, Persiani et al. 1986, Touré et al. 1998). Cytogenetic analysis, however, is not a precise way to evaluate the degree of hybridization between forms because of the presence of cryptic “heterokaryotypes” that are difficult to identify and the adaptive nature of inversions strongly exposed to selection (della Torre et al. 2001, Coluzzi et al. 2002, Wondji et al. 2002). Recent studies using molecular markers such as X-linked ribosomal DNA suggested the existence of only two entities within *An. gambiae* that are referred to as M and S molecular

forms (Favia et al. 2001). A deficit of hybrid M/S individuals has been observed in the field (della Torre et al. 2001). Although postmating barriers between the chromosomal forms have not been found (Di Deco et al. 1980, Persiani et al. 1986, Touré et al. 1998), no studies have evaluated postmating between the molecular forms. There are data that are consistent with the hypothesis of premating reproductive isolation between M and S (Tripet et al. 2001), but little is known on the structure of mating between the forms in the field.

Mating systems based on aerial male aggregations that function as encounter sites for mate-searching females have evolved repeatedly in various groups of insects (Sullivan 1981, Cooter 1989). In most swarming species, the swarms are composed of males. Females typically approach a swarm, acquire a mate, and leave in copula. The way the sexes are attracted to each other may contribute to specific mate recognition systems, which may prevent hybridization. The mechanisms that result in assortative mating in *An. gambiae* are still unknown. The hypothesis that flight-tone is used for mate recognition by sympatric *An. gambiae* and *Anopheles arabiensis* Patton (Brogdon 1998) was not confirmed by field studies (Wekesa et al. 1998). Recently, Tripet et al. (2004, 2005) did not find a difference in wingbeat frequency and sex proteins between the molecular M and S forms of *An. gambiae*. Studies on the swarming and mating behavior in the field suggest that males of *An. gambiae* avoid contact with interspecific partners mainly by swarming at different heights above markers such as those

¹ Institut de Recherche en Sciences de la Santé/Centre Muraz BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

² Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID, National Institute of Health, 12735 Twinbrook Parkway, Room 2W13A, Rockville, MD 20852.

³ Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles/Institut de Recherche pour le Développement Montpellier, 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

⁴ CIRAD-EMVT, UPR 16, Campus international de Baillarguet 34398 Montpellier Cedex 5, France.

⁵ Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale/Institut de Recherche pour le Développement BP 288 Yaoundé, Cameroun.

Table 1. Frequencies of the molecular forms of *An. gambiae* collected from 26 swarms

Swarm	Collection date (2004)	Location ^a	♂M ₋	♂S ₋	No. ♀
1	23 Aug.	1	0	20	0
2	23 Aug.	2	7	14	0
3	23 Aug.	3	0	34	1
4	23 Aug.	4	0	23	0
5	23 Aug.	5	0	37	0
6	24 Aug.	1	0	12	0
7	24 Aug.	2	0	28	1
8	24 Aug.	3	0	46	2
9	24 Aug.	4	0	7	0
10	24 Aug.	5	5	23	0
11	24 Aug.	6	2	16	0
12	24 Aug.	7	0	17	0
13	25 Aug.	3	0	13	0
14	25 Aug.	5	0	21	1
15	25 Aug.	6	0	19	0
16	22 Sept.	1	0	17	0
17	22 Sept.	3	0	19	0
18	22 Sept.	5	0	16	0
19	22 Sept.	6	0	12	0
20	23 Sept.	1	0	9	0
21	23 Sept.	2	0	11	0
22	23 Sept.	3	0	49	1
23	23 Sept.	4	0	6	0
24	23 Sept.	5	0	11	0
25	23 Sept.	6	0	23	0
26	23 Sept.	7	3	8	0
Overall			17 (3.2%)	511 (96.8%)	6 (100%)

All six females collected were of the S form. Homogeneity of form composition across swarms was applied only to males. Homogeneity of form composition across swarms (males only) was rejected $P < 0.0001$ by using contingency table exact test.

^a Location is a unique identifier of the swarm location defined by the projection of the center of a swarm onto the ground. If a location of a given swarm fell within 10 m from that of a previous swarm, the previous location identifier was used.

formed between grass areas and footpaths or bushes and secondarily by swarming at different times (Charwood et al. 2002). Therefore, one might expect different swarming behavior between M and S forms that reduces contact between males and females of the different forms in areas where they are sympatric.

Materials and Methods

A survey of the swarming and mating behavior of *An. gambiae* was undertaken in Soumousso (11°00' 46' N, 4°02' 45' W), a typical village in the savannah area of Burkina Faso, West Africa, where both M and S forms of *An. gambiae* coexist. *Anopheles funestus* Giles and *Anopheles nili* Theobald also are found there and contribute to malaria transmission. The highest density of *An. gambiae* occurs in September and is ≈ 30 bites per human per night. The relative frequencies of the two molecular forms of *An. gambiae* change over time. The M form is predominant from December to June and the S form from July to November. Swarms were sampled with an insect net. Mosquitoes were aspirated into cups, killed with chloroform, identified, counted, and placed on silica gel in tubes. The location of the swarm, the time of collection, and the height above the ground were recorded. Indoor resting mosquitoes also were collected using aspirators in this village during the same time and processed as described above. Genomic DNA was extracted from single mosquitoes and polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the intergenic spacer of the rDNA

to identify the molecular forms as described previously (Favia et al. 2001).

We tested whether the observed number of mixed swarms agreed with expectation based on random sampling from a binomial distribution with the observed form composition estimated from a sample of indoor resting females from the same time and area. We drew 5,000 random sets, each of 26 samples with the same sample sizes as in our actual samples from swarms. For each random set, the number of mixed swarms was recorded. The distribution of these 5,000 values represented the expected distribution of mixed swarms (out of 26 samples) given the form composition and actual sample sizes. If our observed count of mixed swarms fell outside the central 95% of this distribution, we would reject the hypothesis that the swarms represented a random collection of males from a population with these frequencies. Contingency table analysis was used to test homogeneity of form composition in males across swarms. Exact test was used because of the presence of cells with expected values lower than 5. Statistical analysis was performed using SAS (SAS Institute 1999)

Results

A survey of swarms in Soumousso was conducted in August and September 2004, when the composition of the S and M forms based on indoor females collection ($n = 71$) was 82 and 18%, respectively. In total, 26 swarms of *An. gambiae* were sampled, yielding 528

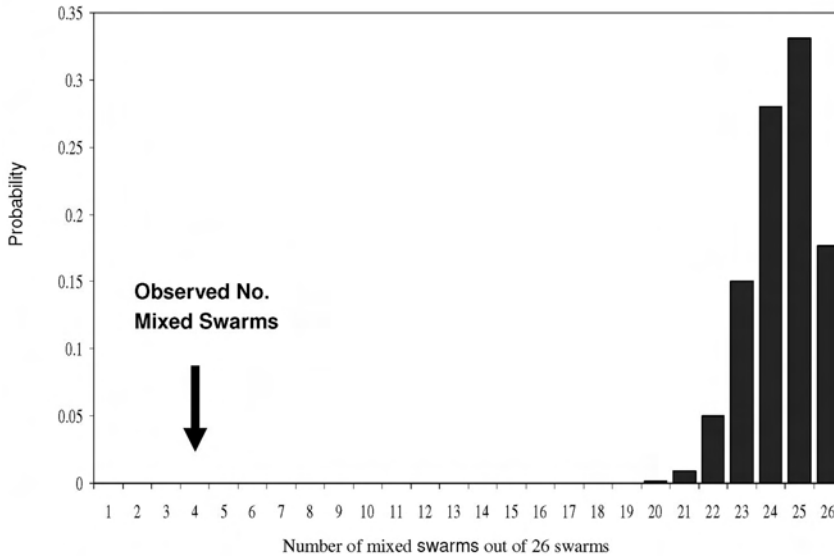


Fig. 1. Distribution of the number of mixed swarms expected out of 26 samples based on 5,000 sets of random samples drawn from a binomial distribution. The probability of success in the binomial distribution was 18.2%, based on the form composition in indoor resting female collection in the same time and area where swarms were collected. Observed number of mixed swarms is shown by the arrow. See text for details.

male and six female *An. gambiae* (Table 1). Of these 26 swarms, four were composed of M and S males (Table 1). The other 22 swarms collected were exclusively of the S form. Only six females of the S form were collected from the latter 22 swarms, and no females were collected from the mixed swarms. All the specimens collected from swarms were PCR identified. *An. arabiensis* was not collected in these swarms in accordance with its low frequency in this area (Diabaté et al. 2004). Based on the composition of the two molecular forms with indoor females collection, the expected number of mixed swarms out of 26 swarms was calculated and was found to be significantly higher than the number of mixed swarms observed, suggesting partial segregation in the swarming behavior of the two forms (Fig. 1). Even considering swarming males alone, homogeneity of form composition across swarms was rejected by contingency table analysis (Table 1; $P < 0.0001$ exact test). However, we could not find any difference between mixed and nonmixed swarms' general characteristics, such as the height above the ground, place of collection, time of collection, and movement. They were collected from 1 to 3 m above the ground; however, they could fly up to 4 m above the ground. Swarming always began 5 to 10 min after sunset by one or two males who were progressively joined by other males. After the swarm had formed, mosquitoes flew around a pivotal position occasionally moving forward, backward, or up and down. We could not associate any physical marker, such as a tree or a fence, with the sites where swarms were found (Diabaté et al. 2003). In the seven swarming sites, three were in open flat areas, one at the edge of a cornfield, one near a shed, one close to cow herd, and one above grasses. There was no exclusive spot for mixed swarms (Table 1).

Discussion

Most investigators have found swarms of mosquitoes to be composed of males of a single species, even when several species were swarming in the same area (Clements 1999). However, mixed swarms of *An. gambiae* and *An. arabiensis* have occasionally been reported, suggesting that segregation of swarms in time and space was not the key to the reproductive isolation of these sibling species (Marchand 1984). The lower than expected frequency of mixed swarms reported here revealed differences in swarming behavior between the molecular forms that may contribute to reduced cross-mating between them. However, if these four mixed swarms out of 26 would succeed in mating regardless of the molecular form, this would result in a high estimate of cross-mating. Previous results from Soumouso did not find any hybrid between M and S (Diabaté et al. 2004). Indeed, low frequency of cross-mating, 1.4% (Tripet et al. 2001) or hybrids 0.0026% (della Torre et al. 2001) has been reported from the field. Together with these previous results, our data suggest that mate recognition in a swarm is more important than swarm segregation to explain assortative mating. The occurrence of mixed swarms does not imply that cross-mating and hybridization will occur in such swarms. We hypothesize that *An. gambiae* females are important in mate recognition because mated females are able to evade copulation attempts by males, thus preventing further inseminations (Charwood and Jones 1979). We did not find swarms composed mostly or exclusively of the M form, but the relatively low proportion of the M form in the swarms (Table 1) compared with that we observed in indoor females collection (18%) suggests that such swarms do exist.

This is the first report of mixed swarms of M and S forms of *An. gambiae*. Further studies of mate recognition and swarming behavior of this mosquito species will be valuable to understand speciation in *An. gambiae* and gene flow between them that determines the spread of traits such as insecticides resistance and transgenes (della Torre et al. 2002).

Acknowledgments

We are grateful to D. Fontenille, C. Costantini for useful comments and suggestions to improve the manuscript. This investigation received financial assistance from UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) and was also supported by the Intramural Research Program of National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health.

References Cited

- Brogdon, W. C. 1998. Measurement of flight tone differentiates among members of the *Anopheles gambiae* species complex (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 35: 681–684.
- Charlwood, J. D., and D. R. Jones. 1979. Mating behaviour in the mosquito, *Anopheles gambiae* s. l. I. Close range behaviour. *Ecol. Entomol.* 4: 111–120.
- Charlwood, J. D., J. Pinto, C. A. Sousa, H. Madsen, C. Ferreira, and V. E. Rosario. 2002. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. *J. Vector Ecol.* 27: 78–183.
- Clements, A. N. 1999. The biology of mosquitoes. Sensory reception and behaviour. University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Coluzzi, M., V. Petrarca, and M. A. Di Deco. 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.* 52: 45–63.
- Coluzzi, M., A. Sabatini, A. della Torre, M. A. Di Deco, and V. Petrarca. 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science (Wash. DC)* 298: 1415–1418.
- Cooter, R. J. 1989. Swarm flight behaviour in flies and locusts, pp. 165–203. In G. J. Goldsworthy and C. H. Wheeler [eds.], *Insect flight*. CRC, Boca Raton, FL.
- della Torre, A., C. Fanello, M. Akogbeto, J. Dossou-Yovo, G. Favia, V. Petrarca, and M. Coluzzi. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Mol. Biol.* 10: 9–18.
- della Torre, A., C. Costantini, N. J. Besansky, A. Caccone, V. Petrarca, J. R. Powell, and M. Coluzzi. 2002. Speciation within *Anopheles gambiae*—the glass is half full. *Science (Wash. DC)* 298: 115–117.
- Diabaté, A., T. Baldet, C. Brengues, P. Kengne, R. Dabire, F. Simard, F. Chandre, J. M. Hougard, J. Hemingway, J. B. Ouédraogo, and D. Fontenille. 2003. Natural swarming behaviour in the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97: 713–716.
- Diabaté, A., C. Brengues, T. Baldet, R. Dabire, J. M. Hougard, M. Akogbeto, P. Kengne, F. Simard, P. Guillet, J. Hemingway, and F. Chandre. 2004. The spread of the Leu-Phe Kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomenon. *Trop. Med. Int. Health* 9: 1267–1273.
- Di Deco, M. A., V. Petrarca, F. Villani, and M. Coluzzi. 1980. Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di *Anopheles* allevati in laboratorio. *Parassitologia* 22: 304–306.
- Favia, G., A. Lanfrancotti, L. Spanos, I. Sidén-Kiamos, and C. Louis. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 10: 19–23.
- Marchand, R. P. 1984. Field observations on swarming and mating in *Anopheles gambiae* mosquitoes in Tanzania. *Neth. J. Zool* 34: 367–387.
- Persiani, A., M. A. Di Deco, and G. Petrangeli. 1986. Osservazioni di laboratorio su polimorfismi da inversione originata da incrocitra popolazioni diverse de *Anopheles gambiae* s.s. *Ann. Ist. Super Sanita* 22: 221–224.
- SAS Institute. 1999. SAS version, 8th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Sullivan, R. T. 1981. Insect swarming and mating. *Fla. Entomol.* 64: 44–65.
- Touré, Y. T., V. Petrarca, S. F. Traoré, A. Coulibaly, H. M. Maïga, O. Sankaré, M. Sow, M. A. Di Deco, and M. Coluzzi. 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477–511.
- Tripet, F., Y. T. Touré, C. E. Taylor, D. E. Norris, G. Dolo, and G. C. Lanzaro. 2001. DNA analysis transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol. Ecol.* 10: 1725–1732.
- Tripet, F., D. Guimogo, S. Traoré, and G. C. Lanzaro. 2004. The wingbeat hypothesis of reproductive isolation between members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) does not fly. *J. Med. Entomol.* 41: 375–384.
- Tripet, F., T. Thiemann, and G. C. Lanzaro. 2005. Effect of seminal fluids in mating between M and S forms of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.* 42: 596–603.
- Wekesa, J. W., W. G. Brogdon, W. A. Hawley, and N. J. Besansky. 1998. Flight-tone of field populations of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Physiol. Entomol.* 23: 289–294.
- Wondji, C., F. Simard, and D. Fontenille. 2002. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol. Biol.* 11: 11–19.

Received 12 August 2005; accepted 1 December 2005.

Article 8

Dabiré K.R., Diabaté A., Kengne P., Ouari A., Baldet T., Costantini C., Simard F., Fontenille D., Gabriella G. (2008). Seasonal dynamic of swarming and mating events between molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* in sympatric areas from Burkina Faso. *Med.Vet. Entomol* (soumis)

Seasonal changes in the dynamics of mixed-swarms and mating for the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa)

K.R. DABIRE¹, A. DIABATE^{1,5}, S. SAWADODGO¹, H. TOE¹, P. KENGNE², T. BALDET³, C. COSTANTINI⁴, J-B. OUEDRAOGO¹, F. SIMARD⁵, T. LEHMANN⁵, G. GIBSON⁷

¹Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)/Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

²LIN/UR016/IRD, B.P. 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

³Cirad, UPR16 Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

⁴IRD/Institut de Recherche en Sciences de la Santé, BP 545 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

⁵OCEAC/IRD Yaoundé, Cameroun

⁶Laboratory of Malaria and Vector Research /NIAID/ NIH, Rockville, Washington, USA

⁷Natural Resources Institute /University of Greenwich, Central Avenue Chatham Maritime Kent, ME44TB, UK

Corresponding author: Dabiré Kounbobr Roch

IRSS/Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso

Burkina Faso

E-mail: dabire_roch@hotmail.com

Abstract

The seasonal patterns of swarming in *Anopheles gambiae* Giles s.s. M and S molecular forms were investigated from July 2005 to October 2006 in Soumouosso and Vallée du Kou (VK7), two areas of western Burkina Faso where these forms are sympatric. In Soumouosso, a wooded savannah, 2 710 mosquitoes (2 671 males) and 25 pairs caught *in copula* were sampled from 25 swarms. Whereas, only 16% (1/6) of swarms contained both forms (mixed swarms) in July 2005, the number of mixed swarms was significantly greater in July 2006 (100%; 6/6) and October 2006 (40%; 2/5). All single-form swarms were of the S form. In Vallée du Kou, a rice growing area, 17 543 mosquitoes (17 266 males) and 124 pairs caught *in copula* were sampled from 33 swarms. These swarms were exclusively composed of the M molecular form in 2005, but in 2006 some mixed swarms were sampled in the same area toward the end of the rainy season, with a frequency of 29% (2/7) in September 2006 and 80% (4/5) in October 2006. Of the 149 pairs caught *in copula* inside swarms from both sites, 97.3% (145/149) consisted of homogenous pairings of the two forms. Of the 145 homogenous pairs, 91 were caught in mixed swarms. Only 4 copula caught in mixed swarms were of mixed-form pairs, although the sperm in all 4 of those females were identified by PCR to be of the same form as the female, and not from the male in the mixed pair. These results indicate that successful mating occurred exclusively between mosquitoes of the same form. This finding suggests that although the two forms swarmed together, the mating process is likely to be affected by unknown intraspecific recognition factors.

Key-words. *Anopheles gambiae* s.s., mating, mixed-swarm, molecular S and M forms, Burkina Faso.

Introduction

Recent advances in the genomic and molecular genetic analysis of *Anopheles gambiae* Giles s.s., the major malaria vector in Africa, has increased the prospects of using genetically modified mosquitoes in malaria control (Moreira *et al.*, 2004; Hemingway, 2004; Christophides 2005; Sperança & Capurro, 2007). The use/release of such genetically modified vectors, however, requires a proper understanding of potential interactions with naturally occurring populations. This malaria vector is a member of a species complex, and hence has accumulated genetic heterogeneity over the generations, suggesting the existence of a process of genetic reproductive isolation.

The basis of reproductive isolation within the *An. gambiae* s.s. species and, more broadly, the related process of incipient speciation has generated much debate (Della Torre *et al.*, 2002; Coluzzi *et al.*, 2002). This mosquito species is highly polymorphic and has been subdivided into at least five chromosomal forms that differ in their inversion arrangements (Coluzzi *et al.*, 1985; Touré *et al.*, 1998; Coluzzi *et al.*, 2002). These chromosomal forms appear more or less genetically isolated in the field, presumably through prezygotic barriers, since viable and fertile hybrids have been obtained in the laboratory (Di Deco *et al.*, 1980; Persiani *et al.*, 1986; Touré *et al.*, 1998). Cytogenetic analysis, however, is not a precise way to evaluate the degree of hybridisation between forms because of the presence of cryptic ‘heterokaryotypes’ impossible to identify with confidence, and also the adaptive nature of inversions strongly exposed to selection (della Torre *et al.*, 2001; Wondji *et al.*, 2002; Coluzzi *et al.*, 2002). Recent studies based on molecular markers such as X-linked ribosomal DNA merged these chromosomal forms into two entities referred to as the ‘M’ and ‘S’ molecular forms (Favia *et al.*, 2001). Although viable hybrids of these molecular can be obtained in the laboratory, M/S hybrids are very rare in nature (della Torre *et al.*, 2001), and we do not yet know how the reproductive barriers between these molecular forms function.

Mating systems based on aerial male aggregations that function as encounter sites for mate-searching females have evolved repeatedly in various groups of insects (Sullivan, 1981; Cooter, 1989). Swarms consist mainly of males. Females typically approach a swarm, acquire a mate, and leave *in copula*. The way the sexes behave in a swarm may contribute to species-specific mate recognition systems, which prevent hybridisation. Charlwood *et al.* (1979) suggested that males of *An. gambiae s.s.* avoid contact with inter-specific partners mainly by swarming at different heights above a marker, and secondarily by swarming at different times. In this respect, one might expect M and S forms to swarm differently, which would reduce the chances of contact between males and females of the different forms where they are sympatric. In support of this hypothesis, Tripet *et al.* (2001) observed assortative mating between the forms in the field. However, recent data on both wing-beat frequencies and male accessory gland substances failed to explain the mechanisms of this assortative mating (Tripet *et al.*, 2003; 2005). Nonetheless, evidence of a strong pre-mating barrier between these two forms continues to accumulate. In a rice growing area where both M and S molecular forms occur sympatrically, only swarms of the M form have been discovered (Diabaté *et al.*, 2003), and although mixed swarms of the two forms have been collected in a savannah area, albeit at a low frequency (Diabaté *et al.*, 2006), there is a consistent deficit of hybrids in this area. Based on these findings, the goal of the present study was to extend the 2005 investigation, and explore more fully the behavioural dynamics of the two forms in the same areas in relation to sexual interactions within swarms. The ultimate aim of the study is to elucidate the way pre-zygotic barriers lead to assortative mating between the two forms.

Material and methods

Sampling sites

Soumouso (11°00'46"N, 4°02'45"W) is a typical Guinean savannah village situated ~55 km east of Bobo-Dioulasso, the second largest town of Burkina Faso. There are two distinct seasons, with the heaviest rainfall from May - October (annual average of 1000-1200 mm). The breeding sites consist mostly of rain-filled puddles and a semi-permanent swamp suitable. Three main malaria vectors are found in this village, including *An. gambiae* of both M and S molecular forms, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald). *Anopheles arabiensis* Paton is occasionally reported at low frequencies (<5% of *An. gambiae* s.l. samples). Since 2003 we have studied swarming behaviour in *An. gambiae* M and S molecular forms, which are sympatric in this area. Mixed-swarms have been collected there for at least the previous two years (Diabaté *et al.*, 2006).

Vallée de Kou (11°24'N; 04°24'W) is ~ 30 km north-west of Bobo-Dioulasso in the valley of the Kou River, a region where extensive rice cultivation was developed and practised since the 1970s. This area contains seven villages covering 7,200 ha surrounded by wooded savannah. As the Kou River flows all year round, it offers a permanent source of water for irrigation, hence allowing two crops of rice per year (July-November and January-May). Because of irrigation, the rice fields are highly productive permanent mosquito breeding sites. Additional anopheline breeding sites include depressions and rain puddles. Both molecular forms M and S of *An. gambiae* are recorded at high densities during the rainy season, especially for the M form, with mean biting rates as high as ~ 200 bites person⁻¹ night⁻¹ (Baldet *et al.*, 2003). Since 2003, swarms of *An. gambiae* M form have been and associated ecological parameters have been monitored regularly (Diabaté *et al.*, 2003) in village 7 (VK7).

Mosquito collections from within the swarms, indoors and outdoors

Mosquitoes and coupled-pairs were sampled from swarms using sweep nets. Indoor-resting females were collected by spraying village huts with a knock-down dose of pyrethroids. Female mosquitoes were knocked-down and immediately retrieved from white sheets laid on the floor of sprayed huts. In 2006 mosquitoes were also collected outdoors by manual aspiration in abandoned houses in Soumouso and VK7 and from wood stored outside near the swarming areas in VK7. The wood piles were covered by a large net and mosquitoes dispersed in the net were collected by manual aspiration.

Processing of mosquito samples

Abdomens of females collected in September and October 2006 were kept in alcohol and stored at -20°C for further analysis of insemination status and the identity of spermatozoa. The insemination status of females was ascertained by dissecting the spermatheca in their abdomens and checking for the presence of spermatozoa. The females and the sperm were then analysed by PCR to identify their respective molecular forms.

Sub-samples of ~ 60 mosquitoes per swarm from at least five swarms were randomly selected each month for PCR analysis to determine their molecular form. All mosquitoes caught in *copula* were also identified by PCR. Because of the low proportion of *An. arabiensis* in the study sites, field-collected mosquitoes belonging to the *An. gambiae* complex were assumed to be *An. gambiae s.s* and identified directly for their molecular forms according to Favia *et al.* (2001). The few specimens which failed to be identified by this protocol were likely to be *An. arabiensis*, and were therefore re-tested to identify them to species using the PCR technique described by Scott *et al.* (1993).

Results

Seasonal variation of swarm composition

The S form predominated in Soumouosso, throughout the study period (Fig. 1). How can you have so many M form in July 05 when there are no pure swarms of M and just one mixed swarm, and in Aug 06 there appear to be no M form in Fig. 1, but there is a mixed swarm? The proportion of the M molecular form was significantly lower than the S form overall, irrespective of the month ($\chi^2=178$, $df=2$, $P<0.001$). In 2005, only one mixed swarm was recorded (July), at a frequency of 16.6% (1/6) and in 2006, numerous mixed swarms were found at frequencies ranging from 100% to 20%, respectively, from July - October 2006 (Table 1).

The M form predominated in VK7 throughout the study period (Fig. 2), and mixed swarms were observed only in 2006 toward the end of the rainy season, at a frequency of 29% (2/7) and 80% (4/5) in September and October, respectively. The overall proportion of the S form was significantly lower than that of the M form ($\chi^2=152$, $df=2$, $P<0.001$), however the proportion of S form was higher in September and October (Fig. 2).

Mixed pairs *in copula* within the S and M swarms

Of the 149 pairs caught *in copula* inside swarms from both sites (25 from Soumouosso and 124 from VK7), 97.3% (145/149) consisted of homogenous pairings of the two forms (Table 2). In Soumouosso, all pairings came from S-form swarms in July & August 2006 and were composed exclusively of S-form pairs. In September and October 2006, however, 9 pairs were collected from mixed swarms, 8 of which were S-form pairs, and 1 was of an 'S-female/M-male' pair. In VK7, all pairings came from M-form swarms in July and August 2006, and were composed exclusively of the M-form pairs.

Those collected in September and October 2006, however, (n = 87 pairs) came from mixed swarms and were composed mainly of same-form pairs (39 of M-form and 45 of S-form), although 3 mixed pairs were found (1 of 'M-female/S-male' and 2 of 'S-female/M-male').

Molecular status of inseminated females and their sperm

Out of 101 inseminated-females, collected from swarms, and from indoor and outdoor resting sites, 42 were of the M form and 59 were of the S form. All the inseminated females were found to contain sperm from a male of the same molecular form as the inseminated female, including the four females found in 'mixed-form' pairs (Table 3).

Frequency of M and S molecular forms indoors and outdoors

Indoor collections. In Soumouso, the frequency of the two molecular forms caught indoors was similar to that observed in swarms. The S form was dominant throughout the sampling period ($\chi^2=42.3$, $df=2$, $P<0.001$), although in July 2005 and 2006, the frequency of the M form increased greatly, to a peak of 36 and 39%, respectively (Fig. 3A).

In VK7, the M form was the most frequent, irrespective of the sampling period ($\chi^2=73.4$, $df=2$, $P<0.001$). Indeed, except in August and October 2005 and also in October 2006, all mosquitoes analysed by PCR were of the M form. In 2005, the S form started appearing toward the end of August at a low frequency (6%), reaching a maximum peak of 29% in October. Similarly, in October 2006, the frequency of the S form reached 23% (Fig. 4). In general, the frequency of the two molecular forms collected indoors was similar to that observed in the swarms.

Outdoor collections. In Soumouosso, the S form was dominant in outdoor catches and did not differ significantly to those of indoor collections performed at the same period (September and October; $\chi^2=1.97$, $df=1$, $P>0.05$). A few *An. arabiensis* (less than 10%) were found (Fig. 3B). In VK7, the frequency of forms for outdoor catches was not similar to that for indoor catches. In abandoned houses, the frequency of the S molecular varied, reaching a peak value of 40% in October ($\chi^2=12.3$, $df=2$, $P<0.01$). A few *An. arabiensis* were also found in abandoned houses at a low frequency of < 5% (Fig. 5A). In the outside stored wood, however, the S form was predominated ($\chi^2=9.47$, $df=1$, $P<0.01$), except in August (Fig. 5B). The S form was more exophilic than the M molecular form in this area ($\chi^2=38.9$, $df=1$, $P<0.001$).

Discussion

Since 2003, the pre-mating reproductive barriers between the molecular forms M and S of *An. gambiae* s.s. has been investigated in relation to swarming behaviour in the field. Initially, only swarms of the M form were reported in the study area of VK7 and no mixed swarms were found (Diabaté *et al.*, 2003). These findings indicated the existence of a strong pre-mating reproductive barrier, which could be based on temporal or spatial differences in swarm formation between the two forms, as proposed by Charwood *et al.* (2002). In 2004, a few mixed swarms were observed in Soumouosso, a wooded savannah village, which were largely dominated by the S form. The frequency of mixed swarms was, however, much lower than expected from the relative frequencies of the M and S forms in the indoor and outdoor collections, where, for example, the proportion of M form collected indoors was as high as 18% (Diabaté *et al.*, 2006). After extended investigations from July 2005 to October 2006, we observed high frequencies of mixed swarms varying with season at the two sites.

Of particular interest is our finding that the majority of mating pairs (*copula*) collected from mixed swarms were composed of ‘same-form’ pairings, i.e. a male and a female of the same form. Even more surprisingly, however, was that females from all 95 pairs caught in mixed-swarms were carrying sperm from the ‘same-form’ male. Even in the case of 4 mixed-form pairs, the sperm was not from the male she was caught with, but from a male of her own form. This is evidence for strong assortative mating between forms, even within mixed swarms and is consistent with the low frequency of M/S hybrids or between-form insemination rates reported earlier (Tripet *et al.*, 2003). These results also indicate that the low level of cross-pairing between forms in the field is the result of mate choice rather than the outcome of natural selection against hybrids.

The high frequencies of mixed swarms and the occurrence of mixed pairs would suggest a reasonably high likelihood of cross-mating. However, in addition to the lack of evidence of cross-form insemination, no hybrid M/S mosquitoes were found in the indoor or outdoor collections from either site, indicating that mixed swarms and/or mixed pairings do not appear to lead to cross-mating and hybridization.

In summary, our findings clearly indicate the existence of a strong mechanism of assortative mating between these two forms in the fields, consistent with similar evidence from Mali and Burkina Faso (Tripet *et al.*, 2005; Diabaté *et al.*, 2006).

Acknowledgments

This study was financially supported by a grant from MIM/TDR (Project MIM ID 60098A), and partially by a grant from the UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) to G.G. (A50299). The authors are grateful to the populations of Soumousso and Vallée du Kou who made this study possible.

References

- Baldet T., Diabaté A., Guiguemdé T.R., 2003. Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama) Burkina Faso. *Cahiers Santé* 13, 56-60.
- Charlwood J.D. & Jones M.D.R., 1979. Mating in the mosquito *Anopheles gambiae* s.l. II. Swarming behaviour. *Physiol. Entomol.*, 5, 315-320
- Charlwood J.D., Thomson R., Madsen H., 2002. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. *J. Vector Ecol.* 27: 178-183.
- Christophides G.K., 2005. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cell Microbio* 7: 325-333.
- Coluzzi M., Petrarca V., Di Deco M. A., 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di Zoologia* 52, 45-63.
- Coluzzi M., Sabatini A., Della Torre A., Di Deco M. A., Petrarca V. (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* complex. *Science (Wash. DC)* 298, 1415-1418.
- Cooter R.J., 1989. Swarm flight behavior in flies and locusts. In : Goldsworthy, G.J. & Wheeler C.H. (Eds) *Insect flight*. Boca Raton Florida, CRC press pp 165-203.
- 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 Molecular Biology* 10, 9-18.
- della Torre A., Tu Z., Petrarca V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* ss molecular forms. *Insect Bioch Mol Biol*, 35, 7055-769
- Diabaté A., Baldet T., Brengues C., Kengne P., Dabiré K.R., Simard F., Chandre F., Hougard J.M., Hemingway J., Ouédraogo J.B., Fontenille D. (2003). Natural swarming behaviour in the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 713-716.
- Diabaté A., Dabiré K.R., Kengne P., Baldet T., Ouari A., Costantini C., Simard F., Fontenille D. (2006). Mixed-swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* in a sympatric area from Burkina Faso. *J. Med. Entolol* , 43 (3) 480-483.
- Di Deco M.A., Petrarca V., Villani F., Coluzzi M. (1980). Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di *Anopheles allevati* in laboratorio. *Parassitologia* 22, 304-306.
- Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sidén-Kiamos I., Louis C. (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Molecular Biology* 10, 19-23.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L., Ranson H., 2004. The molecular basis of insecticides resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol boil* 2004, 34: 653-665
- Marreli M.T., Li C., Rasgon J.L., Jacobs-Lorena M., 2007. Transgenic malaria resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proc Natl Acad Sci USA* [Epub ahead of print]
- Moreira LA., Wang J., Collins FH., Jacobs-Lorena M., 2004. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics* 166: 1337-1341.
- Persiani A., Di Deco M.A., Petrangeli G. (1986). Osserzioni di laboratorio su polimorfismi da inversione originati da incroci tra popolazioni diverse di *Anopheles gambiae* ss. *Ann. Istit. Sup. San.* 22, 221-224.

- Sperança M.A. & Capuno MA., 2007. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era-A review. *Mem inst Oswaldo cruz*, 4, 425-433
- Scott J.A., Brogdon WG., Collins F.H., 1993. Identification of a single specimen of *An. gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 520-529
- Sullivan R.T. (1981). Insect swarming and mating. *Florida Entomologist* 64, 44-65.
- Touré Y. T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maïga H.M., Sankaré O., Sow M., Di Deco M.A, Coluzzi M., 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40, 477-511.
- Tripet F., Touré Y.T., Taylor C.E., Norris D.E., Dolo G., Lanzaro G.C., 2001. DNA analysis transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology* 10, 1725-1732.
- Tripet F., Touré Y.T., Guimogo D., Lanzaro G.C. 2003. Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* revealed by DNA analysis of transferred sperm. *J. Med. Entomol.* 42 (4), 596-603.
- Tripet F., Thiemann T., Lanzaro G.C., 2005. Effect of seminal fluids in mating between M and S forms of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.* 42 (4), 596-603.
- Wondji C., Simard F., Fontenille D., 2002. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Molecular Biology* 11, 11-19.

Table 1: frequency of mixed swarms in Soumouosso and VK7 samples

Sampling period	Nb of swarms tested	<i>An. gambiae</i> M	<i>An. gambiae</i> S	Mixed swarm	%
VK7					
July-05	5	5	0	0	0
August-05	5	5	0	0	0
Oct-05	5	5	0	0	0
July-06	7	7	0	0	0
August-06	6	6	0	0	0
Sept-06	7	5	0	2	29
Oct-06	5	1	0	4	80
Soumouosso					
July-05	6	0	5	1	16
August-05	5	0	0	0	0
Sept-05	5	0	0	0	0
July-06	6	0	0	6	100
August-06	5	0	4	1	20
Sept-06	5	0	4	1	20
Oct-06	5	0	3	2	40

Table 2: Molecular identification of the pairing mosquitoes caught *in copula* in VK7 and Soumouso

Locality/Date	Nb of pairs tested	M pairs	S pairs	Mixed pairs	%
VK7					
July-06	13	13	0	0	0
Aug-06	24	24	0	0	0
Sept-06	24	22	2	0	0
Oct-06	63	17	43	3	4.7
Total	124	76	45	3	2.41
Soumouso					
July-06	1	0	1	0	0
Aug-06	15	0	15	0	0
Sept-06	8	0	7	1	12.5
Oct-06	1	0	1	0	0
Total	25	0	24	1	4

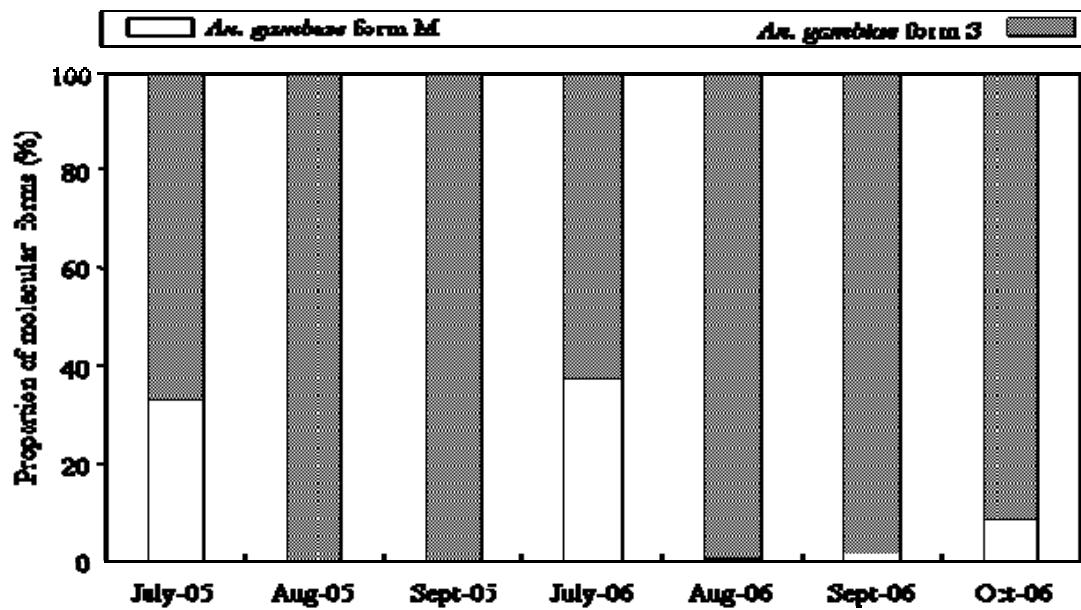


Fig. 1 Soumouso swarms - proportion of M and S molecular forms identified in samples of ~60 mosquitoes from at least 5 swarms per column (n ~ 300 mosquitoes per column).

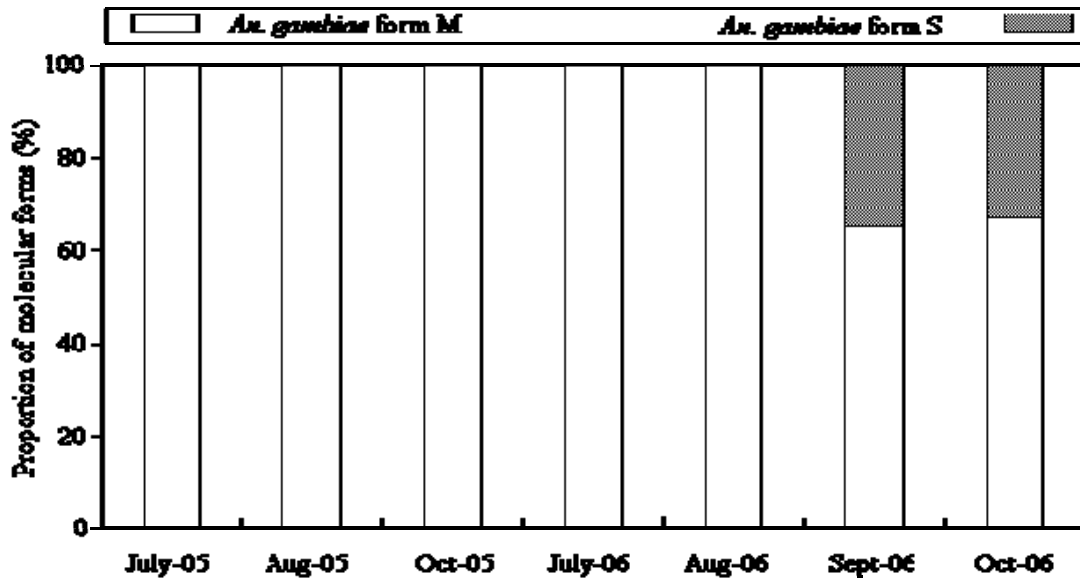


Fig. 2 Vallée du Kou (VK7) swarms - proportion of M and S molecular forms identified in samples of ~ 60 mosquitoes from at least 5 swarms per column (n ~ 300 mosquitoes per column).

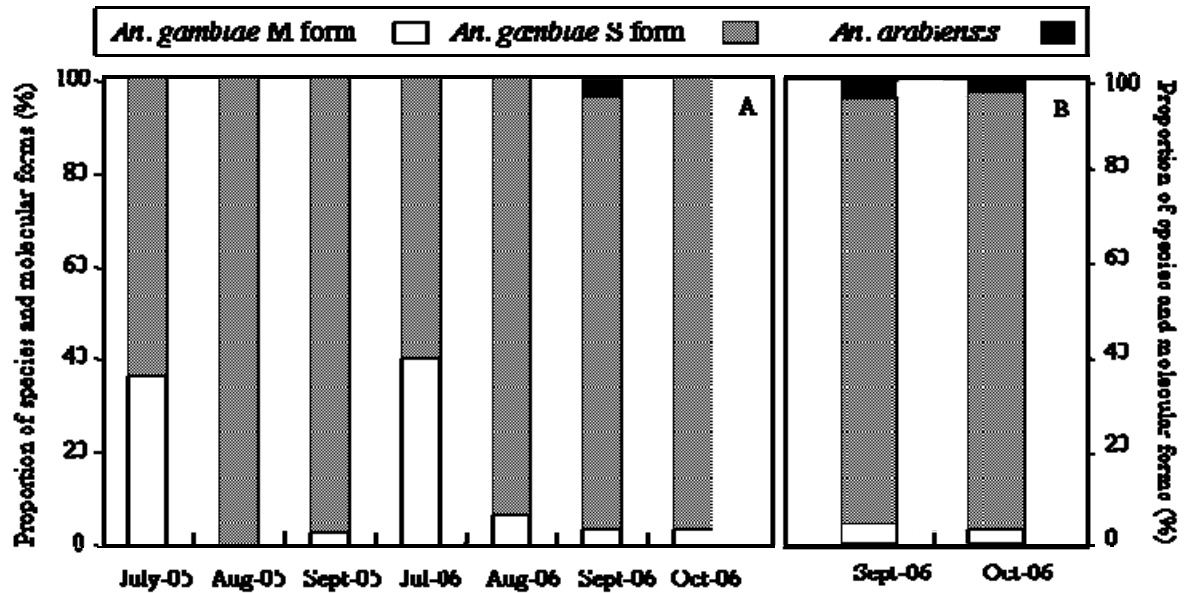


Fig. 3 Soumoussou resting site samples – proportion of species and molecular forms collected from A) indoor resting sites in village huts and B) outdoor resting sites in abandoned huts.

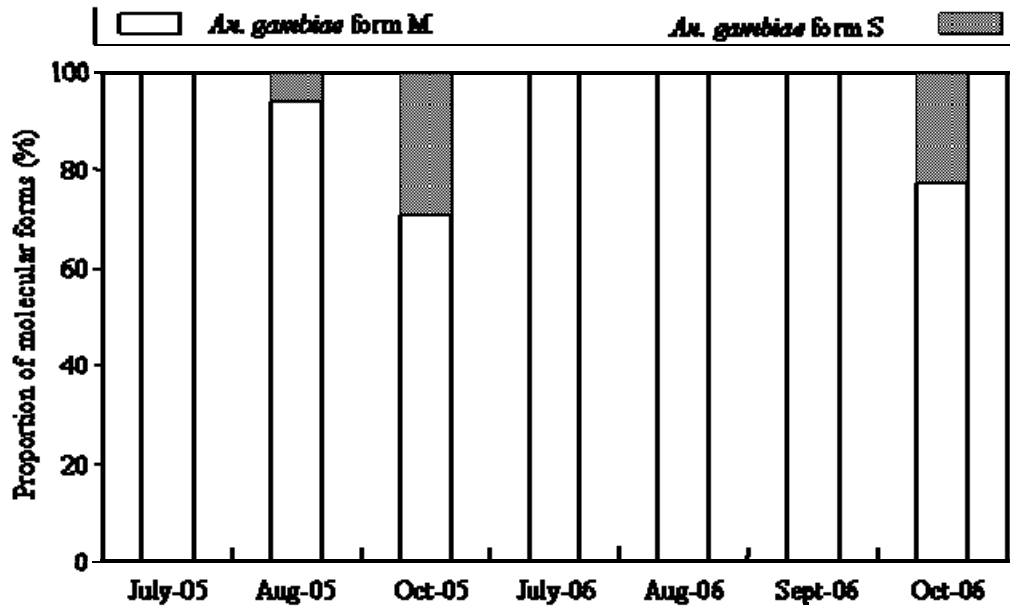


Fig. 4 Vallée du Kou (VK7) resting indoor site samples – proportion of species and molecular forms collected from indoor resting sites.

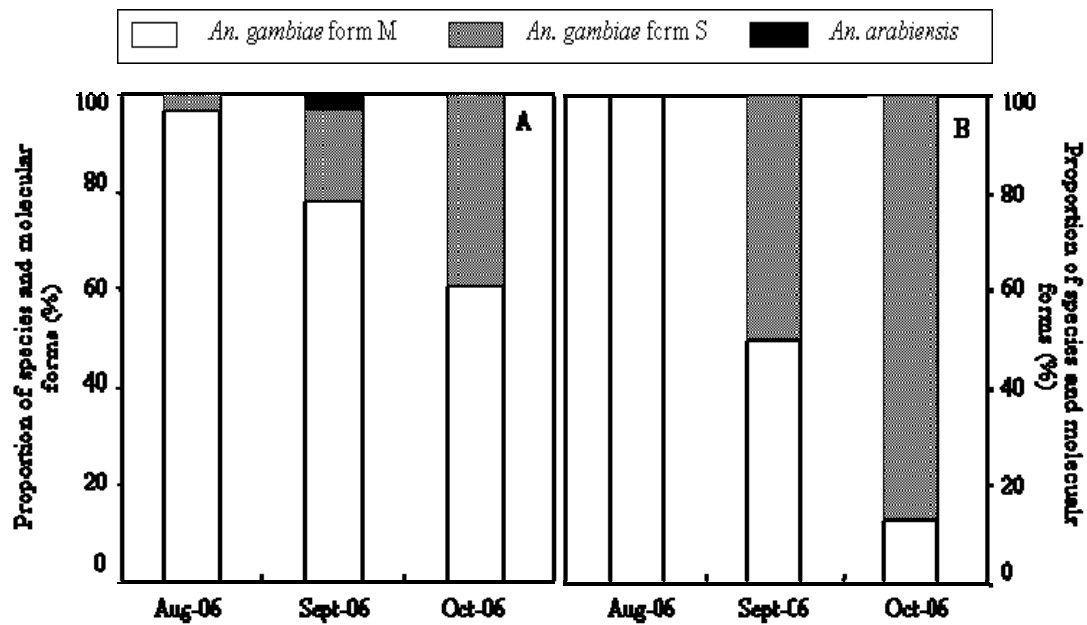


Fig. 5 Vallée du Kou (VK7) resting outdoor site samples – proportion of species and molecular forms collected from A) outdoor resting sites in abandoned huts and B) wood piles

Article 9

Diabaté A., **Dabiré K.R.**, Kim E.H., Dalton R., Millogo N., Baldet T., Simard F., Gimnig J.E., Hawley W.A., Lehmann T. (2005). Larval development of the molecular forms of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae) in Different Habitats: a transplantation experiment. *J. Med. Entomol.*, 42 (4): 548-553

Larval Development of the Molecular Forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Different Habitats: A Transplantation Experiment

ABDOULAYE DIABATÉ,¹ ROCH K. DABIRE,¹ EUN H. KIM,^{2,3} RYAN DALTON,^{2,3}
 NIAMA MILLOGO,¹ THIERRY BALDET,⁴ FREDERIC SIMARD,⁵ JOHN E. GIMNIG,^{2,6}
 WILLIAM A. HAWLEY,^{2,6} AND TOVI LEHMANN^{2,3,7}

J. Med. Entomol. 42(4): 548-553 (2005)

ABSTRACT We compared the development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. in different larval habitats. First stage larvae (L1s) of wild-caught females were placed into cages in natural habitats of the M form (rice fields) or the S form (puddles/quarries). Each cage was covered with cloth, allowing exchange of water, solutes, and small particles, including microorganisms, and was seeded with 100 L1s of a single form (M or S) or by a mixture of 50:50 of M and S forms. Emergence success of both forms in puddles and quarries was three-fold higher than in the rice fields. The emergence rate of the S form was higher than that of the M form in both habitats, but the form \times habitat interaction was not significant. In temporary larval sites such as puddles, emergence success of the M form was lower in mixed cages than in single form cages, whereas the reverse was true for the S form, suggesting competition between the forms. The median developmental time was not significantly different between forms. Although these findings demonstrate differences between forms, they do not suggest that their spatial segregation is determined by differences in their exploitation of the physical and chemical conditions in these environments. These results should be regarded with caution because small numbers of first stage larvae could pass through the cloth of the cages.

KEY WORDS *Anopheles gambiae*, molecular forms, development, temporary habitats, rice fields

Anopheles gambiae s.s., the major malaria vector in Africa, is well adapted to exploit various domestic and peridomestic environments (Coluzzi et al. 1979). Originally considered as a single species, cytogenetic evidence for heterogeneity within this taxon has accumulated (Coluzzi et al. 1985; Touré et al. 1994, 1998). Analysis of paracentric inversions revealed deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in many samples that led to the proposed division of the species into five chromosomal forms, named Mopti, Savanna, Bamako, Forest, and Bissau (Coluzzi et al. 1985). Molecular analysis, however, did not support the subdivision of *An. gambiae* into five incipient species but

suggested the existence of two different entities referred to as molecular forms M and S (della Torre et al. 2001, Favia et al. 2001, Gentile et al. 2001, Mukabayire et al. 2001, Wondji et al. 2002). In Burkina Faso and Mali, there is a correspondence between the M molecular form and the Mopti chromosomal form. Similarly, the S form corresponds to Savanna and to Bamako chromosomal forms. However, the correspondence between molecular and chromosomal forms breaks down outside this geographical region (della Torre et al. 2001). The taxonomic and phylogenetic interpretation of the chromosomal and the molecular forms remains unresolved (Lanzaro et al. 1998, Black and Lanzaro 2001, Tripet et al. 2001, della Torre et al. 2002, Lehmann et al. 2003), but it is widely agreed that a comparison of the ecology and epidemiological roles of the different forms is greatly needed regardless of their taxonomic significance.

Studies in West Africa have shown clinal variation in the frequencies of inversions (and in chromosomal forms) along ecological transects (Touré et al. 1994, 1998). The Savanna form is often found farthest from main rivers and from flooded/irrigated areas. Its immatures occur mainly during the rainy season and in rain-dependent habitats. The Mopti form is often found in drier conditions and in flooded/irrigated areas, such as rice fields (Touré et al. 1994). In contrast,

¹ IRSS/Centre Muraz, Laboratoire de Parasitologie/Entomologie BP 390 Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

² Entomology Branch, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 4770 Buford Highway, Chamblee, GA 30041.

³ Department of Biology, Emory University, Atlanta, GA 30322.

⁴ Centre International de Recherches Agronomiques pour le Développement Programme Econap, campus international de Baillarguet 34398 Montpellier Cedex, France.

⁵ IRD/OCEAC Yaoundé BP 288 Yaoundé, Cameroun.

⁶ Malaria Epidemiology Branch, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 4770 Buford Highway, Chamblee, GA 30041.

⁷ Current address: Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID, National Institute of Health, 12735 Twinbrook Parkway, Room 2W13A, Rockville MD 20852.

surveys in Mali, where M and S forms were sympatric, revealed that both co-occurred in many larval sites (Edillo et al. 2002), as was the case for *An. gambiae* and *An. arabiensis* in Kenya (Gimnig et al. 2001). The co-occurrence of forms does not necessarily mean that they have the same ability to exploit these shared habitats. The current study was designed to compare the capacity of the molecular forms to develop in different habitats.

Materials and Methods

Study Areas. We compared larval developmental success in M-typical and S-typical habitats by selecting areas where each form is found nearly exclusively. Throughout this article, larval site represents a body of water where we found *An. gambiae* larvae, whereas habitat represents either rice fields in Bama or rain-dependent puddles and quarries in Kuinima. The village of Bama located 30 km from Bobo Dioulasso and surrounded by rice fields was selected as a typical M-form environment because this form predominated in collections of adult mosquitoes throughout the year (>95%; Robert 1989, Diabaté et al. 2002). The district of Kuinima on the periphery of Bobo-Dioulasso was selected as a typical S-form environment, where this form predominates (>90%; Diabaté et al. 2002) in collections made during the rainy season. Larval habitats in Kuinima consist mostly on rain-filled puddles and quarries. Based on indoor-resting adult (A) collections and larval (L) samples taken before experiments, the M form dominated in the village closest to the rice fields (94% of A, $n = 99$; 92% of L, $n = 76$) and the S form dominated in Kuinima (92% of A, $n = 24$; 94% of L, $n = 36$).

Transplantation Cages. One or more sets of three cages were placed in each habitat. A set consisted of a single-form M cage, a single-form S cage, and a mixed form (M:S) cage 50:50 placed ≈ 1 m apart (Fig. 1). Cylindrical cages (35 cm in diameter, 48 cm in height) were constructed from a metal frame covered from the bottom to the middle with cloth screen, 0.206 mm in width by 0.221 mm in mesh height, to contain the larvae but allow exchange of water, solutes, small particles, and microorganisms (Fig. 1). From the middle to the top, the cage was covered with a cloth of larger mesh size to prevent adult mosquitoes from entering or exiting the cage. The upper cloth was fitted with a sleeve through which adult mosquitoes were aspirated from the cage. The cages were free of predators and secured to the ground with stakes.

Larvae, Transplantations, and Emerged Adults. Gravid and blood-fed *An. gambiae* females were collected in Bama and Kuinima and provided with sugar water for 48–96 h in the laboratory. At that time, they were individually transferred into oviposition cups. After they laid eggs, they were killed and preserved in 85% ethanol, and their molecular form was determined by polymerase chain reaction performed on a

single leg (Favia et al. 2001). Batches of 100 first instars, representing two to three families of each molecular form, were counted and quickly transferred into the field.

The cages were placed in sites where mixtures of *An. gambiae* developmental stages were observed (first or second stage larvae with either third or fourth stages or pupae). The cages were checked once a day, and emerged adults were collected until no pupae, larvae, or adults were observed for two consecutive days. Emerged adults were counted and preserved in 85% ethanol 24 h after emergence. All adults from mixed cages and 16 adults from each of the single-form cages were identified using the assay described by Fanello et al. (2002).

Data Analyses. Developmental success of the molecular forms in transplantation cages was measured by 1) the total number of male and female adults that emerged from each cage (adult emergence rate) and 2) the median developmental time of larvae in each cage. Because the number of larvae of each form (50) placed in the mixed form cages was different from that in the single-form cages (100), a separate analysis was performed for each type of cages. The total number of adults of each form in each cage and the median larval developmental time of each cage with seven or more emerging adults were subjected to an analysis of variance (ANOVA) or multiple analysis of variance (MANOVA) to test the effect of the molecular form, habitat (rice fields in Bama versus temporary pools/quarries in Kuinima), and their interactions. Statistical analyses were performed using SAS (SAS Institute 1999).

Results

In total, 2,445 adults were collected from 79 transplantation cages between day 5 and day 17 post-transplantation (pt). Molecular identification of adults (Fanello et al. 2002) was performed on 1,719 specimens comprising all adults that emerged in the mixed form cages and on 16 adults from each single-form cage. Unexpectedly, 30 *An. arabiensis* adults (1.7%) were found among the mosquitoes that emerged from 16 cages, suggesting that the screen used for cages allowed some larval immigration. Likewise, 61 adults collected in 53 single-form cages were of the “wrong” molecular form. Subsequent experiments revealed that first stage larvae could pass through the cloth in small numbers (≈ 3.5 per 100 during 24 h, and ≈ 7 in total because the larvae molt to the second instar stage by the time they are 3 d old). To minimize the effect of migration of L1 into the cages, we excluded from the analysis adults collected after the seventh day of emergence (day 11 pt), and all data from 11 cages with >6% of the adults belonging to the “wrong” molecular form. This procedure reduced the total number of adults to 1,657 (of which 1,112 were identified molecularly), the total number of *An. arabiensis* adults was reduced to seven (0.6%), and the total number of wrong molecular forms was reduced to seven, representing 2.6% of the adults collected in cages where this determi-



- M: single form cage with the M form
- S: single form cage with the S form
- M:S: mixed form cage with both M and S forms

Puddles and quarries

Rice field parcels

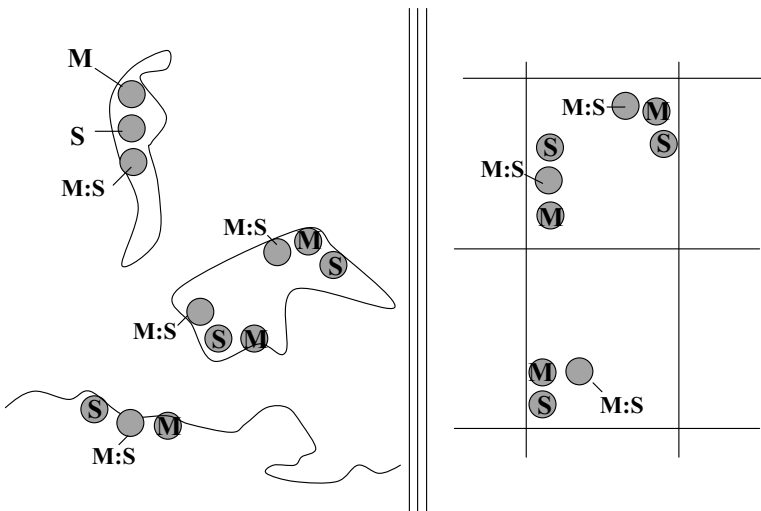


Fig. 1. Developmental time of larvae of the M and S molecular forms in different habitats by sex. Bar charts are based on all cages. Arrows represent the overall median developmental time after pooling males and females. Adults emerging after the day 11 post-transplantation were excluded (see text for details).

nation could be made (i.e., single-form cages of S larvae transplanted into rice fields dominated by M form and single-form cages of M larvae transplanted into puddles and quarries in Kuinima where S larvae dominated).

Adult Emergence Rate. Emergence success of males and females was similar (overall 857 females and 853 males, $df = 1, P > 0.8, \chi^2$ test; sex ratio difference from 1:1 was not significant when tested by habitat or by day of emergence). Accordingly, analyses were done on the total number of adults that emerged from each cage. Emergence success in the puddles and quarries near Kuinima was more than three-fold higher than in the rice fields (Table 2) for both forms regardless of the cage type (single-form and mixed-form), resulting in a significant habitat effect in both analyses (Table 1). Likewise, emergence success of the S molecular form was higher than that of the M form in both habitats (Table 2), but this difference was

highly significant in the mixed cages and not significant in the single-form cage type (Table 1). The interaction term form \times habitat was not statistically significant (Table 1).

To evaluate the role of interform competition, we tested the following predictions. In temporary habitats where the S form predominates, 1) emergence success of the M molecular form in the mixed form cages (with competitor) will be lower than that in the single-form cages (without competitor), whereas 2) the emergence success of the S form in the mixed form cages will be higher than that in the single-form cage because being a superior competitor in this habitat, intraform competition will affect the S form more negatively than interform competition with an inferior competitor. Corresponding predictions also were made for the rice fields where the M form predominates, with the reverse form relations. The results were tested using one-tailed Fisher's exact tests of four

Table 1. Emergence success (number of adults per cage) of the molecular forms in different habitats and transplantation cages

Source	Single form ($r^2 = 0.46$)			Mixed form ^a		
	df	F	P	df	Wilks' λ^c	P
Model	3	13.2	<0.0001	—	—	—
Habitat ^b	1	31.9	<0.0001	2/20	0.52	0.002
Form	1	3.2	0.08	1/21	0.68	0.005
Form \times habitat ^d	1	0.2	0.67	1/21	0.31 ^e	0.58
Error	38					

^a Number of adults (per cage) produced by both forms in the mixed form cages were subjected to MANOVA to test the effect of habitat and form simultaneously.

^b Habitat distinguishes between rice fields versus puddles and quarries.

^c Wilks' λ is a likelihood ratio test statistic commonly used in MANOVA.

^d In the mixed form cages, the test of form \times habitat interaction was performed using a single ANOVA on the ratio M:S per cage with habitat as the independent factor.

^e Mean square of the source and error terms are given in this column instead of the multivariate Wilks' λ .

contingency tables, contrasting the number of L1 that developed into adults and the number that failed to do so (columns) in each cage type (rows). The results are consistent with these predictions, but they are statistically significant only in temporary larval sites (Table 2). In the rice fields, there were minimal (and non-significant) differences between cage types of both forms possibly because of the lower overall density of developing larvae. Overall, these results provide some support for the hypothesis that competition plays a role in segregating the molecular forms, at least in temporary larval sites dominated by the S molecular form.

Larval Developmental Time. The median developmental time of males and females was not significantly different when tested over the whole data and separately for each form and habitat (paired *t*-test and paired Wilcoxon test performed on the difference between the median developmental time of the males and females in each cage, $P > 0.3$; Fig. 2). Thus, subsequent analyses were performed on the total number of adults.

The ANOVA model testing the effect of form, habitat, and their interaction on the median larval developmental time was applied to the cages with a minimum of six emerging adults during days 5–11 pt. Developmental time of both forms was longer in rice fields than in temporary sites near Kuinima (the average median developmental times \pm standard deviation were 9.6 ± 1.2 and 7.3 ± 1.7 days for the M form

and 8.7 ± 1.4 and 7.9 ± 1.4 days for the S form; Fig. 2). The effect of form and the interaction between form and habitat were not statistically significant (Table 3). There was no evidence of competition between forms affecting larval developmental times that were not longer in the mixed cages (Table 3).

Discussion

In arid environments of West Africa, where the Savanna and Mopti chromosomal forms correspond to the S and M molecular forms, respectively, these taxa differ in the way they exploit the environment because their spatial and temporal distributions are different (Coluzzi et al. 1979; Coluzzi 1999; Touré et al. 1994, 1998). Our study area reflects these differences as the M form predominated near the rice fields of Bama, whereas the S form predominated in Kunima, only 30 km away. If the M form is better adapted to rice fields and the S form is better adapted to temporary habitats (Sagnon et al. 2000), then we would expect the results of the transplantation experiment to reflect this difference. In contrast our results revealed that the developmental success of the S-form larvae was higher than that of the M form in both habitats. Although this finding demonstrates a difference between forms, it does not suggest that the spatial segregation between forms is determined by larval adaptations to different habitats. Possibly, the spatial segregation between forms is based on adaptive differences in the adult stage. Preferences for different oviposition sites remain to be studied, although it is probably related to the prospects of the larvae to successfully develop in the larval site. Alternatively, our transplantation cages did not represent all the conditions in the habitat, and in particular they excluded predators. Accordingly, predator avoidance in predator-rich permanent habitat such as a rice field may be the key adaptation of the M form, whereas the S form specializes in exploiting temporary habitats such as puddles, with low predation pressure. Finally, we cannot entirely rule out that movement of L1s in and/or out of the cages confounded our results (but see below).

The average developmental time of both forms was shorter in temporary habitats than in rice fields, and adult emergence rate was considerably higher in the former sites. Possibly, the average temperature in rice fields is lower than in puddles, explaining the difference in the habitat productivity. Our results suggest that the lower productivity of rice field sites is “com-

Table 2. Emergence success of the molecular forms in mixed and single-form cages

Cage type	Temporary larval sites (Kuinima)		Rice fields	
	M form	S form	M form	S form
Mixed form	34.4% (155/450)	58.7% (264/450)	9.7% (68/700)	15.6% (109/700)
Single form	39.8% (171/600)	53.6% (589/1100)	7.8% (70/900)	16.2% (259/1,600)
Fisher's one-tailed exact test	$P = 0.042$	$P = 0.037$	$P > 0.17$	$P > 0.6$

The proportion of adults produced per first stage larvae was derived by pooling across all cages corresponding to each group. Number of adults produced over the number of first stage larvae are in parentheses (see text for details).

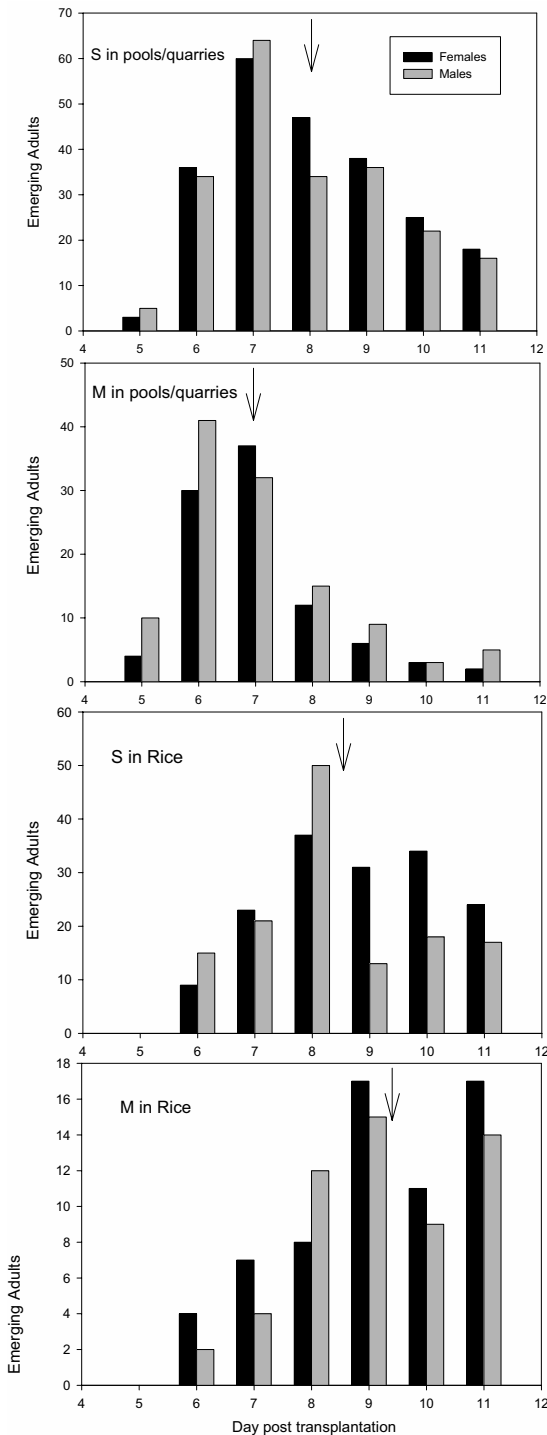


Fig. 2. A picture of a transplantation cage and a schematic showing the experimental design.

pensated” by the abundance of larval sites in rice cultivation areas (year-round).

Observing that the M form in tropical savannah areas of West Africa is found almost exclusively and at

Table 3. ANOVA for developmental time of the molecular forms in different habitats and transplantation cages

Source	ANOVA model ($r^2 = 0.28$)		
	df	F	P
Model	7	3.4	0.004
Habitat	1	11.9	0.001
Form	1	0.2	0.65
Form × habitat	1	2.2	0.14
Cage type	1	0.1	0.80
Habitat × cage type	1	0.5	0.47
Form × cage type	1	0.4	0.42
Habitat × form × cage type	1	2.3	0.13
Error	61		

very high densities near rice fields, even where they are surrounded by areas dominated by the S form, Robert (1989) suggested that competitive exclusion of the S form by the M form in rice fields is involved. Our results provide some evidence in support of this hypothesis, albeit in temporary habitats, based on the lower emergence success of the M form in mixed cages compared with that in single-form cages, and the higher emergence success of the S form in mixed cages compared with that in single-form cages. Nevertheless, the observed differences seem modest and therefore suggest that competition contributes to the sharp spatial segregation between forms rather than fully explains it. The lower density of larvae in the rice fields might have been below the level in which competition (inter- and intraform) would be manifested. Importantly, these results reflect predator-free settings; therefore, they are compatible with the hypothesis that predation is important for the segregation of larval sites. Currently, we are conducting studies to evaluate this hypothesis.

Our results suggest that both forms successfully exploit different habitats with regard to the chemical, physical, and microbiological conditions and that larval competition between forms is a process of some importance in the spatial segregation between forms. However, our results should be considered preliminary because movement of first stage instars through the cloth of the transplantation cages may have confounded our results. The estimate of total immigration into the cage was low (<3%). Assuming that emigration out of the cage did not differ between molecular forms and between habitats, our results are expected to hold true. Importantly, our main conclusion is conservative with respect to immigration into the cages. Because in the rice fields dominated by the M form, migration into the cages would involve M larvae, and in the temporary larval sites near Kuinima, migration would involve S larvae, the stronger this migration is, the more pronounced should be the form × habitat interaction. Contrary to this expectation, the interaction was nonsignificant, lending support to the perception that the effect of the movement of first instars through the mesh was negligible.

Acknowledgments

We are grateful to T. Kabero, A. Ouari, S. Mamourou, T. Souleymane, and T. Ibrahim for help in mosquito collection. The cooperation of many villagers facilitating our work in rice fields and gardens is deeply appreciated. Special thanks for the editor and two anonymous referees for providing helpful comments on earlier versions of this article.

References Cited

- Black, W. C., and G. C. Lanzaro. 2001. Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.: introgressive hybridization, adaptive inversions, or recent reproductive isolation? *Insect Mol. Biol.* 10: 3–7.
- Coluzzi, M. 1999. The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia* 41: 277–283.
- Coluzzi, M., A. Sabatini, V. Petrarca, and M. A. Di Deco. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 483–497.
- Coluzzi, M., V. Petrarca, and M. A. Di Deco. 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.* 52: 45–63.
- della Torre, A., C. Fanello, M. Akogbeto, J. Dossou-Yovo, G. Favia, V. Petrarca, and M. Coluzzi. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. *Insect Mol. Biol.* 10: 9–18.
- della Torre, A., C. Costantini, N. Besansky, A. Caccone, V. Petrarca, J. R. Powell, and M. Coluzzi. 2002. Speciation within *Anopheles gambiae*—the glass is half full. *Science* (Wash. DC) 298: 115–117.
- Diabaté, A., T. Baldet, F. Chandre, M. Akogbeto, T. R. Guiguemdé, F. Darriet, C. Brengues, P. Guillet, J. Hemingway, G. Small, et al. 2002. The role of agricultural insecticides in *Anopheles gambiae* s.l. resistance to pyrethroids in Burkina Faso, West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 617–622.
- Edillo, F. E., Y. T. Touré, G. C. Lanzaro, G. Dolo, and E. T. Taylor. 2002. Spatial distribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Banambani village, Mali. *J. Med. Entomol.* 39: 70–77.
- Fanello, C., F. Santolamazza, and A. della Torre. 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med. Vet. Entomol.* 16: 461–464.
- Favia, G., A. Lanfrancotti, L. Spanos, I. Sidén-Kiamos, and C. Louis. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Mol. Biol.* 10: 19–23.
- Gentile, G., M. Slotman, V. Ketmaier, J. R. Powell, and A. Caccone. 2001. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 10: 25–32.
- Gimnig, J. E., M. Ombok, L. Kamau, and W. Halley. 2001. Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in western Kenya. *J. Med. Entomol.* 38: 282–288.
- Lanzaro, G. C., Y. T. Touré, J. Carnahan, L. Zheng, G. Dolo, S. Traore, V. Petrarca, K. D. Vernick, and C. E. Taylor. 1998. Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14260–14265.
- Lehmann, T., M. Licht, N. Elissa, B. T. Maega, J. M. Chimumbwa, F. T. Watsenga, C. S. Wondji, F. Simard, and W. A. Hawley. 2003. Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *J. Hered.* 94: 133–147.
- Mukabayire, O., J. Caridi, X. Wang, Y. T. Touré, M. Coluzzi, and N. J. Besansky. 2001. Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single-copy loci. *Insect Mol. Biol.* 10: 33–46.
- Robert, V. 1989. La transmission du paludisme humain: la zone des savane d'Afrique de l'Ouest. Mémoire de thèse Université Paris 6, Paris, France.
- Sagnon, N. F., C. Costantini, A. della Torre, and M. Coluzzi. 2000. Random distribution of larval populations of sympatric members of the *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso. SOIPA XXI (abstr.) *Parassitologia* 42: 157.
- SAS Institute. 1999. SAS version, 8th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Touré, Y. T., V. Petrarca, S. F. Traoré, A. Coulibaly, H. M. Maïga, O. Sankaré, M. Sow, M. A. Di Deco, and M. Coluzzi. 1994. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.s. in Mali, west Africa. *Genetica* 94: 213–223.
- Touré, Y. T., V. Petrarca, S. F. Traoré, A. Coulibaly, H. M. Maïga, O. Sankaré, M. Sow, M. A. Di Deco, and M. Coluzzi. 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477–511.
- Tripet, F., Y. T. Toure, C. E. Taylor, D. E. Norris, G. Dolo, and G. C. Lanzaro. 2001. DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol. Ecol.* 10: 1725–1732.
- Wondji, C., F. Simard, and D. Fontenille. 2002. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol. Biol.* 11: 11–19.

Received 29 June 2004; accepted 31 December 2004.

Article 10

Diabaté A., **Dabiré K.R.**, Heidenberger K., Crawford J., William L., Culler L., Lehmann T., (2008). Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC, Evolutionary Biology* 2008, **8**:5 doi:10.1186/1471-2148-8-5

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation

BMC Evolutionary Biology 2008, **8**:5 doi:10.1186/1471-2148-8-5

Abdoulaye Diabate (a_diabate@hotmail.com)
Roch K Dabire (dabire_roch@hotmail.com)
Kyle Heidenberger (heidenbk@lafayette.edu)
Jacob Crawford (jacobecrawford@gmail.com)
William O Lamp (lamp@umd.edu)
Lauren E Culler (leculler@gmail.com)
Tovi Lehmann (tlehmann@niaid.nih.gov)

ISSN 1471-2148

Article type Research article

Submission date 14 August 2007

Acceptance date 11 January 2008

Publication date 11 January 2008

Article URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/5>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

© 2008 Diabate *et al.*, licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*:
role of predation**

Abdoulaye Diabaté^{1,2}, Roch K. Dabiré², Kyle Heidenberger¹, Jacob Crawford¹, William O. Lamp³, Lauren E. Culler³, and Tovi Lehmann¹

1: Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID, National Institute of Health,
12735 Twinbrook Parkway, Room 2W13A, Rockville MD 20852 USA.
adiabate@niaid.nih.gov; heidenbk@lafayette.edu; jacobecrawford@gmail.com;
tlehmann@niaid.nih.gov

2: IRSS/Centre Muraz, Laboratoire de Parasitologie/Entomologie BP 390 Bobo
Dioulasso, Burkina Faso. dabire_roch@hotmail.com

3: Department of Entomology University of Maryland College Park, MD 20742-4454
USA lamp@umd.edu; leculler@gmail.com

Corresponding author:

DIABATE Abdoulaye

Laboratory of Malaria and Vector Research

National Institutes of Allergy and Infectious

Diseases. 12735 Twinbrook Parkway. Room

2E-28B (TWB3)

Rockville MD 20852

Phone: 301 451 6084

Fax: 301 480 2038

E-mail: adiabate@niaid.nih.gov

Abstract

Background

The molecular forms of *Anopheles gambiae* are undergoing speciation. They are characterized by a strong assortative mating and they display partial habitat segregation. The M form is mostly found in flooded/irrigated areas whereas the S form dominates in the surrounding areas, but the ecological factors that shape this habitat segregation are not known. Resource competition has been demonstrated between species undergoing divergent selection, but resource competition is not the only factor that can lead to divergence.

Results

In a field experiment using transplantation of first instar larvae, we evaluated the role of larval predators in mediating habitat segregation between the forms. We found a significant difference in the ability of the molecular forms to exploit the different larval sites conditioned on the presence of predators. In absence of predation, the molecular forms outcompeted each other in their respective natural habitats however, the developmental success of the M form was significantly higher than that of the S form in both habitats under predator pressure.

Conclusion

Our results provide the first empirical evidence for specific adaptive differences between the molecular forms and stress the role of larval predation as one of the mechanisms contributing to their divergence.

Background

Divergent natural selection between populations inhabiting different ecological environments has long been thought to be a major cause of speciation [1]. Whereas there are now more examples of this process, the underlining mechanisms have been rarely examined [2]. Resource competition has been demonstrated between species undergoing divergent selection in some cases including seed-eating rodents [3], gerbil species [4], and sticklebacks [5]. The role of other mechanisms, such as predation, has long been discussed but remained controversial [6]. Part of the controversy stems from the fact that predation is extremely difficult to study in the field. Using a transplantation experiment, we demonstrated that the molecular forms of *Anopheles gambiae* differ in their ability to exploit different larval habitats and we provide evidence that larval predation contributes to the divergent selection involved.

The African malaria mosquito, *An. gambiae* is undergoing speciation [7,8], and yet the evolutionary forces that have been separating subpopulations of this species are not known. Coluzzi and others have hypothesized that human-made modifications of the African environment have created new ecological niches in marginal habitats and, thus, new opportunities for specialisation for this mosquito species [7,9,10]. Five chromosomal forms were identified in *An. gambiae*: Forest, Savanna, Bamako, Mopti, and Bissau [7,8]. Subsequent studies revealed two “molecular” forms (M and S) characterized by fixed nucleotide differences in the intergenic spacer of the ribosomal DNA [11]. The incomplete correspondence between the chromosomal and the molecular forms [12] complicated their taxonomic resolution as were the findings of low genetic differentiation between the forms in all genomic regions except the inversion and near the rDNA [13-

17]. Although a strong deficit of M/S hybrids is observed in the field [12], the forms interbreed in the laboratory and their offspring are viable and fertile [18]. Recent studies provide support for genetic differentiation between the forms in a few limited spots of the genome [19,20]. These authors suggested that the genes in these spots called ‘speciation islands’ are responsible for the premating reproduction barrier [21,22] and the ecological adaptation of the forms to specific environments.

Ecological studies revealed a strong pattern of spatial and temporal segregation between the molecular forms, with the M form associated with drier conditions than the S form [8,23,24]. Most segregation occurred between rice cultivation areas, dominated by the M form, and their surrounding areas that are dominated by the S form, suggesting that segregation between the forms is related to the larval habitats. A previous study that evaluated differences in the capacity of larvae of the molecular forms to exploit rice fields and puddles in the absence of predators found no evidence for such adaptation when the forms were separated [25]. However, when cohabiting the same site the S form outcompeted the M form [25]. These findings prompted us to evaluate the mediating effect of larval predation on the development success of the molecular forms in these habitats.

Habitat selection is among the most important decisions that a female mosquito makes, since it determines the fate of her offspring. Factors that strongly affect the prospects of mosquito larvae include desiccation, nutrients, competition, and predation. Several studies have stressed the role of predators in controlling mosquito population sizes in the field. An overall estimate of 94% mortality of larvae due to predation was reported highlighting the huge selection pressure exerted on mosquito populations [26,27]. Theory

suggests that the strength of divergent selection is mainly determined by the rate at which interspecific competition is alleviated with increasing phenotypic distance between individuals. If the molecular forms differ in their antipredator response leading to increased habitat segregation and reduce resources overlap, then divergent selection will become stronger [2]. Predator pressure in rice fields is higher than in temporary puddles [28-30]. Accordingly, we hypothesized that predation is the key factor that shapes the segregation pattern in the occupation of larval sites, hence dictates the micro-geographic distribution of the forms. The following predictions were tested: (i) under predator pressure, developmental success of the M form larvae will increase whereas that of the S form will decrease in both habitats. (ii) in absence of predator pressure, developmental success of the S form larvae will increase whereas that of the M form will decrease in both habitats. In a field experiment using transplantation of first instar larvae, we estimated development capacity of the molecular forms in both temporary (puddle) and permanent (rice fields) larval sites in the presence versus absence of predation. Here we present evidence that the molecular forms have adapted to different types of larval sites (habitats) and discuss the evolutionary implications for speciation in *An. gambiae*.

Results

Overall developmental success

In a field experiment using transplantation of first instar larvae (Fig. 1), we evaluated the fitness of the molecular forms, measured as the emergence success of adults and their developmental time, in rice fields and puddles with or without predation effect. A total of 19 pairs of cages (38 cages in total) were set in nine puddles and in ten rice

paddies during the rainy season of 2004 (May-October 2004). Five cages were damaged by floods caused by heavy rains or by children before all adults were collected. These cages were excluded from all data sets. In total, 3,710 adults were collected from 33 transplantation cages and species identification was performed on 3,629 adults (81 specimens were lost before identification).

Emergence success was over three fold higher in predator free cages than in cages with predators (164.8 adults/cage and 49.6 adults/cage respectively) reflecting a strong predator effect on larval success. Puddles were significantly more productive than rice fields in absence of predation (212 adults/cage and 117.56 adults/cage respectively; $df = 1$, $P = 0.012$, Fig. 2), but no difference between habitat was detected in presence of predators ($df = 1$, $P = 0.635$, Fig. 2). Emergence success of males and females was similar (overall 1,868 females and 1,844 males; $df = 1$, $P = 0.645$, χ^2 test).

Predator composition and abundance in rice fields and puddles

Predators were sampled in all larval sites where experimental cages were transplanted (see Materials and Methods) and their numbers were subjected to a MANOVA test to evaluate difference in their abundance and composition between habitats. Five predatory taxa were identified in this series of experiments as Hemiptera: Notonectidae, *Anisops* sp. and *Anithares* sp. (backswimmer), Hemiptera: Corixidae, *Micronecta* sp. (water boatman), Odonata: Libellulidae, *Tramea* sp. (dragonfly), and two adult beetles, Coleoptera: Hydrophilidae, *Berosus* sp. and Coleoptera: Dytiscidae, *Laccophilus* sp. The results showed that the number of predators was higher in rice fields than in puddles (Fig. 3, $F = 8.78$, $df_1=5$, $df_2=12$, $P = 0.0011$). Backswimmers were the

most abundant predators in both rice field and puddles with a mean collection of 45.7 and 21.8 predators/m² respectively. A significant difference in predator composition between habitats was found using a Principal Component analysis (Fig. 3).

Developmental success of the molecular forms

Stratified contingency table analyses by habitat showed that predation increased the developmental success of the M form ($P=0.0004$, $df=1$, Table 1). In separate analysis for each habitat this pattern was significant in puddles ($P=0.0006$, Table 1), but although the same trend was found in rice fields, the difference was not significant ($P > 0.124$, Table 1). Without predation, the molecular forms exhibited a higher developmental success each in its natural habitat ($P < 0.0001$, Table 1) in an apparent contrast to our previous study [25] (see Discussion). A logistic regression analysis accommodating variation among cages with habitats showed a significant effect of both predation and habitat on the success of the forms ($P < 0.0001$ and $P = 0.0019$ respectively, Table 2). Consistent with the contingency table analyses (above), predation increased the developmental success of larvae of the M form in both habitats, and each form displayed a higher developmental success in its typical habitat. No predation*habitat interaction effect was detected, hence the effect of predation on the emergence success of the forms was similar across habitats ($P = 0.13$, Table 2). Mosquito sex and its interactions with habitat ($P = 0.69$) or with predation ($P = 0.93$) were not significant suggesting that predators feed upon males and females equally across habitats (data not shown). The effect of individual predator species on developmental success of the forms was evaluated using logistic analysis (Table 3). Higher density of predators belonging to

Notonectidae and Dytiscidae families increased the relative success of the M form ($P < 0.0001$ and $P = 0.02$ respectively Table 3). Notably, higher density of Libellulidae and Hydrophilidae specimens appeared to decrease the relative success of the M form, but their effects were not significant.

Developmental time

Overall, the developmental time was shorter in cages with predators than without predators (8.74 vs. 9.55 days; $F = 110.02$, $df=12$, $P < 0.0001$), probably reflecting the diminished number of larvae surviving predation over time. Therefore, we used predator free cages to compare differences in developmental time between the molecular forms. As expected, males developed slightly faster than females in both habitats ($P < 0.0001$, Table 4; Fig. 4) and both sexes developed faster in puddles ($P < 0.0001$, Table 4; Fig. 4) as previously reported [25]. Importantly, the S form developed faster than the M form across habitats ($P < 0.0001$, Table 4, Fig. 4).

Discussion

The ultimate objective of this study was to identify ecological differences between the molecular forms of *An. gambiae* that might reflect the evolutionary forces producing their divergence. Prompted by the failure to detect adaptive difference between forms in predator free settings [25], we evaluated the role of larval predators in mediating divergent selection that explains the sharp habitat segregation exhibited by the forms with respect to rice cultivation areas vs. surrounding savanna. We found significant difference in the ability of the molecular forms to exploit the different larval sites conditioned on the presence of predators. In absence of predation, the molecular forms outcompeted each other in their natural habitats (S form being better in puddles and M form being better in rice fields) however, the developmental success of the M form was higher than that of the S form in both habitats under predator pressure. Consistent with the previous study which emphasized the role of competition at least in puddles [25], our results suggest that both competition and predation shape the pattern of habitat segregation exhibited by the molecular forms; the S form outcompeting the M form in temporary low predation larval sites, and the M form being better in permanent larval sites with high predation. The implications of these results extend beyond the geographical and environmental segregation between the molecular forms into the processes involved in their divergence.

The ecological and genetic processes of species formation are key to understanding how biological diversity is generated. The molecular forms of *An. gambiae* have been extensively studied for the last decade, and yet the exact mechanisms of their divergence are obscure. So far, few experimental studies have been designed to look at phenotypic traits between the forms and all failed to find consistent differences between

them [31,32]. This is the first empirical evidence for specific adaptive differences between the molecular forms and it stresses the role of larval predation as one of the mechanisms contributing to their divergence [7,8,15,17,19,20,22]. Dobzhansky believed that speciation in *Drosophila* proceeds mainly through evolving physiological complexes which are successful each in its environment [33] and Mayr recognized that many of the accumulative genetic differences between populations, particularly those affecting physiological and ecological characters, are potential isolating mechanisms [34]. Recently, several studies have provided evidence in support of divergent selection as evolutionary force driving speciation in different species. A manipulative field experiment using enclosures showed that both competition and predation served as mechanisms of adaptive radiation in *Timema* stick insects [6,35] and that predation promotes premating isolation [36] in walking-sticks.

Among the various natural ecologic forces controlling vector populations, predation seems to be the most important. Predator species may vary across a prey species' range [27] but we emphasize that predators manipulated in our experiment probably represent the key predators of *An. gambiae* since independent studies on larval predators of *An. gambiae* in East Africa [26,27] have identified key larval predators that match those found in our study. A generalization of our results depends on how much predators in *An. gambiae* larval sites rely on this mosquito rather than on other prey and to what extent medium and large larval sites used in this study account for *An. gambiae* total productivity? Predators certainly prey on a variety of small aquatic invertebrates but not much is known about the diet of these predators in larval sites of *An. gambiae*. Service [27] could not identify alternative prey in *An. gambiae* larval site in Kenya,

therefore concluded that predation was mainly limited to *An. gambiae*. We have found larvae of other mosquito species in the same sites only on few occasions suggesting that *An. gambiae* was probably the main prey that predators could feed on. Additionally, medium and large larval sites as used in this experiment probably represent the typical conditions *An. gambiae* grows in as studies on larval sites predators revealed. Mutuku and collaborators have found that larger sites such as quarries produced more adult mosquitoes and accounted for about 85% of *An. gambiae* adults [37]. Small larval sites, such as hoof prints promote larval development but fail usually to produce pupae. High probability of desiccation of the small larval sites was an important factor accounting for their failure to support complete development.

Recent study has revealed cannibalism and predation among larvae of *An. gambiae* complex [38] but we suspect such predation between the molecular forms of *An. gambiae* to be minor since our results indicated that the emergence success of the forms was over three fold higher in predator free cages than in predator present cages. Further our experiment consisted of transplanting L1s so variation in larval size was minimized. The mechanism conferring predation avoidance in the M form is not known. Juliano and Graves have shown that the co-evolution of predator and its prey can rapidly select for divergence in prey behaviour [39]. Aquatic animals use chemical cues for behavioural decision making relating to foraging, reproduction and the assessment of predation risk [39,40]. Defensive responses of prey to predators include increased use of refuge [41], reduced foraging and change in rate of movement [42]. The S form larvae develop faster than those of the M form in both habitats probably as a mechanism to avoid larval site desiccation. This likely requires more active foraging that increases exposure to predators

and outweighs the benefit of shorter development time. Recently a molecular assay to detect predation on *An. gambiae* larval stages in the gut of different predators was developed. This assay can be used to follow up on the dynamic and the structure of both predators and the molecular forms of *An. gambiae* in different ecological environments.

Divergence between populations of species inhabiting freshwater bodies based primarily on the length of hydroperiod has been proposed for a number of species. Rice fields are relatively permanent larval sites whereas rain puddles, especially early in rainy season represent extremely ephemeral bodies of water. The temporal fluctuation in the availability of temporary versus permanent larval sites explains the seasonal change in the frequencies of the forms, whereby the M dominates in the dry season when only permanent larval sites are available and the S in the rainy season as well as the corresponding latitudinal cline [8,24,43]. In locations where predation pressure is intermediate, both forms may be similarly successful, which might explain the high rate of cohabitation in an area where the forms were sympatric [44]. We propose that similar differences are found between *An. arabiensis* and *An. gambiae* in East Africa where the former fills the niche of the M form in West Africa [45]. Our results highlight the role of larval rather than adult adaptations as the life stage that drives this turnover.

Natural selection should favour females that oviposit in sites providing the best available conditions for their progeny. Ovipositing mosquito females challenge in their life time desiccation and predation. Our results showed that rice fields and puddles contrast significantly in the number of aquatic predators and we assume that in the prospect of ovipositing M and S females, these larval sites are different. Because the prospects of larvae in different habitats depend on their molecular form, it is expected

that female's oviposition site selection has been under selection accordingly [46]. The observed geographical and ecological segregation between forms is probably augmented by female choice of oviposition site.

Conclusion

Uncovering the ecological and genetic mechanisms of species differentiation is a key to understanding how biological diversity is generated. Many studies are ongoing to better understand the process of speciation within *An. gambiae*. While previous studies failed to provide evidence in support of this differentiation, recent data are emerging in support of M and S distinctions. The results of the present study are consistent with this idea. We found consistent differences in the ability of the forms to exploit different larval sites and identified the ecological agents involved. Both larval predation and inter-form competition may commonly serve as mechanism of divergent selection [6].

Methods

Study areas. The rice fields surrounding the village of Bama, located 30 km from Bobo Dioulasso, Burkina Faso, were selected as a typical M-form environment. The district of Kuinima on the periphery of Bobo-Dioulasso was selected as a typical S-form environment. A detail description of these areas is found in [25]. In each area, only one form predominates (>90%) during the rainy season [47].

Predator identification

In each habitat, at least five larval sites were sampled prior to the transplantation experiment to identify the main predators in these sites. After sighting of *An. gambiae* larvae, a cylinder (70 cm diameter 80 cm height) was quickly pushed into the mud to contain the water column over a constant sampling surface. All visible macro-invertebrates were collected and the bulk of water and upper layers of mud/rocks were carefully inspected in white pans to find hidden organisms. Invertebrates were brought to the laboratory of IRSS/Centre Muraz to assess their role as predators. They were sorted under a dissecting scope and one specimen of every “type” of invertebrate was placed in a pan (30 cm diameter, 10 cm deep) filled with 0.5 litre of deionised water, with 10 first or second instar larvae and 10 third or fourth instar larvae of *An. gambiae*. One control pan with the same larval composition, but without a predator was included in each set of experiments. Surviving larvae after 24 hrs were counted and observed predation events were recorded. Three to five replicate experiments were conducted with every predator type. If predation was observed in at least 2/3 of the experiments with the same taxon, it was considered a predator. Five predatory taxa were identified in this series of experiments as Hemiptera: Notonectidae, *Anisops* sp and *Anithares* sp. (backswimmer), Hemiptera: Corixidae, *Micronecta* sp. (water boatman), Odonata: Libellulidae, *Tramea* sp. (dragonfly), and two adult beetles, Coleoptera: Hydrophilidae, *Berosus* sp. and Coleoptera: Dytiscidae, *Laccophilus* sp. We believe that these five taxa represent the key larval predators in our study area.

The transplantation cages.

Cylindrical cages (diameter=70 cm, height=80 cm) made of metal frame were

fitted from the bottom to the middle with a cloth to contain the larvae but allow exchange of water, small particles, and microorganisms. The cloth's pore was elliptic with mean length of 0.12 mm (SD=0.04) and mean width of 0.08 mm (SD=0.026). From the middle to the top, the cage was covered with a regular mosquito net to prevent adult mosquitoes and other invertebrates from entering or exiting the cage. The upper cloth was fitted with a "sleeve" through which adult mosquitoes were aspirated from the cage. The cage was secured to the ground using three stakes.

Larvae transplantation and adult collection.

Gravid and bloodfed *An. gambiae* females were collected indoors in Bama and Kuinima and provided with 5% sugar water for 48-96 hours in the laboratory. At that time, they were individually transferred into oviposition cups. After they laid eggs, the females were preserved in 85% ethanol and their molecular form was determined by PCR performed on a single leg [11].

Batches of 200 one day old larvae, representing 2-3 families of each molecular form, were counted, placed in 50ml plastic bag, and quickly transferred into the field (Fig. 1). In each larval site, defined as a body of water where larvae of *An. gambiae* could be detected, two cages were placed approximately 1 m apart (pairs of cages in the same habitat were at least 10 m apart). A total of 400 larvae of both molecular forms (200 M: 200 S) were placed into each cage and predators found *in situ*, were added into one cage whereas the other remained predator free. To collect predators, a bottomless cage was inserted into the mud and secured, the bulk of the water and top mud layer were removed into pans and predators were collected, identified and counted. Then the cloth was

inserted into the frame and secured. To complete the cage setup, previously collected and dried mud (from the same area) was introduced and formed a shallow and narrow (approximately 5 cm wide) edge covering approximately 1/3 of the periphery of the cage to serve as refuge against predators. When water levels stabilized, the larvae were introduced slowly into the cage. Half the number of each type of predator collected *in situ* were introduced into the cage 15 minutes after the larvae were added (remaining predators were preserved). No more than five notonectids were added into any cage even if more than ten were collected because earlier experiments indicated that no adults were produced in cages with higher numbers of notonectids. All the cages were secured with stakes.

After setup, cages were checked daily and emerged adults collected until no pupae, larvae, or adults were observed for two consecutive days. Emerged adults were counted and preserved in 85% ethanol 24 hours after emergence. Their molecular form was determined by a PCR-RFLP assay [48].

Data Analyses.

Developmental success of the molecular forms in transplantation cages was measured by the total number of adults that emerged from each cage and by larval developmental time. The total number of adults of each form in each habitat with- and without predation was analyzed using contingency table Chi Square test to examine overall trends. Logistic regression analyses were used to accommodate variation among cages to test the effects of the habitat, predation, sex, cage set (consisting pair of cages set approximately 1 m apart in the same larval site), and their interactions on the probability

to produce M vs. S adult. An analysis of variance (ANOVA or MANOVA) was performed to compare the larval developmental time (treated as a continuous variable) and the predator density in the different habitats. Principal Component analysis was used to evaluate the difference between habitats in their predator profile. Statistical analyses were performed using SAS [49].

Authors' contributions

The work presented here was carried out in collaboration between all authors. DA, LT and DKR designed the study. DA carried out the field and laboratory work, participated in the analysis of data, interpreted the results and wrote the paper. DKR carried out the field and laboratory work and revised the manuscript. HK and CJ carried out the laboratory work and revised the manuscript. WL and CL identified the predators' specimens and revised the manuscript. LT analysed the data, interpreted the results and revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Phil Lounibos, Manoukis Nick and some anonymous reviewers for useful comments and suggestions to improve the manuscript. This investigation received financial assistance from the Centers for Disease Control and Prevention and the Intramural Research Program of National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health.

References

1. Schluter D (1996) Ecological causes of adaptive radiation. *Am Nat* 148 (Suppl.): S40-S64.
2. Rundle HD, Vamosi SM, Schluter D (2003) Experimental test of predation's effect on divergent selection during character displacement in sticklebacks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14943-14948.
3. Brown JH, Munger JC (1985) Experimental manipulation of a desert rodent community: food addition and species removal. *Ecology* 66: 1545-1563.
4. Abramsky z, Rozengweig ML, Pinshow B, Brown JS, Kolter B, et al. (1990) Habitat selection: an experimental field with two gerbil species. *Ecology* 71: 2358-2369.
5. Schluter D (2003) Frequency dependent natural selection during character displacement in sticklebacks. *Evolution Int J Org Evolution* 57: 1142-1150.
6. Nosil P, Crespi BJ (2006) Experimental evidence that predation promotes divergence in adaptive radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9090-9095.
7. Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA (1985) Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di Zool* 52: 45-63.
8. Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, et al. (1998) The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477-511.
9. Coluzzi M (1999) The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia* 41: 277-283.
10. Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V (2002) A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* 298: 1415-1418.
11. 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.
12. della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-yovo J, Favia G, et al. (2001) Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 10: 9-18.
13. Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Caccone A (2001) Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 10: 25-32.
14. Lanzaro GC, Toure YT, Carnahan J, Zheng L, Dolo G, et al. (1998) Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14260-14265.
15. Lehmann T, Licht M, Elissa N, Maega BT, Chimumbwa JM, et al. (2003) Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *J Hered* 94: 133-147.
16. Mukabayire O, Caridi J, Wang X, Toure YT, Coluzzi M, et al. (2001) Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single-copy loci. *Insect Mol Biol* 10: 33-46.

17. Wondji C, Simard F, Fontenille D (2002) Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol* 11: 11-19.
18. Diabate A, Dabire RK, Millogo N, Lehmann T (2007) Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 44: 60-64.
19. Stump AD, Fitzpatrick MC, Lobo NF, Traore S, Sagnon N, et al. (2005) Centromere-proximal differentiation and speciation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15930-15935.
20. Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV (2005) Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol* 3: e285.
21. Diabate A, Dabire RK, Kengne P, Brengues C, Baldet T, et al. (2006) Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol* 43: 480-483.
22. Tripet F, Toure YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G, et al. (2001) DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* 10: 1725-1732.
23. Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, et al. (1994) Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.str. in Mali, west Africa. *Genetica* 94: 213-223.
24. Wondji C, Frederic S, Petrarca V, Etang J, Santolamazza F, et al. (2005) Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J Med Entomol* 42: 998-1005.
25. Diabate A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, Millogo N, et al. (2005) Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol* 42: 548-553.
26. Munga S, minakawa N, Zhou G, Githeko AK, Yan G (2007) Survivorship of immature stages of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in natural habitats in Western kenya highlands. *J Med Entomol* 44: 758-764.
27. Service MW (1977) Mortalities of the immature stages of species B of the *Anopheles gambiae* complex in kenya: Comparison between rice fields and temporary pools, identification of predators, and effects of insecticidal spraying. *J Med Entomol* 13: 535-545.
28. Minakawa N, Sonye G, Mogi M, Yan G (2004) Habitat characteristics of *Anopheles gambiae* s.s. larvae in a Kenyan highland. *Med Vet Entomol* 18: 301-305.
29. Minakawa N, Sonye G, Yan G (2005) Relationships between occurrence of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) and size and stability of larval habitats. *J Med Entomol* 42: 295-300.
30. Sunahara T, Ishizaka K, Mogi M (2002) Habitat size: a factor determining the opportunity for encounters between mosquito larvae and aquatic predators. *J Vector Ecol* 27: 8-20.
31. Yaro AS, Dao A, Adamou A, Crawford JE, Ribeiro JM, et al. (2006) The distribution of hatching time in *Anopheles gambiae*. *Malar J* 5: 19.

32. Yaro AS, Dao A, Adamou A, Crawford JE, Traore SF, et al. (2006) Reproductive output of female *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): comparison of molecular forms. *J Med Entomol* 43: 833-839.
33. Dobzhansky T (1946) Complete reproductive isolation between two morphologically similar species of *Drosophila*. *Ecology* 27: 205-211.
34. Mayr E (1942) *Systematic and the origin of species*: Columbia University Press.
35. Nosil P, Crespi BJ (2006) Ecological divergence promotes the evolution of cryptic reproductive isolation. *Proc Biol Sci* 273: 991-997.
36. Nosil P (2004) Reproductive isolation caused by visual predation on migrants between divergent environments. *Proc Biol Sci* 271: 1521-1528.
37. Mutuku FM, Bayoh MN, Gimnig JE, Vulule JM, Kamau L, et al. (2006) Pupal habitat productivity of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes at a rural village in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 74: 54-61.
38. Koenraadt CJ, Takken W (2003) Cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae* complex. *Med Vet Entomol* 17: 61-66.
39. Juliano SA, Gravel ME (2001) Predation and the evolution of prey behavior: an experiment with tree hole mosquitoes. *Behavioral Ecology* 13: 301-311.
40. Wisenden BD (2000) Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 355: 1205-1208.
41. Kats LB, Dill LM (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 5: 361-394.
42. Petranka J, Hayes L (1998) chemically mediated avoidance of a predatory odonate (*Anax junius*) by American toad (*Bufo americanus*) and wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Behav Ecol Sociobiol* 42: 263-271.
43. della Torre A, Tu Z, Petrarca V (2005) On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 755-769.
44. Edillo FE, Toure YT, Lanzaro GC, Dolo G, Taylor CE (2002) Spatial and habitat distribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Banambani village, Mali. *J Med Entomol* 39: 70-77.
45. Gimnig JE, Ombok M, Otieno S, Kaufman MG, Vulule JM, et al. (2002) Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial habitats. *J Med Entomol* 39: 162-172.
46. Blaustein L, Kiflawi M, Eitam A, Mangel M, Cohen JE (2004) Oviposition habitat selection in response to risk of predation in temporary pools: mode of detection and consistency across experimental venue. *Oecologia* 138: 300-305.
47. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde RT, Brengues C, et al. (2002) First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, west Africa. *Parassitologia* 44: 157-158.
48. Fanello C, Santolamazza F, della Torre A (2002) Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol* 16: 461-464.
49. Inc. SI (1990) *SAS Language: References*, Version 6. Cary, NC.: Sas Institute.

Figures Captions

Figure 1. Diagrammatic illustration of the experimental design.

Figure 2. Larval developmental success (measured as the number of adults per cage) of the molecular forms in presence and absence of predators in puddles and rice fields. The box extends between the 25th and the 75th percentile (across the inter quartile range - IQR) and the median is denoted by a thick line. The whiskers extend up to the most extreme value, up to 1.5 times the IQR and values located over 2 IQR from the median are shown. The triangles extend from the mean (base) to 1 SD (tip).

Figure 3. Predator composition in rice fields (empty squares) and puddles (filled squares). Bars denote mean density in 10 samples of rice fields and 9 samples of puddles of each predator. Stars above bars denote significant difference in a single test. Inset shows clustering of samples based on their predator composition using Principal Component (PC) analysis. Coordinates are the first (horizontal) and second principal components. The first PC represented overall predator abundance because its eigenvector's loadings were positive and similar in magnitude (except for the negative loading of the dragonfly; not shown). It alone accounted for 38% of the total variation and together with the second PC, 64% of the total variation was captured.

Figure 4. Distribution of developmental time of the molecular forms in each habitat (by sex). Developmental Time was measured from transplantation of first instar to adult. The

box extends between the 25th and the 75th percentile (across the inter quartile range - IQR) and the median is denoted by a thick line. The whiskers extend up to the most extreme value, up to 1.5 times the IQR and values located over 2 IQR from the median are shown. The triangles extend from the mean (base) to 1 SD (tip).

Table 1. Overall effect of predation on relative developmental success of the molecular forms in puddles and rice fields.

Habitat	Predator	M form	S form	χ^2/P
Puddles	Absent	46.3% (857) a	53.7% (993)	11.65/0.0006
Puddles	Present	56.2% (199)	43.8% (155)	
Rice fields	Absent	55.1% (576)	44.9% (470)	2.35/0.124
Rice fields	Present	59.6% (226)	40.4% (153)	
Total (Pooled data)	Absent	49.5% (1433)	50.5% (1463)	16.9/0.0001
	Present	58% (425)	42% (308)	12.4/ 0.0004b

a () number of adults emerged

b stratified analysis of form by predation controlling for habitat using Cochran-Mantel-Haenszel Test.

Table 2: Emergence success of the molecular forms in different habitats using a logistic regression accommodating cages variation

Source	Df	<i>P</i>	Estimate [ln(M/S)]
Intercept	1	0.84	-0.0232
Predator	1	<0.0001	+0.258
Habitat	1	0.019	+0.272a
Predator*Habitat	1	0.13	+0.08b
GroupCage (Habitat)	17	<0.0001	NA
Likelihood Ratio	11	<0.0001	NA

a: puddle over rice

b: predator over no predator in puddle/predator over no predator in rice

Table 3: Effect of individual predator on the relative success of the forms: logistic analysis

Source	Df	P	Estimate [ln(M/S)]
Intercept	1	0.013	-0.263
Habitat	1	0.05	+0.206*
GroupCage (Habitat)	17	<0.0001	NA
BackSwimmer	1	<0.0001	+0.202
Dragonfly	1	0.14	-0.33
Pinkwbug	1	0.01	+0.305
Blackwbug	1	0.09	-0.323
FD	1	0.65	+0.05
Likelihood ratio	8	<0.0001	NA**

*: puddle over rice, ** Not Applicable

Table 4: ANOVA for the developmental time of males and females of the molecular forms in different habitats

Source	Df	<i>P</i>
Form	1	<0.0001
Habitat	1	<0.0001
Form*Habitat	1	0.6285
Sex	1	<0.0001
Form*Sex	1	0.2246
Sex*Habitat	1	0.7615
Form*Sex*Habitat	1	<0.0001
Cage (Habitat)	16	<0.0001

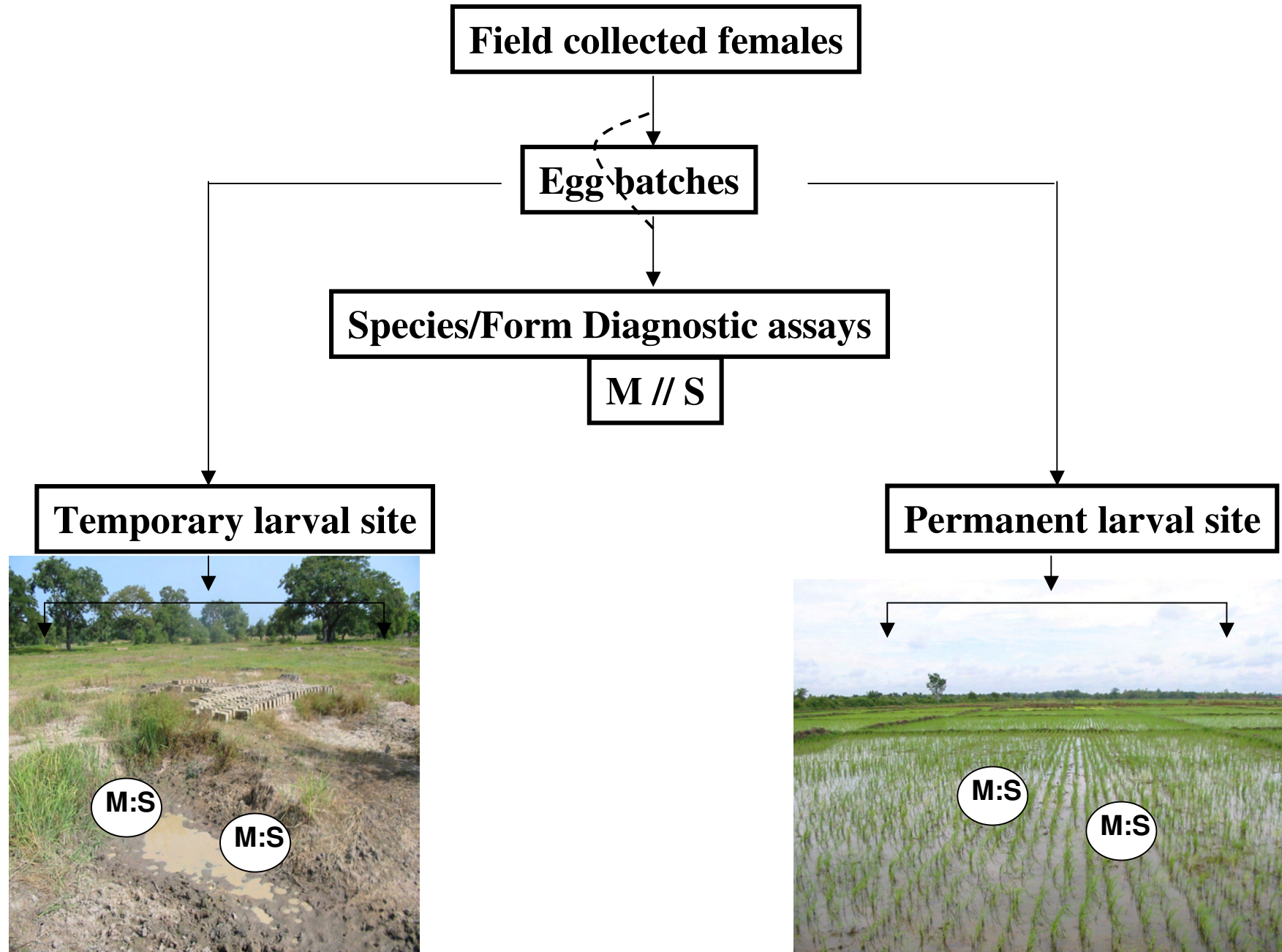


Figure 1

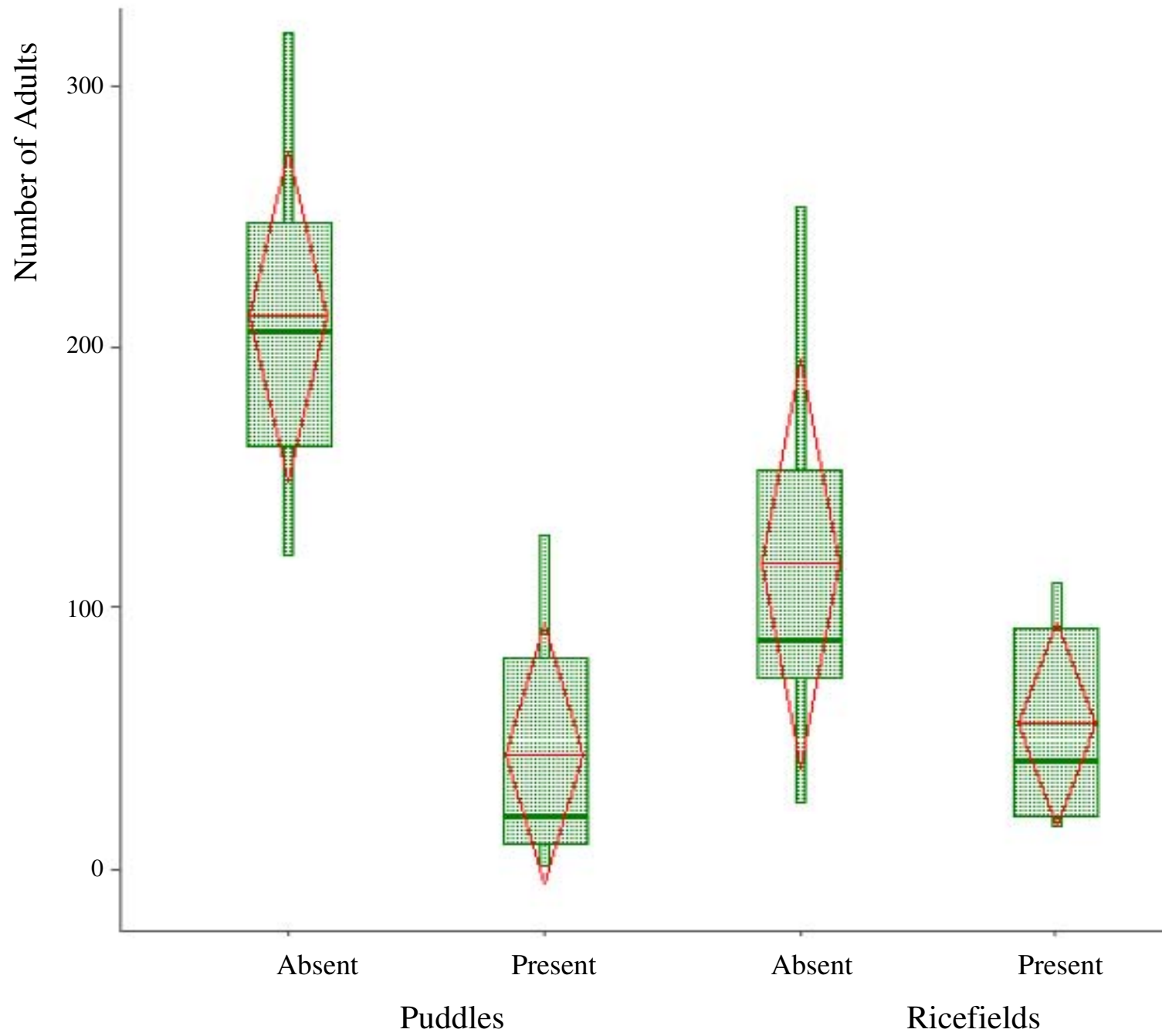


Figure 2

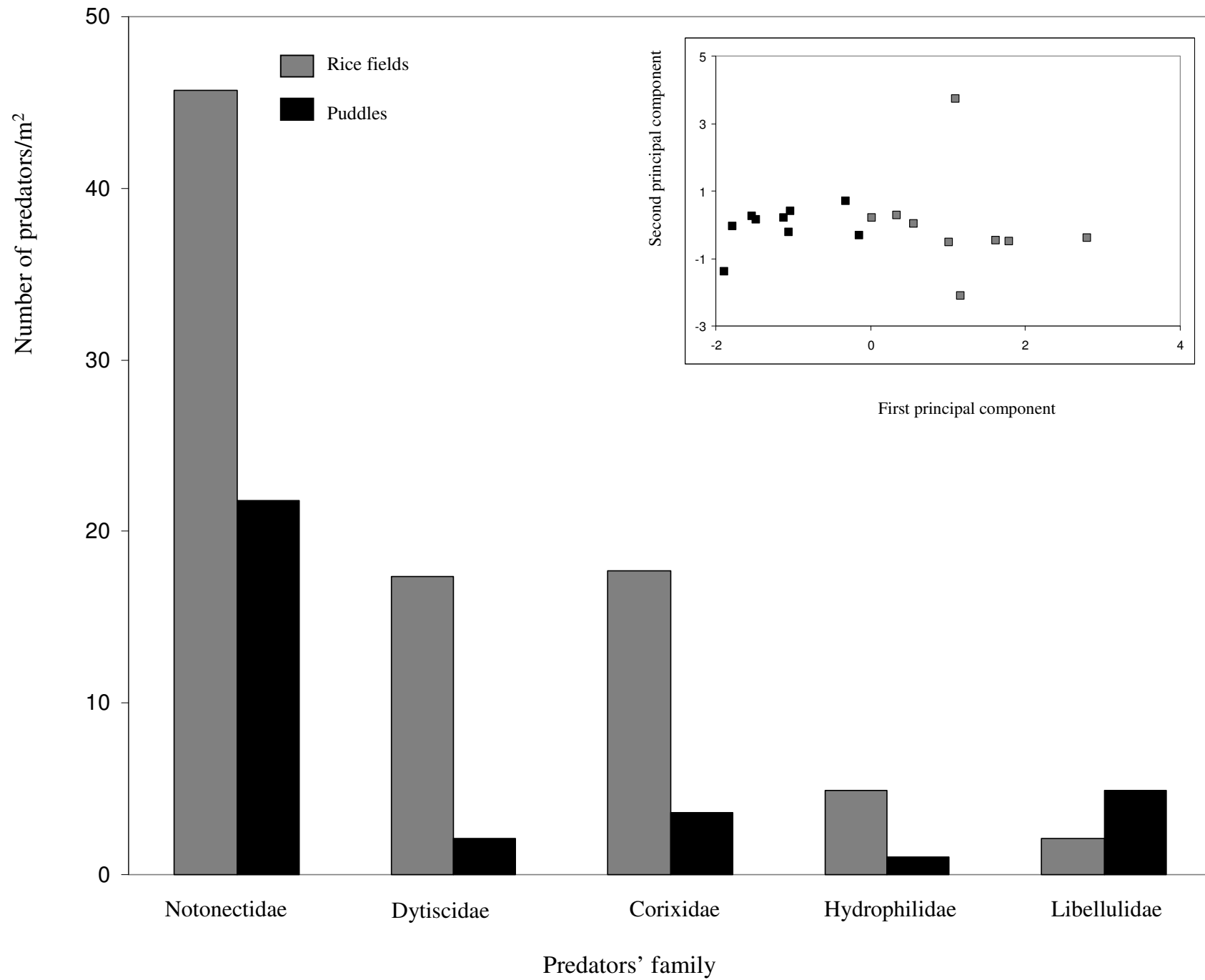


Figure 3

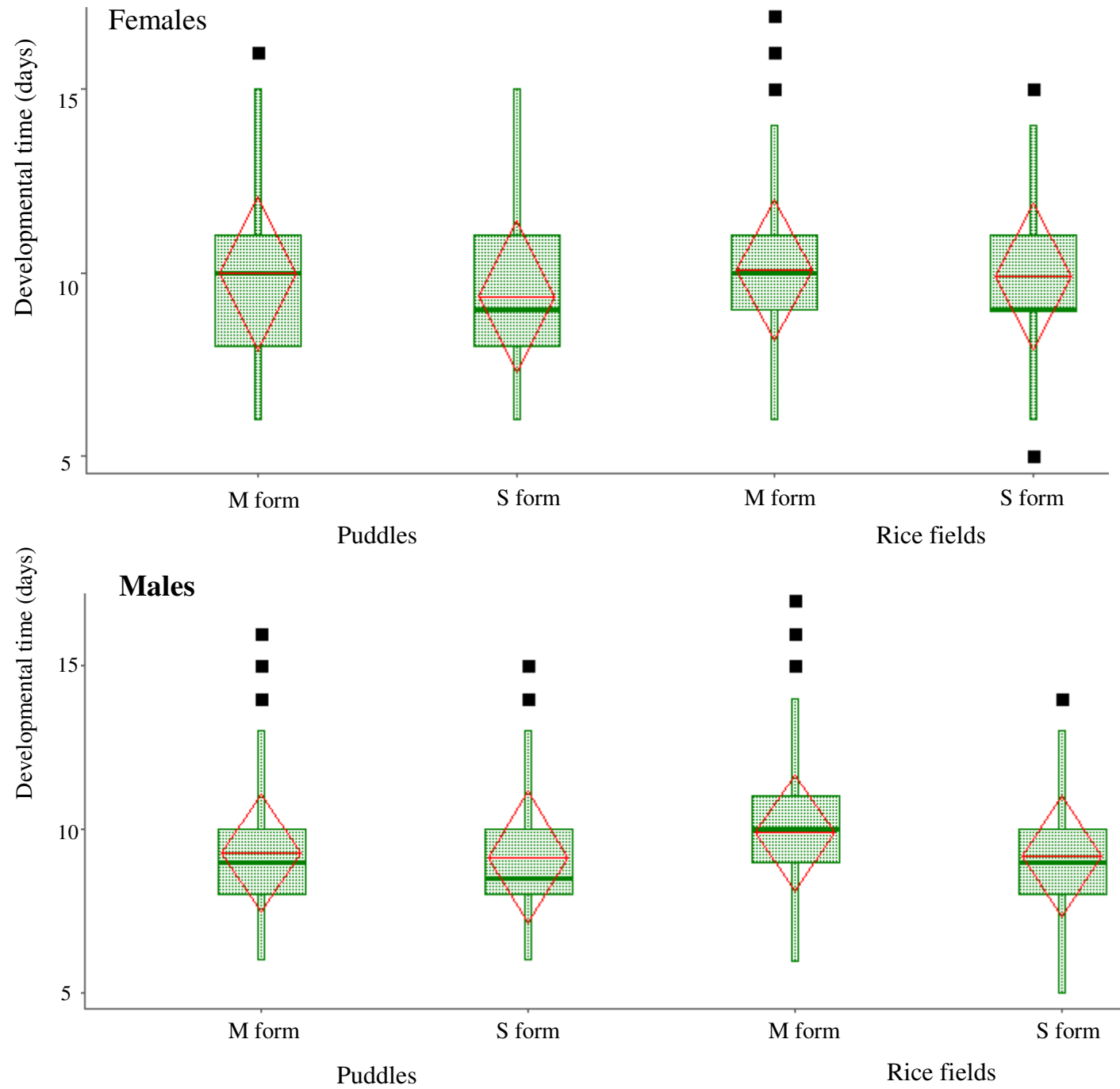


Figure 4

Article 11

Dabiré K.R., Baldet T., Diabaté A., Dia I., Costantini C., Cohuet A., Guiguemdé T.R., Fontenille D. (2007). *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticides resistance status and role in malaria transmission. *J. Med. Entomol.*, 44 (6): 990-997

Anopheles funestus (Diptera: Culicidae) in a Humid Savannah Area of Western Burkina Faso: Bionomics, Insecticide Resistance Status, and Role in Malaria Transmission

K. R. DABIRÉ,^{1,2,3} T. BALDET,⁴ A. DIABATÉ,^{1,2} I. DIA,⁵ C. COSTANTINI,⁶ A. COHUET,⁷
T. R. GUIGUEMDÉ,² AND D. FONTENILLE⁷

J. Med. Entomol. 44(6): 990–997 (2007)

ABSTRACT An entomological survey was carried out in three humid savannah sites of western Burkina Faso (Bama, Lena, and Soumouso) to 1) update the taxonomy of the *Anopheles funestus* Giles group, 2) examine the role of each species in malaria transmission, 3) characterize the insecticide resistance status of this malaria vector, and 4) determine the distribution of *An. funestus* chromosomal forms in these areas. Polymerase chain reaction identification of the members showed the occurrence of *An. lesoni* Evans in Lena and *An. rivulorum*-like in Soumouso in addition to *An. funestus* s.s. Malaria transmission was ensured mainly by *An. funestus* s.s. both in Soumouso and Lena and by *An. gambiae* s.s. Giles in Bama, the rice-growing area. The insecticide resistance status performed only on *An. funestus* indicated that this mosquito was susceptible to pyrethroids irrespective of the study area, but it was resistant to dieldrin. Furthermore, the occurrence of the two chromosomal forms of *An. funestus*, namely, Kiribina and Folonzo, seemed to follow ecological setups where Kiribina predominated in the irrigated area and Folonzo was more frequent in classic savannah. This study revealed that the problematic of *An. funestus* taxonomy was closer to that of *An. gambiae* requiring more structured studies to understand its genetic ecology.

KEY WORDS *Anopheles funestus*, malaria, insecticide resistance, cytogenetics

Malaria transmission in sub-Saharan Africa is dominated by three widespread vectors: *Anopheles gambiae* s.s. Giles, *An. arabiensis* Patton, and *An. funestus* Giles. Studies on the former two species, especially *An. gambiae*, are abundant, including a wide range of topics such as chromosomal polymorphism (Coluzzi et al. 1985, Touré et al. 1998), molecular characterization (Scott et al. 1993, Favia et al. 2001), ecology (Carnevale et al. 1999), insecticide resistance status (Diabaté et al. 2002), and population genetic structure (Lehmann et al. 2003). Conversely, the biology of *An. funestus* is relatively poorly studied despite its importance in malaria transmission, especially in eastern and southern Africa (De Meillon et al. 1977, Coetzee and Fontenille 2004). Unlike *An. gambiae* s.l., which is a complex of seven morphologically similar sibling species identifiable by fixed rDNA nucleotide substitutions (Scott et

al. 1993, Hunt et al. 1998), *An. funestus* belongs to a group of no less than nine species that are difficult to distinguish based solely on morphological characters of a single life stage (Gillies and Coetzee 1987, Harbach 1994). Species identification difficulties have been recently addressed by molecular techniques based on the polymerase chain reaction (PCR) by using a cocktail of species-specific primers permitting identification of the six most common species of the group (Koekemoer et al. 2002). Recent analyses of rDNA sequences (Cohuet et al. 2003) revealed the occurrence in West and Central Africa of a new taxon morphologically related to *An. rivulorum*, which is provisionally named *An. rivulorum*-like, thereby enlarging the number of members of the *An. funestus* group to 10. Among all the members of the funestus group, *An. funestus* s.s. is the most anthropophilic species, and it is considered as the only major malaria vector, although in a Tanzanian village the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* was detected by immunological techniques in some *An. rivulorum* Leeson specimens (Wilkes et al. 1996). *An. vaneedeni* Gillies and Coetzee can be experimentally infected with *P. falciparum* in the laboratory, but there is as yet no evidence for its role in malaria transmission in the field (De Meillon et al. 1977), presumably because of its highly zoophilic behavior.

¹ Institut de Recherche en Science de la Santé, Direction Régionale de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

² Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

³ Corresponding author, e-mail: dabire_roch@hotmail.com.

⁴ Programme Econas, Cirad/MVT, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier France.

⁵ Institut Pasteur de Dakar, BP 220, 36 Avenue Pasteur, Dakar, Senegal.

⁶ IRD UR 016/Centre National de Formation et de Recherche sur le Paludisme, 01 BP 2208 Ouagadougou 01, Burkina Faso.

⁷ LIN/IRD UR 016, 911 Av. Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 05, France.

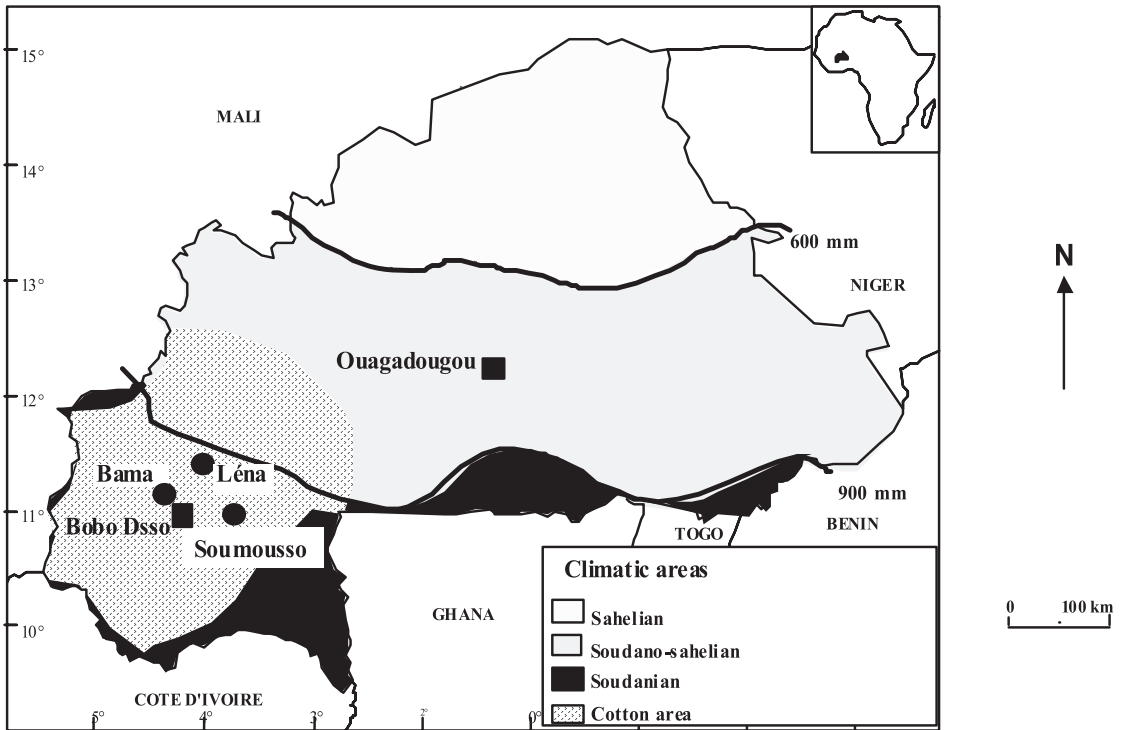


Fig. 1. Location of the study sites.

The genetic polymorphism of *An. funestus* became the subject of investigations only since the early 1980s (Green and Hunt 1980). Even more recently, the chromosomal analysis of polymorphic inversions in sympatric populations of *An. funestus* from Burkina Faso revealed significant departures from Hardy-Weinberg and linkage equilibria, leading to the proposed subdivision of this species in two chromosomal forms, provisionally named Folonzo and Kiribina (Costantini et al. 1999). However, no molecular marker is as yet available to differentiate between these two operational taxonomic units.

In the southwestern region of Burkina Faso, the intensive use of insecticides for agricultural purposes, most notably on cotton, *Gossypium hirsutum* L., is thought to select for insecticide resistance genes in mosquitoes whose breeding sites are exposed to pesticide runoff. The *kdr* allele is one of the main resistance mechanisms involved in anopheline resistance to pyrethroids, occurring mainly in the S molecular form of *An. gambiae* (Diabaté et al. 2002). Resistance to pyrethroids in *An. funestus* has been reported from South Africa (Hargreaves et al. 2000); hence, it is necessary to verify and monitor the insecticide susceptibility status of this species in other areas where insecticides are intensively used.

The objective of the current study was to initiate an in-depth examination of the ecological genetics of the two chromosomal forms of *An. funestus* to 1) establish the vector status of the members of the group living in western Burkina Faso, 2) characterize their bionomics

impacting on their capacity to transmit malaria, 3) investigate the insecticide resistance status of *An. funestus* in an area where pesticides are extensively used, and 4) relate the distribution and frequency of the two chromosomal forms of *An. funestus* to varying ecological settings.

Materials and Methods

Study Sites. Anopheline specimens were collected from Bama (11° 24' N, 04° 24' W), Lena (11° 18' N, 03° 53' W), and Soumouso (11° 00' 46" N, 4° 02' 45" W), three villages located in the humid savannah of southwestern Burkina Faso (Fig. 1). In this area, there are two distinct seasons: the rainy season occurs only from May to October, with a long dry season from November to April. The average annual rainfall ranges from 1,000 to 1,200 mm (records from the latest 5 yr).

Soumouso is a typical Guinean savannah village situated ≈55 km east from Bobo-Dioulasso, the second largest town of Burkina Faso. Three main anopheline malaria vectors are found in this village, including both molecular forms M and S of *An. gambiae*, *An. funestus*, and *An. nili*; *An. arabiensis* is occasionally reported at low frequency (5% of *An. gambiae* s.l. samples). Anopheline breeding sites consist mostly of rain puddles and a semipermanent swamp suitable to the development of *An. funestus* larvae.

Lena is ≈70 km north from Bobo-Dioulasso. It is ecologically similar to Soumouso, with a semipermanent pool suitable to *An. funestus* larval development.

These two villages lie in the cotton belt of Burkina Faso, where insecticides against agricultural insect pests are intensively used during the cropping period.

Bama is ≈ 30 km northwest from Bobo-Dioulasso in the valley of the Kou River (Vallée du Kou), a region where extensive rice, *Oryza sativa* L., cultivation has been practiced since the 1970s. This area contains seven villages covering 1,200 ha surrounded by wooded savannah. Both molecular forms M and S of *An. gambiae* are recorded at high densities during the rainy season (especially the M form: ≈ 200 bites person/night [b/h/n]). *An. funestus* is proportionally less abundant, but its population densities have increased during the last decade (Baldet et al. 2003). Few insecticides are used on the rice, but insecticides are used extensively for cotton located exterior to the rice fields.

Mosquito Collections. Anopheline mosquitoes were sampled from July to December during 2000 rainy season at a frequency of four sessions per month by three sampling methods: human landing catches, indoor insecticide spray-sheet catches, and larval collections. The human landing catches were performed by informed volunteers who were provided free and rapid treatment when suspected clinical signs of malaria according to World Health Organization (WHO)-recommended regimen on the basis of fever and detectable *P. falciparum* parasitemia. To evaluate human biting rates, pairs of human "baits" sat indoors and outdoors collecting mosquitoes that landed on them, by means of a flashlight and glass tubes. Collections were carried out between 1800 and 0600 hours inside and just outside of four houses in each village. To standardize catching efficiency, collectors rotated between houses on subsequent nights.

Indoor resting females were caught by spraying village huts with insecticide aerosols. Female mosquitoes were knocked down onto, and immediately retrieved from, white sheets laid down on the floor of sprayed huts. Mosquitoes were dissected, and the head and thorax were preserved to determine their infectious status. Legs were separated from the carcass and kept dry for molecular species identification. Half-gravid *An. funestus* females were stored individually in 1.5-ml tubes containing Carnoy fixative (3 parts absolute ethanol to 1 part glacial acetic acid), and they were brought to the laboratory for later chromosomal scoring. Larvae of *An. funestus* were collected at the end of the rainy season (September) from Bama and Soumouso and brought to the insectary in Bobo-Dioulasso for rearing. Emerging 2-d-old females were then used in insecticide susceptibility tests.

Laboratory Processing of Mosquitoes. Anophelines were sorted and assigned to species based on morphological characters by using standard identification keys (Gillies and De Meillon 1968). Later, all females tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (see below) were processed by PCR for molecular identification of species of the *An. funestus* group as described in Cohuet et al. (2003).

The heads and thoraces of anopheline females were tested for the presence of the circumsporozoite pro-

tein (CSP) of *P. falciparum*, the major malarial parasite occurring in the study area, by ELISA following the protocol of Beier et al. (1988).

Insecticide Resistance Tests. Two organochlorines (DDT 4% and dieldrin 4%), and two pyrethroids (permethrin 1% and deltamethrin 0.025%) were tested according to the standard WHO vertical tube protocol. Mortality was scored 24 h after an exposure of 100 2-d-old females for 1 h. KDT_{50} and KDT_{95} values corresponding, respectively, to the time that 50 and 95% of ≈ 100 tested mosquitoes were knocked down were established and compared among three insecticides (permethrin 1%, deltamethrin 0.025%, and DDT 4%), and the susceptible reference strain of *An. gambiae* s.s. (Kisumu) was used as control. The threshold of susceptibility was fixed at 90% for DDT 4% and at 95% for the other three active ingredients, respectively (WHO 1998). In the absence of an *An. funestus* reference strain, controls were established from the same pool of tested mosquitoes kept in insecticide-free WHO test tubes and from *An. gambiae* Kisumu susceptible reference strain. Control mortality was always 0%; therefore, no Abbott correction was necessary during analysis.

Chromosomal Inversions Analysis. For karyotyping, half-gravid females were removed from Carnoy fixative, and their ovaries were dissected. Polytene chromosomes were squashed and prepared for scoring according to Hunt (1973). The preparations were examined under a phase-contrast microscope at 120 \times magnification. Paracentric inversions were scored using the chromosomal map and nomenclature of Sharakhov et al. (2004), and karyotypes were assigned to chromosomal form according to the algorithm of Costantini et al. (1999), later modified by Guelbeogo et al. (2005). Two chromosomal forms are determined following this algorithm: the first form, named "Kiribina," is characterized mainly by the standard arranged at all loci; and the second form, named "Folonzo," is mainly polymorphic, with high frequencies of inversions 3Ra, 3Rb, and 2Ra.

Data Analysis. The human biting rate (HBR) was calculated as the ratio of total mosquitoes captured for a period of the total person-night used for the same period. The rate of endophagy was defined as the proportion of mosquitoes caught indoors out of the total number collected both indoors and outdoors from the human landing collections. The circumsporozoite rate was calculated as the proportion of mosquitoes found positive for the CSP. The month entomological rate (EIR) was calculated as the product of the HBR and the CSP rate of mosquitoes collected on the total day of the month. The addition of the monthly EIR during the period of study gave the seasonal EIR. Significance of the test was determined by Fisher chi-square test. Comparisons of different percentages (HBR, CSP rate, and EIR) were done by chi-square test. Chromosomal data were analyzed with Fstat version 2.9.3.2 (Goudet et al. 1996).

Table 1. Total number (relative frequency, %) of anthropophagic anopheline females collected when biting human in three villages of southwestern Burkina Faso

Anopheline females	Bama		Lena		Soumouso	
	Indoors	Outdoors	Indoors	Outdoors	Indoors	Outdoors
<i>An. gambiae</i> s.l.	3,619 (95.2)	2,892 (96.5)	184 (24.4)	168 (28.3)	234 (14.9)	220 (18.7)
<i>An. funestus</i> s.l.	181 (4.8)	98 (3.3)	555 (73.5)	409 (68.8)	1,250 (79.7)	855 (72.5)
<i>An. nili</i>	1 (0.02)	7 (0.2)	16 (2.1)	17 (2.9)	85 (5.4)	104 (8.8)
Total	3,801	2,997	755	594	1,569	1,179

Results

Malaria Vector Species Composition. Of six 798, two 748, and one 349 human-biting malaria vectors collected in Bama, Soumouso, and Lena, respectively, all belonged to the *An. gambiae* s.l., *An. funestus* s.l., or *An. nili* species groups (Table 1). With the exception of the rice-growing area, *An. funestus* was the predominant species, at a frequency of 76.6 and 71.5% in Soumouso and Lena, respectively. Conversely, *An. gambiae* was the prevailing vector species in Bama, representing >95% of the total number of anophelines collected landing on humans. The proportion of exophagic *An. funestus* with respect to the total number collected indoors and outdoors did not differ significantly ($P > 0.05$) between Soumouso and Lena, and it was estimated at 40.6 and 42.4% respectively. Such rate did not differ significantly from that of Bama ($P = 0.07$), which reached 35.1%. Overall, *An. funestus* was the more endophagic of the three malaria vectors, irrespective of collection site.

***An. funestus* Human Biting Rates.** The relative density of *An. funestus* was very low in the rice area (Bama), with trivial density toward the end of the season (Fig. 2). This relative low frequency of *An. funestus* has been shadowed by the high abundance of *An. gambiae*. But, in Lena and Soumouso, *An. funestus* remained the most prevalent mosquito. Indeed, its activities were noted early in August in Lena and 1 mo later in Soumouso, and it was more intensive indoors than outdoors. The peak of the prevalence was observed in September and October in Lena and Soumouso, reaching 45 and 55 b/h/n, respectively. *An. funestus* density decreased quickly in October in Lena, but it remained active in Soumouso where the density was noted in December. The aggressive density outdoors was also important in these two villages where *An. funestus* was observed in human bait up to December with the HBR averaging 20 b/h/n. Finally, *An. funestus* occurred toward the middle of the transmission period from August onward and outnumbered *An. gambiae* until December when this mosquito continued to be active.

Identification of Species of *An. funestus* Group. In total, 864 mosquitoes of the *funestus* group caught on human bait between August and December 2000 have been identified by PCR. In the Bama rice-growing area, all the 117 mosquitoes analyzed were *An. funestus* s.s. In Lena, 12 *An. lesoni* and 258 *An. funestus* were identified. We found *An. lesoni* at a frequency of 30% in the November outdoor collections, the latest month of malaria transmission in this site. In Soumouso, we

found only one specimen of *An. rivulorum*-like among 477 females tested. It was collected outdoors in September (one from 30 successfully identified). According to these data, species other than *An. funestus* s.s. were mostly exophagic, because they were caught exclusively outdoors, late at night (between 0200 and 0300 hours).

Sporozoite Rates of *An. funestus*. Of 1,199 *An. funestus* analyzed by ELISA for the presence of the circumsporozoite protein of *P. falciparum*, 98 were positive for the CSP antigen (Table 2). The sporozoite rate was significantly higher (9.7%) in Soumouso than in Lena, which averaged 4.9% ($P < 0.01$) and was even lower in Bama (2.6%). One *A. rivulorum*-like and one *An. lesoni* from Soumouso and Lena, respectively, were tested by ELISA and found negative. Compared with the other vectors, the sporozoite rate did not differ ($P = 0.08$) between *An. gambiae* and *An. funestus* in Bama, Lena, and Soumouso villages.

EIR of *An. funestus*. Malaria transmission was mainly ensured by *An. funestus* in the two savannah sites regardless of the month. Indeed, malaria transmission rate was highest in Soumouso, reaching 472 infected bites per person (Table 2). The dynamic of the transmission showed that the maximum of transmission occurred in Soumouso during the three latest months of the rainy season, reaching 146 infected bites per person in October. Inversely, in Lena, malaria transmission also driven mainly by *An. funestus* occurred early during the two first months and decreased significantly toward the end of the rainy season. In contrast, in Bama, the rice-growing area, malaria transmission was driven by *An. gambiae* irrespective of the period of the transmission. Here, the dynamic of the transmission varied one month to another, but the maximum of transmission also was observed in October with an EIR averaging 90 infecting bites per person.

Insecticide Susceptibility Status. Knockdown Rate: KDT_{50} . Except to Bama population for DDT4%, the KDT_{50} value did not differ significantly irrespective of the insecticide tested ($P > 0.05$; Table 3), and it was always faster, occurring during the first quarter (15 min) after the exposure time. In the Bama population tested with DDT 4%, the KDT_{50} value was relatively elevated, corresponding to 27 min after the exposure time.

Knockdown Rate: KDT_{95} . Regardless of the provenance of wild populations of *An. funestus* tested, the KDT_{95} values were more elevated with DDT 4% ($P > 0.05$; Table 3) than that with deltamethrin 0.025%. In

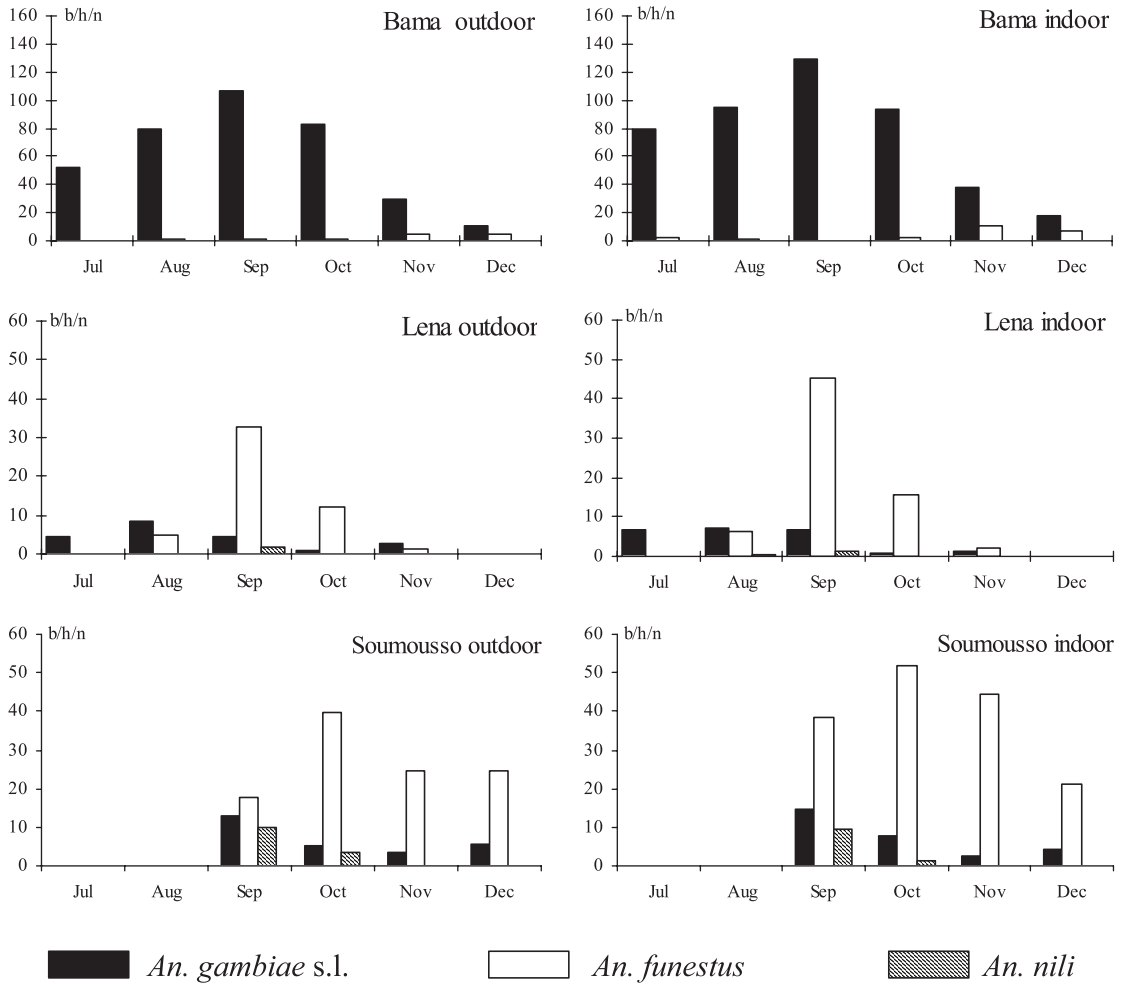


Fig. 2. Monthly variations of biting rates (b/h/n) in the three study sites.

contrast, the KDT_{95} with permethrin 1% from Lena and Bama populations was more elevated than that of Soumouso. In Lena, the KDT_{95} values with DDT 4% were closer than those of permethrin 1%, occurring at 37 and 42 min, respectively, after the exposure time.

Globally, the KD effect was fastest with deltamethrin 0.025% compared with permethrin 1% and DDT 4%.

Mortality Rate. The mortality rate was 100% for all populations of *An. funestus* tested to all insecticides, except to dieldrin 4%. Indeed, mortality rates of this

Table 2. Circumsporozoite protein rate calculated by ELISA for *P. falciparum* for three malaria vectors in Bama, Lena, and Soumouso from August to December 2000

Site	Mosquito species	Aug.			Sept.			Oct.			Nov.			Dec.			Total EIR
		HBR	CSPR	EIR	HBR	CSPR	EIR	HBR	CSPR	EIR	HBR	CSPR	EIR	HBR	CSPR	EIR	
Bama	<i>An. gambiae</i>	2,948	2.4	70.2	3,885	ND		2,890	3.1	90.2	1,145	3.9	44.3	538	6.7	36	240.5
	<i>An. funestus</i>	35	0	0	300	0	0	81	0	0	303	0	0	205	4.3	8.8	9
	<i>An. nili</i>	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lena	<i>An. gambiae</i>	229	10.1	23.1	202	7.7	15.6	31	0	0	34	9.3	3.1	0	0	0	42
	<i>An. funestus</i>	198	20	39.5	1,354	3.7	50	491	3.3	15.85	68	9.5	6.4	0	0	0	112
	<i>An. nili</i>	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soumouso	<i>An. gambiae</i>	N.D.			443	5.5	24.3	244	6.25	15.3	75	9.1	6.8	128	8	10.2	57
	<i>An. funestus</i>	N.D.			1,159	4.7	54.5	1,604	9.1	146	1,339	9.6	128.5	659	12.6	83	412
	<i>An. nili</i>	N.D.			281	1.2	3.2	39	0	0	0	0	0	0	0	0	3.2

HBR, human landing rate nightly biting rate (ma) × no. of days of the month); CSPR, circumsporozoite protein rate (ratio positive mosquitoes by total no. tested × 100); EIR, entomological inoculation rate (HBR × CSPR/100); N.D., not determined. No entry indicates not possible.

Table 3. KDT values of *An. funestus* s.s. tested with three insecticides (permethrin 1%, DDT 4%, and deltamethrin 0.025%)

Site	DDT 4%			Deltamethrin 0.025%			Permethrin 1%		
	<i>n</i>	KDT ₅₀	KDT ₉₅	<i>n</i>	KDT ₅₀	KDT ₉₅	<i>n</i>	KDT ₅₀	KDT ₉₅
<i>An. gambiae</i> Kisumu (reference strain)	165	30 (29–32)	50 (48–54)	100	10 (9–11)	13 (12–15)	100	10 (9–11)	15 (12–18)
Bama	100	27 (26–28)	50 (46–56)	104	18 (17–19)	30 (28–32)	106	13 (12–14)	34 (31–39)
Lena	100	17 (16–18)	37 (34–41)	102	12 (11–13)	26 (24–30)	102	13 (12–14)	42 (37–48)
Soumouso	105	14 (13–16)	47 (41–56)	103	14 (13–15)	22 (20–24)	124	10 (9–11)	24 (22–26)

KDT_{50–95}, exposure time (expressed in minutes) corresponding to 50–95% of tested mosquitoes, respectively, knocked down. *n* is number of mosquitoes tested.

insecticide were 48.9 and 59.7%, respectively, in Soumouso and Bama. The insecticide resistance status from Lena for this active ingredient was not determined.

Distribution of Chromosomal Forms. All mosquitoes submitted to cytogenetic analysis were identified by PCR as *An. funestus* s.s. As observed in previous studies, *An. funestus* from this area was polymorphic for inversions 2Ra, 3Ra, 3Rb, and 3La. The frequency of each inversion within and across locales and other population genetics statistics are given in Table 4. Even evidence for Hardy–Weinberg or linkage disequilibria within localities should be perceptible, it had been masked by the small sample of mosquitoes tested, which did not point out a statistical difference, because the *F*_{is} value was higher with a *P* value <0.05. Despite the low sample size, the distribution of karyotypes was significantly different between villages (*P* value across all loci = 0.001); the locus-by-locus analysis revealed that differentiation was mostly limited to the two inversions on chromosomal arm 3R (*P* < 0.001). Applying the modified algorithm of Guelbeogo et al. (2005) to classify single karyotypes into one of the two chromosomal forms, it seemed that the distribution of the two taxa revealed a contrasting pattern of distribution between villages related to the main ecological conditions of each sampling site: Kiribina predominated in the rice-growing village of Bama (nine of 10 classified specimens; 90%), whereas in Lena and Soumouso Folonzo was the most frequent of the two taxa, with seven of 10 (70%) and seven of eight (88%) individuals, respectively, belonging to this form.

Discussion

Identification of Members of the *An. funestus* Group. In our study area, we recorded three species of the *funestus* group biting humans: *An. funestus* s.s.,

An. lesoni, and the new taxon provisionally named *An. rivulorum*-like. *An. lesoni* was known to be mostly exophilic and zoophilic (Gillies and Coetzee 1987), whereas in one of the collections of our study (in November at Lena), a significant proportion (30%) of human-biting *An. funestus* s.l. was molecularly identified as *An. lesoni*. Because we do not have independent complementary evidence (e.g., origin of blood-meals), we do not know whether this population of *An. lesoni* has a specific preference for human feeding. Similarly, only one *An. rivulorum*-like, whose biology and vector status are virtually unknown so far, was collected on human baits. Both *An. lesoni* and *An. rivulorum*-like were exophagic and free of malaria parasites, although our data set is limited in scope and needs to be extended. Thus, only *An. funestus* s.s. was greatly implicated in malaria transmission in the three savannah villages of our study area, with sporozoite rates at times as high as 20%.

Species Composition, Vector Dynamics, and Vectorial Role of *An. funestus*. Toward the end of the rainy season (September), *An. funestus* was found to be the major malaria vector in these two savannah villages, where both its human biting and sporozoite rates were higher than those of other known vectors such as *An. gambiae* complex or *An. nili*. Conversely, in a rice-growing area embedded within this mostly cotton-growing region, *An. gambiae* remained the major malaria vector due to substantially higher population densities. Indeed, *An. funestus* is known to supplement *An. gambiae* s.l. in malaria transmission in the West African savannah, but its major vector role was hardly emphasized from historical studies of Robert et al. (1985, 1988) carried out in the humid savannah of West Burkina Faso. As early as 1985 in two savannah villages from this area, Kongodjan and Karangasso, *An. funestus* EIR reached 64 and 32 infected bites per human per yr, respectively. That number did not differ greatly from those of *An. gambiae*, reaching 69 and 45

Table 4. Frequency of polymorphic chromosomal inversions of *An. funestus* s.s. from three villages of southwestern Burkina Faso

Village	2 <i>N</i> (range)	2 <i>Ra</i>	<i>F</i> _{is}	<i>P</i>	3 <i>Ra</i>	<i>F</i> _{is}	<i>P</i>	3 <i>Rb</i>	<i>F</i> _{is}	<i>P</i>	3 <i>La</i>	<i>F</i> _{is}	<i>P</i>	<i>F</i> _{is}	<i>P</i>
Bama	18–20	0.10	1.00	0.06	0.10	1.00	0.06	0.00	–	–	0.10	1.00	0.08	1.00	0.0042
Lena	20	0.50	0.25	0.38	0.55	0.44	0.23	0.30	0.10	0.67	0.05	0.00	1.00	0.26	0.1125
Soumouso	14–16	0.50	0.22	0.52	0.81	0.63	0.18	0.69	0.19	0.62	0.19	0.63	0.20	0.38	0.0417
Unweighted frequencies		0.37			0.49			0.33			0.11				

Probability values of Wright’s *F* values (values in bold denote significance level *P* < 0.05 after Bonferroni correction) test for departures from Hardy–Weinberg equilibrium. The last two columns report the same test across all loci within a sample.

infected bites per human per yr, respectively, in these two villages for the same period. Nowadays in this area, the *An. funestus* EIR has increased considerably; however, it differs significantly between Lena and Soumouso with 110 and >400, respectively, infected bites per mo during malaria transmission season. Thus, the vector status of *An. funestus* in this region has presumably increased in importance during the last decade, where now it plays a major role, especially toward the end of the rainy season. Similarly, *An. funestus* also has been shown to be a major malaria vector in other African savannah regions, as observed in Cameroon and Senegal (Manga et al. 1997, Dia et al. 2000).

Insecticide Susceptibility Status of *An. funestus*. No resistance to two pyrethroids, deltamethrin and permethrin, nor to DDT was observed in *An. funestus* in our study area. However, the KD effect (KDT_{95}) of wild populations of *An. funestus* from the three study sites (Bama, Lena, and Soumouso) was relatively more elevated to DDT 4% and permethrin 1% compared with the reference *An. gambiae* s.s. susceptible strain. In Kwazulu/Natal, South Africa, and in the southern region of Mozambique, *An. funestus* has developed resistance to pyrethroids (Hargreaves et al. 2000). The South African government has since been obliged to switch back to DDT, despite the worldwide restrictions of this active ingredient (Coetzee and Fontenille 2004). In the southern African populations, resistance mechanisms other than *kdr* were involved, with mixed function oxidases conferring cross-resistance to carbamates such as propoxur (Brooke et al. 2001). Although no cross-resistance to DDT and pyrethroids was observed in our study area, *An. funestus* in Soumouso and Bama was highly resistant to dieldrin. Data from Lena were not available, but previous data collected in a village near Lena indicated that *An. funestus* there was resistant to dieldrin. Lena is close to and ecologically similar to Soumouso, and resistance to dieldrin was found irrespective of ecological settings, we can infer that resistance to this active ingredient is common and widespread in our study area. Insecticide susceptibility tests performed in 1967 in the same villages (Bama and Soumouso) already reported a lower degree of resistance to dieldrin in *An. funestus* (11% survival in Soumouso; Hamon et al. 1968). After the huge use of dieldrin in Africa in the 1970s, the level of resistance has greatly increased, reaching 51% survival in Soumouso, and >30% in Bama.

Distribution of *An. funestus* Chromosomal Forms. The Kiribina form was almost the only form recorded from Bama, the rice-growing village, whereas the mostly polymorphic Folonzo form (showing high frequencies of the 3Ra, 3Rb, and 2Ra inversions) was observed in higher relative frequencies in Lena and Soumouso, where it represented 70% of the karyotyped specimens. These findings are in accordance with the distribution pattern reported by Costantini et al. (1999), whereby Kiribina was found predominantly in irrigated areas. It must be stressed that our results are preliminary due to the small size of our samples,

and they must be gauged accordingly. Such a contrasting pattern of distribution, giving rise to almost "pure" alternative populations of each chromosomal form, in combination with small sample sizes, probably hindered the possibility to point out significant departures from Hardy-Weinberg and linkage disequilibria in each locale. Conversely, such a pattern is in accordance with the significant differences in the distribution of genotypes among the three villages.

As in *An. gambiae* s.s., where some chromosomal inversions are clearly correlated with ecological variables (Touré et al. 1998), it is likely that the distribution of the chromosomal forms in *An. funestus* follows a pattern affected by specific environmental conditions. It will be interesting to precisely identify the ecological characteristics leading to the alternative distribution of the two chromosomal forms of *An. funestus* in different environments (e.g., rice-growing areas versus classic savannah).

Acknowledgments

We are grateful to the volunteers of Soumouso, Lena, and Bama who made this study possible. This study was supported by a grant from the program Pal+ of the French Ministry of Scientific Research.

References Cited

- Baldet, T., A. Diabaté, and T. R. Guiguemdé. 2003. Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama), Burkina Faso. *Cahiers Santé* 15: 55-60.
- Beier, J. C., C. M. Asiago, F. K. Onyango, and J. K. Koros. 1988. Elisa absorbance cut-off method affects malaria sporozoite rate determination in wild Afrotropical *Anopheles*. *Med. Vet. Entomol.* 2: 259-264.
- Binka, F. N., A. Kubaje, M. Adjuik, L. A. Williams, C. Lengeler, G. H. Maude, G. E. Armah, B. Kajihara, J. H. Adiamah, and P. G. Smith. 1996. Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop. Med. Int. Health* 1: 147-154.
- Brooke, B. D., G. Kloke, R. H. Hunt, L. L. Koekemoer, E. A. Temu, M. E. Taylor, G. Small, J. Hemingway, and M. Coetzee. 2001. Bioassay and biochemical analyses of insecticides resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 91: 265-272.
- Carnevale, P., P. Guillet, V. Robert, D. Fontenille, J. Doannio, M. Coosemans, and J. Mouchet. 1999. Diversity of malaria in rice growing areas of the Afrotropical region. *Parassitologia* 41: 273-276.
- Coetzee, L., and D. Fontenille. 2004. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 599-605.
- Cohuet, A., F. Simard, J. C. Toto, P. Kengne, M. Coetzee, and D. Fontenille. 2003. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am. J. Trop. Hyg.* 69: 200-205.
- Coluzzi, M., V. Petrarca, and M. A. Di Decco. 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.* 5: 45-63.
- Costantini, C., N. Sagnon, E. Ilboudo-Sanogo, M. Coluzzi, and D. Boccolini. 1999. Chromosomal and bionomic hetero-

- geneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* 41: 595–611.
- De Meillon, B., G. Van Eeden, L. Coetzee, M. Coetze, R. Meiswinkel, C.L.N. du Toit, and C. F. Hansford. 1977. Observations on a species of the *Anopheles funestus* subgroup, a suspected exophilic vector of malaria parasites in North-Eastern Transvaal, South Africa. *Mosq. News* 37: 657–661.
- Dia, I., L. Lochouarn, D. Boccolini, C. Costantini, and D. Fontenille. 2000. Spatial and temporal variations of chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* 7: 179–184.
- Diabaté, A., T. Baldet, F. Chandre, M. Akogbeto, F. Darriet, C. Brengues, T. R. Guiguemdé, P. Guillet, J. Hemingway, and J. M. Hougard. 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *An. gambiae* sl in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 617–622.
- Favia, G., A. Lanfrancotti, L. Spanos, I. Sidéon-Kiamos, and C. Louis. 2001. Molecular characterisation of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 10: 19–23.
- Gillies, M. T., and M. Coetzee. 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. South African Institute of Medical Research, Johannesburg, South Africa.
- Gillies, M. T., and B. De Meillon. 1968. The Anophelinae of Africa South of the Sahara. South African Institute of Medical Research, Johannesburg, South Africa.
- Green, C., and R. Hunt. 1980. Interpretation of variation in ovaria polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *Anopheles parensis* Gillies and *Anopheles aruni*. *Genetica* 51: 87–195.
- Goudet, J., M. Raymond, T. De Meeus, and F. Rousset. 1996. Testing differentiation in diploid population. *Genetics* 146: 193–194.
- Guelbeogo, W. M., O. Grushko, D. Boccolini, P. A. Ouedraogo, N. J. Besansky, N. F. Sagnon, and C. Costantini. 2005. Chromosomal evidence of incipient speciation in the Afrotropical malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Med. Vet. Entomol. Med. Vet. Entomol.* 19: 458–469.
- Hamon, J., S. Salles, P. Venard, J. Coz, and J. Brengues. 1968. Présence dans le Sud-Ouest de la Haute-Volta de populations d'*Anopheles funestus* Giles résistantes à la dieldrine. *Med. Trop.* 28: 221–226.
- Harbach, R. E. 1994. Review of internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematic and phylogenetic research. *Bull. Entomol. Res.* 84: 331–342.
- Hargreaves, K., L. L. Koekemoer, B. D. Brooke, R. H. Hunt, J. Mthembe, and M. Coetzee. 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med. Vet. Entomol.* 2: 181–189.
- Hunt, R. H. 1973. A cytological technique for the study of the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 15: 137–139.
- Hunt, R. H., M. Coetzee, and M. Fettene. 1998. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92: 231–235.
- Koekemoer, L. L., M. M. Weeto, L. Kamau, R. H. Hunt, and M. Coetzee. 2002. A cocktail polymerase chain reaction (PCR) assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 804–811.
- Lehmann, T., M. Licht, N. Elissa, B. T. Maega, J. M. Chimumbwa, F. T. Watsenga, C. S. Wondji, F. Simard, and W. A. Hawley. 2003. Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *J. Hered.* 94: 133–147.
- Manga, L., J. C. Toto, G. Le Goff, and J. Brhunes. 1997. The bionomics of *Anopheles funestus* and its role in malaria transmission in a forest area of southern Cameroon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91: 387–388.
- Robert, V., P. Carnevale, V. Ouedraogo, V. Petrarca, and M. Coluzzi. 1988. La transmission du paludisme humain dans un village de savane du Sud-Ouest du Burkina Faso. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 68: 107–121.
- Robert, V., P. Gazin, C. Boudin, J. F. Molez, V. Ouedraogo, and P. Carnevale. 1985. La transmission du paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo-Dioulasso. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 65: 201–214.
- Sharakhov, I., O. Braginets, O. Grushko, A. Cohuet, W. M. Guelbeogo, D. Boccolini, M. Weill, C. Costantini, N. F. Sagnon, D. Fontenille, G. Yan, and N. J. Besansky. 2004. A microsatellite map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. *J. Hered.* 95: 29–34.
- Scott, J. A., W. G. Brogdon, and F. M. Collins. 1993. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 520–529.
- Touré, Y. T., V. Petrarca, S. F. Traoré, A. Coulibaly, H. M. Maiga, O. Sankaré, M. Sow, M. A. Di Decco, and M. Coluzzi. 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477–511.
- [WHO] World Health Organization. 1998. Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence to insecticides on treated surfaces. Report of the WHO Information Consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilkes, T. J., Y. G. Matola, and J. D. Charlwood. 1996. *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med. Vet. Entomol.* 10: 108–110.

Received 15 July 2006; accepted 1 February 2007.

Article 12

Dabiré K.R., Diabaté A., Paré-Toé L., Rouamba J., Ouari A., Fontenille D., Baldet T. (2008). Year to year and seasonal variations in vectors bionomics and malaria transmission in a humid savannah village in West Burkina Faso (Lena). *Journal of Vector Ecology*, 33 (1) (sous presse)

Year to year and seasonal variations in vector bionomics and malaria transmission in a humid savannah village in west Burkina Faso

K.R. Dabiré^{1,2}, A. Diabaté^{1,2}, L. Paré-Toé¹, J. Rouamba¹, A. Ouari¹, D. Fontenille³, and T. Baldet¹

¹Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) /Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

²Laboratory of Malaria and Vector Research (NIAID/NIH, Rockville, Washington, D.C., U.S.A.

³Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LJN)-IRD, 911 Agropolis, BP 5045,

34032 Montpellier Cedex 1, France

⁴Citad UPRI6, Campus international de Baillarguet, Montpellier, France

Received 21 April 2007; Accepted 17 December 2007

ABSTRACT: A longitudinal entomological study was carried out from 1999 to 2001 in Lena, a humid savannah village in the western region of Burkina Faso in order to establish malaria vector bionomics and the dynamics of malaria transmission. In the first year, malaria transmission was mainly due to *An. gambiae* s.s., but during the two later years was due to *An. funestus*, which were observed in high frequency towards the end of the rainy season. PCR identification of samples of *An. gambiae* s.l. showed 93% to be *An. gambiae* s.s. and 7% *An. arabiensis*. *An. funestus* constituting more than 60% of the vectors were identified in PCR as *An. funestus* s.s. The persistence of intense vectorial activity in this village was probably due to the road building in a swampy area creating a semi-permanent swamp that provided large sites for larval mosquitoes. These swampy sites seemed to be more favorable for *An. funestus* than for *An. gambiae* s.s. Thus, land development must be monitored and subjected to planning to minimize vector proliferation. Such a system of planning could lead to the restriction or even elimination of the swamp that is the source of larvae developing in the heart of the village. *Journal of Vector Ecology* 33 (1): xxx-xxx, 2008.

Keyword Index: *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae* s.s., malaria transmission, semi-permanent swamp, Burkina Faso.

INTRODUCTION

Cotton is the main crop in the western region of Burkina Faso. To facilitate the management of this crop, the government and local community, in collaboration with the national cotton management company, have renovated or built road and storage facilities. This caused local changes in the ecological conditions that favored species formerly only considered as secondary vectors of malaria. In such a context, it is crucial to characterize the bio-ecology of such vectors and to evaluate their role in malaria transmission. Based on recent PCR techniques enabling us to address the species and molecular identification of the *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* complexes (Scott et al. 1993, Favia et al. 2001, Koekemoer et al. 2002), the aim of the present study was to investigate the bionomics of malaria vectors and their role in malaria transmission in an environmentally-modified village in western Burkina Faso formerly dominated by *An. gambiae* s.l. (Robert et al. 1985).

MATERIALS AND METHODS

Study site

Anopheles mosquitoes were collected in Lena (11°18'N; 03°53'W), a humid savannah village in southwestern Burkina Faso from 1999 to 2001. In this region, there are

two distinct seasons: rains occur only from May to October, with a long dry season from November to April. The average annual rainfall ranged from 1,000 to 1,200 mm in the last five years. The larval habitats consist mostly of rain-filled puddles and a semi-permanent swamp on either side of a small roadway suitable for *An. funestus* development. This roadway was built at the end of 1998 to facilitate crossing the swamp that formerly flooded the road.

Mosquito collections

Anopheles mosquitoes were sampled from February 1999 to December 2001 during the rainy season, four times per month by human landing catches and indoor insecticide aerosol spray catches. The human landing catches were carried out by informed volunteers who were provided with free and rapid treatment when they showed fever and *Plasmodium falciparum* parasitemia according to a WHO-recommended regimen. To evaluate human biting rates, pairs of humans sat indoors and outdoors collecting mosquitoes landing on themselves by using flashlights and glass tubes. Collections were carried out between 18:00 and 06:00 h inside and just outside eight houses in various parts of the swamp. To compensate for variation in catching efficiency, collectors rotated between houses on successive nights.

Indoor-resting females were caught by spraying village huts with pyrethroids. Female mosquitoes were knocked

down and immediately retrieved from white sheets laid on the floor of sprayed huts. Mosquitoes were dissected and the head and thorax preserved to determine their infection status. Legs were removed and kept dry for molecular species identification. Blood-fed females were stored in 1.5 ml tubes. Muirhead-Thomson (1958) pit traps were used to catch samples of exophilic mosquitoes in 2000.

Laboratory processing of mosquitoes

Anophelines were morphologically identified using keys of Gillies and Coetzee (1987). Later, some of the females were tested by ELISA for *P. falciparum* CSP (Wirtz et al. 1987) and those positive were processed by PCR for molecular identification of the *An. gambiae* complex species and *An. funestus* group and *An. gambiae* molecular forms (Scott et al. 1993, Favia et al. 2001, Cohuet et al. 2003). Blood meals were identified as human, bovine, sheep/goat, pig, or donkey using the ELISA technique of Beier et al. (1988).

Data analysis

The human biting rate (HBR) was calculated as the number mosquitoes captured per person per night. The rate of endophagy was defined as the proportion of the mosquitoes that were caught indoors with landing collections. The sporozoite rate was defined as the proportion of mosquitoes found positive for *P. falciparum* CS protein. The anthropophilic rate was calculated as the proportion of human blood among all blood meals tested. The entomological inoculation (EIR) was calculated as the product of HBR and the sporozoite rate of mosquitoes caught on landing collections.

RESULTS

Species composition and endophagic rate

In the three years, 1,647 *An. gambiae* s.l., 2,161 *An. funestus*, and 111 *An. nili* were identified. *An. funestus* predominated among malaria vectors with some seasonal and annual variations. *An. funestus* represented 60%, vs 38% for *An. gambiae* s.l. and 2% *An. nili*. However, in 1999, *An. gambiae* s.l. was the main malaria vector with 65% of the total vectors vs 34% of *An. funestus* and only 1% for *An. nili*. During the two later years, the vector population was dominated by *An. funestus* with 74% and 72% in 2000 and 2001, respectively, with a small increase of *An. nili* from 2 to 3% (Figure 2).

As shown in Table 1, indoor and outdoor catches of *An. gambiae* s.l. did not differ significantly from equality with each other within the same year ($\chi^2 = 3$, $df=2$, $P=0.2$). In contrast, *An. funestus* was significantly more endophagic than exophagic in each year and its endophagic rate increased greatly from 1999 to 2001 ($\chi^2 = 19.4$, $df=1$, $P<0.001$). *An. nili* tended to exophagy but outdoor catches did not significantly exceed indoor ones in any of the year.

Indoor resting collection and endophilic rate

From July 2000 to December 2001, 1,005 mosquitoes were collected in indoor spray collection of which 187 were *An. gambiae* s.l., 627 *An. funestus*, and 1 *An. nili* as malaria vectors. During 2000, only 14 *An. gambiae* s.l. and 33 *An. funestus* were caught in Muirhead-Thomson traps. Based on these data, it was concluded that *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* were endophilic.

Monthly variation of human biting rate

In 1999, biting of *An. gambiae* s.l. began at a low level in July reaching a peak of 25/b/h/n in September and

Table 1. Endophagic rate of vectors caught in Lena village from 1999-2001.

Years	Mosquito species	Indoors		Outdoors	
		N	%	N	%
1999	<i>An. gambiae</i> s.l.	459	48.4	489	51.6
	<i>An. funestus</i>	243	54.2*	205	45.8
	<i>An. nili</i>	9	36	16	64
2000	<i>An. gambiae</i> s.l.	184	52.3	168	47.7
	<i>An. funestus</i>	555	57.6**	409	42.4
	<i>An. nili</i>	16	48.5	17	51.4
2001	<i>An. gambiae</i> s.l.	178	53.6	154	46.4
	<i>An. funestus</i>	500	67.8**	237	32.2
	<i>An. nili</i>	19	36.5	33	63.5

* $P<0.05$.

** $P<0.001$ ($\chi^2=19.4$, $df=1$, $P<0.001$).

Figure 1. Relative frequencies of vector species caught in indoor human landing from 1999-2001.

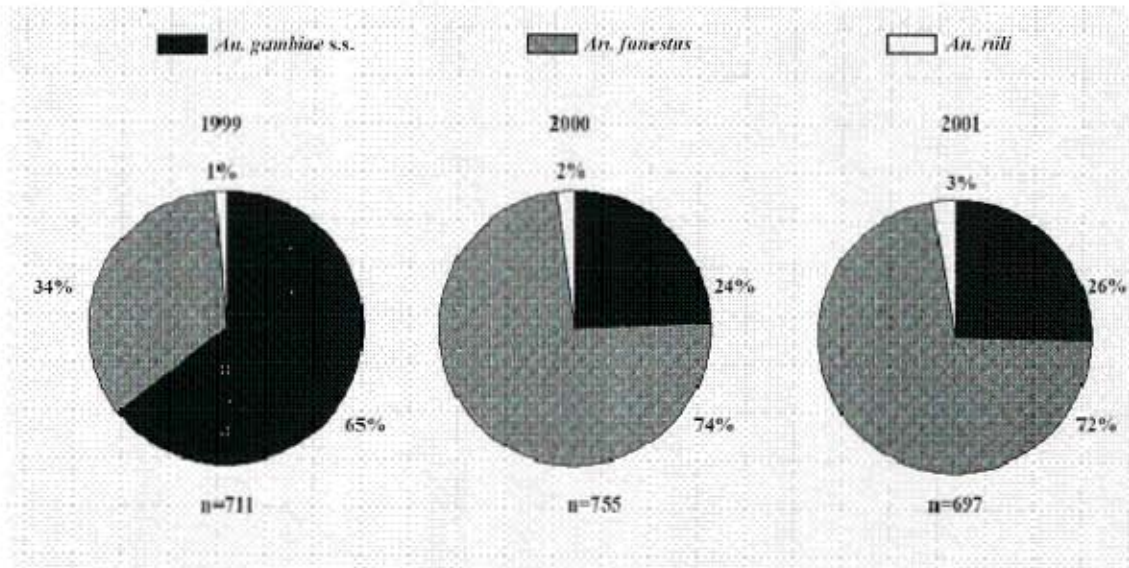


Table 2. Variation among years in entomological inoculation rate (EIR) in Lena village from 1999-2001.

Years	<i>Anopheles gambiae s.s.</i>			<i>Anopheles funestus</i>			
	Parity rate	Sporozoite rate	EIR	Parity rate	Sporozoite rate	EIR	
1999	Indoor	59.1 (77/129)	6.8 (25/366)	119	73.3 (11/15)	16.1 (5/31)	73
	Outdoor	62.1 (77/124)	5.7 (19/333)	112	50 (1/2)	7.1 (1/14)	5
2000	Indoor	74.6 (50/67)	12 (22/184)	85	62.1 (64/103)	4.8 (11/230)	86
	Outdoor	71 (44/62)	10.9 (19/175)	70	59.9 (53/89)	3.0 (7/230)	53
2001	Indoor	82.8 (48/58)	9.8 (18/183)	68	83.5 (86/103)	6.5 (24/370)	123
	Outdoor	74.5 (48/58)	7.9 (12/151)	47	77.1 (37/48)	5.9 (13/222)	51

Table 3. Origin of blood meals of vectors caught in Lena (percentages are between brackets).

Mosquito species	Human	Others (bovine, ovine, or pig)	Mixed (human and others)
<i>An. gambiae s.s.</i>	51 (62)	10 (13.4)	20 (24.6)
<i>An. funestus s.s.</i>	17 (56.6)	11 (36.7)	2 (6.6)

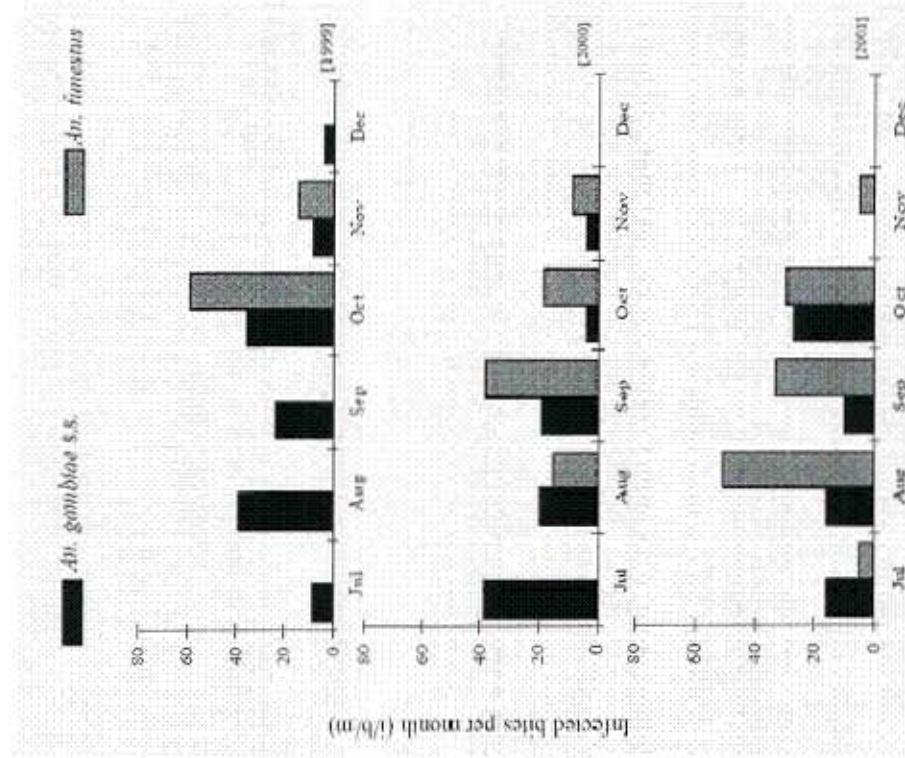


Figure 3: Monthly variation of the EIR from 1999-2001 in Lena.

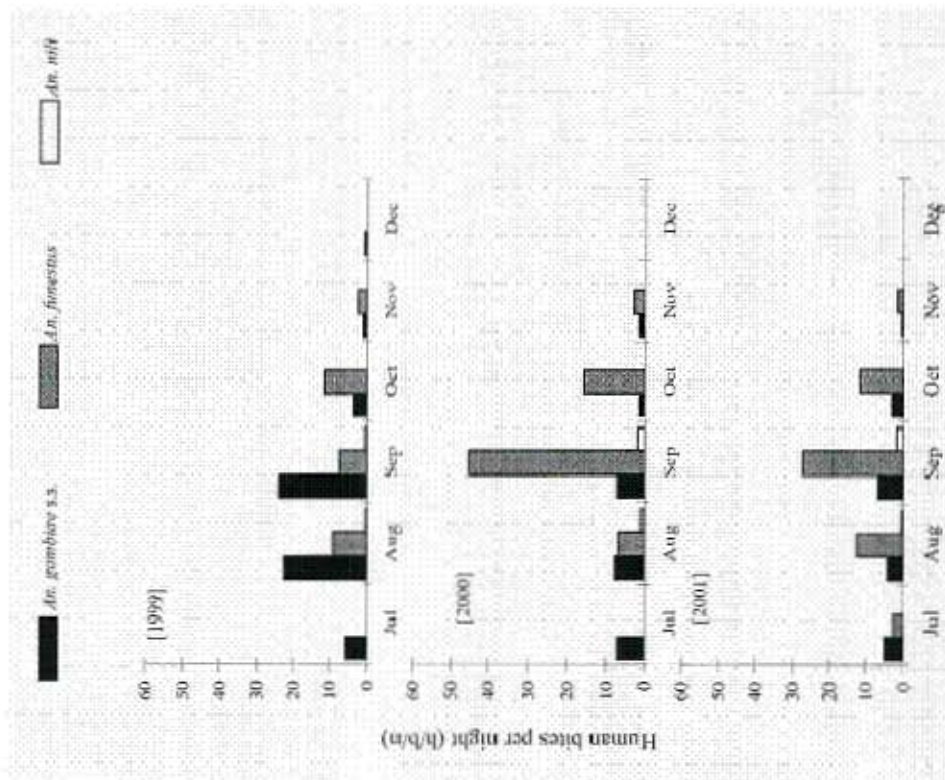


Figure 2: Monthly variation of the human landing rates from 1999-2001 in Lena.

decreased sharply in October. *An. funestus* remained below 15/b/h/n in all months (Figure 3). These two vectors were found biting until December at low frequencies. In 2000, *An. gambiae* s.l. biting predominated until August after which *An. funestus* increased and reached a peak of 45 b/h/n in September. Thereafter, the *An. gambiae* s.l. biting rate declined and neither *An. funestus* nor *An. gambiae* s.l. were observed in December. In 2001, *An. funestus* predominated as early as August and remained predominant until the end of the rainy season. Overall, the relative proportion of *An. gambiae* s.l. decreased and *An. funestus* increased.

Parity, circumsporozoite, and entomological inoculation rates

Data on parity and sporozoite rates of each species in each year are shown in Table 2. Because there were no major changes in parity rate, variation in EIR (Figure 4) resembled those in sporozoite rates, i.e., predominance of *An. gambiae* until September in 1999 with *An. funestus* thereafter. In 2000 and 2001, *An. funestus* predominated even in the earlier months (Table 2). *P. falciparum* CS protein was analyzed in 330 females of *An. gambiae* s.l. for species and molecular form identification. Only 7% (n=23) were identified as *An. arabiensis* vs 93% (n=307) as *An. gambiae* s.s. No *An. arabiensis* were found to be infected with *P. falciparum*. Among 210 females identified as *An. gambiae* s.s., 28% (n=60) were characterized as the M molecular form vs 72% of the S (n=150) molecular form. Three hundred female *An. funestus* (100 in each year) were analysed by PCR and identified as *An. funestus* s.s.

The anthropophilic rate

Eighty-two *An. gambiae* s.s. and 30 *An. funestus* randomly sampled from indoor resting females were tested for their origin of blood meal. These two species had anthropophilic rates reaching up to 55%, with a few cases of mixed meals (Table 3).

DISCUSSION

Because Lena is a typical savannah village, mosquito larval habitats are mainly rain-dependent and vector activities coincide with the rainy season. Thus, vector populations were dominated by *An. gambiae* s.l. during most of the rainy season. However, we observed some residual and intense vector activity occurring toward the end of the rainy season resulting from the appearance of *An. funestus* concomitantly with *An. gambiae* s.l., two major anthropophilic vectors. The first dominated the vector distribution especially in the years 2000 and 2001. Indeed the occurrence of *An. funestus* did not appear to modify overall vector abundance, but the proportion of each species. That led to a specific vector dynamic and malaria transmission pattern resulting in a high inoculation rate toward the end of the rainy season where the natural larval sites were drying. This increase of *An. funestus* apparently resulted from a semi-permanent swamp that favored *An.*

gambiae s.l. at the beginning of the rainy season before the vegetation grew abundantly and covered the water surface. As *An. gambiae* developed better in sites exposed to the sun and without vegetation (Carnevale et al. 1999), they had less ability to colonize this kind of breeding site and *An. funestus* had the opposite requirements. Indeed, there was more rain in 2000 than the other two years which might lead one to expect more vectors there, but this was not the case. In each year, August had the most rainfall but there was not a corresponding peak of the two vectors. The presence of a swamp is apparently the main cause of increased vector abundance toward the end of the rainy season. The dumping in the swamp of waste soil for road construction made the site more favorable to *An. funestus*. Furthermore, the volume of rain that fell between June and August was relatively higher and might contribute first, to leach away the breeding sites colonized by *An. gambiae* and second, to fill the swamps favorable to *An. funestus*.

In conclusion, the modification of the natural landscape by human activities can greatly change vector composition, shifting the malaria transmission pattern as suggested by our study. This landscape modification must be monitored and controlled by a system of planning permission to prevent vector proliferation that could interfere with local efforts to reduce the malaria burden. This consent action could lead to the restriction or even the elimination of the swamp which now allows vector breeding in the heart of the village.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from Danida, French Ministry of Cooperation and by the Programme Pal+ of the French Ministry of Scientific Research. We are grateful to the volunteers of Lena who made this study possible. We thank also Dr. Ole Skovmand for his helpful suggestions and comments during the drafting of this manuscript.

REFERENCES CITED

- Antonio-Nkondjio, C., P. Awono-Ambene, J. C. Toto, J.Y. Meunier, S. Zabaze-Kemletu, R. Nyambam, C.S. Wondji, T. Tchuinkam, and D. Fontenille. 2002. High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J. Med. Entomol.* 39: 350-355.
- Antonio-Nkondjio, C., F. Simard, P. Awono-Ambene, P. Ngassam, J.C. Toto, T. Tchuinkam, and D. Fontenille. 2005. Malaria vectors and urbanisation in the equatorial forest region of south Cameroon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99: 347-354.
- Awono-Ambene, H.P., P. Kengne, F. Simard, C. Antonio-Nkondjio, and D. Fontenille. 2004. Description and bionomics of *Anopheles* (Cellia) *ovengensis* (Diptera: Culicidae) a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *J. Med. Entomol.* 41: 561-568.

- Beier, J.C., P.V. Perking, R.A. Wirtz, J. Koros, D. Diggs, T.P.I. Gargan, and D.K. Koetch. 1988. Blood meal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.* 25: 9-16.
- Carnevale, P., P. Guillet, V. Robert, D. Fontenille, J. Doannio, M. Coosemans, and J. Mouchet. 1999. Diversity of malaria vectors in rice growing areas of the Afrotropical region. *Parassitologia* 41: 273-276.
- Cohuet, A., F. Simard, J.C. Toto, P. Kengne, M. Coetzee, and D. Fontenille. 2003. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am. J. Trop. Hyg.* 69: 200-205.
- Coetzee, M., M. Craig, and D. Le Sueur. 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol. Today* 16: 74-77.
- Dabiré, K.R., T. Baldet, A. Diabaté, I. Dia, A. Cohuet, C. Costantini, T.R. Guiguemdé, and D. Fontenille. 2007. *Anopheles funestus* s.l. Giles (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status and role in malaria transmission. *J. Med. Entomol.* (in press).
- Diabaté A., T. Baldet, F. Chandre, M. Akogheto, F. Darriet, C. Brengues, T.R. Guiguemdé, P. Guillet, J. Hemingway, and J.M. Hougaard. 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Hyg.* 67: 617-622.
- Favia, G., A. Lanfrancotti, L. Spanos, I. Sidéén-Kiamos, and C. Louis. 2001. Molecular characterisation of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 10: 19-23.
- Gillies, M.T. and M. Coetzee. 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region), vol. 55. Publications of the South African Institute of Medical Research, Johannesburg, South Africa, 143pp.
- Koekemoer, L.L., M.M. Weeto, L. Kamau, R.H. Hunt, and M. Coetzee. 2002. A cocktail polymerase chain reaction (PCR) assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera : Culicidae) group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 804-811.
- Mouchet, J., P. Carnevale, M. Coosemans, J. Julvez, S. Manguin, D. Richard-Lenoble, and J. Sircoulon. 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eutotext, 428 pp.
- Muirhead-Thomson RC. 1958. A pit shelter for sampling outdoor mosquito populations. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 19: 1116-1118.
- Robert, V., P. Carnevale, V. Ouedraogo, V. Petrarca, and M. Coluzzi. 1985. La transmission du paludisme humain dans un village de savane du Sud-Ouest du Burkina Faso. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 68: 107-121.
- Scott, J.A., W.G. Brogdon, and F.M. Collins. 1993. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 520-529.
- Touré Y.T., V. Petrarca, S.F. Traoré, A. Coulibaly, H.M. Maiga, O. Sangaré, M. Sow, M.A. Di Decco, and M. Coluzzi. 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477-511.
- Tripet, F., T. Thiemann, and G. C. Lanzaro. 2005. Effect of seminal fluids in mating between M and S forms of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.* 42: 596-603.
- Wirtz, R.A., F. Zavala, Y. Charoenvit, G.H. Campbell, T.R. Burkot, I. Schneider, K.M. Esser, R.L. Beaudoin, and G. Andre. 1987. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for Elisa development. *Bull. Wld. Hth. Org.* 65: 39-45.

Article 13

Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Kengne P., Brengues C., Gouagna L.C., Hougard J.M., Chandre F., Baldet T. (2008). The distribution of insensitive acetylcholinesterase (*ace.1*) in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa). *Acta Tropica* (soumis)

Elsevier Editorial System(tm) for Acta Tropica
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The distribution of Ace.1G119S mutation among *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa)

Article Type: Regular Articles

Section/Category:

Keywords: *Anopheles gambiae* s.s., ace.1 mutation, organophosphates, carbamates, Burkina Faso

Corresponding Author: Dr Kounbobr Roch DABIRE, Doctorat of 3e cycle

Corresponding Author's Institution: IRSS/centre Muraz

First Author: Kounbobr Roch DABIRE, Doctorat of 3e cycle

Order of Authors: Kounbobr Roch DABIRE, Doctorat of 3e cycle; Abdoulaye Diabaté, PhD; Moussa Namountougou, MSc; Luc S Djogbenou, MSc; Pierre Kengne, PhD; Fabrice Chandre, PhD; Carlo Costantini, PhD; Clément L Gouagna, PhD; Jean-Bosco Ouedraogo, PhD; Frédéric Simard, PhD; Thierry Baldet, PHD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: We investigated through transversal sampling at 20 localities across the three different agro-climatic zones of Burkina Faso, the distribution of the acetyl cholinesterase insensitive mutation ace.1, conferring the resistance phenotype to organophosphates (OP) and carbamates (CM) in *An. gambiae* s.l. Specimens were identified by PCR assays and characterized for the ace.1 gene. The overall collection of adults by indoor aerosol spray was a mix of *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* across the Sudan (97.3% vs 2.3%), Sudan-sahelian (78% vs 22%) and the Sahel (91% vs 9%) ecotypes. The distribution of the two molecular forms showed that the S form predominated in the Sudan sites from the West (67% vs 33% for the M form). It was found in similar proportion with the M form in the Sudan-sahelian sites (49% vs 51%) being very rare in the Sahel (100% of M form). The ace.1 gene was dispersed throughout the Sudan and Sudan-sahelian localities at low frequencies (<50%) and was absent in the Sahel. It was overall most spread

in the S molecular form (0.32 vs 0.03) but the highest frequency value was recorded in the M molecular form (0.6). No *An. arabiensis* was detected carrying this mutation. However it occurred in these two climatic zones, its distribution overlapped the cotton growing areas dispersed throughout the two zones. The role of agricultural uses of insecticides facilitating the spread of the ace.1 mutation is discussed. These results are important at epidemiological level as OP and CM had been proposed to be used in combination with pyrethroid as alternative strategy in vector control programs.

Bobo-Dioulasso, December 26, 2007

Object: Submission of a manuscript in Acta Tropica

Dear Editor-in -Chief,

We are willing to submit the manuscript entitled “The distribution of *Ace.1G119S* mutation among *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa)” to be considered for publication in your journal. We guess that the content of this paper will meet the convenience of the journal topic.

Best regards

DABIRE Kounbobr Roch

* 2. Potential Reviewers

I do not have specific reviewers to recommend. Can editor find a reviewer enable to improve my scientific background as I am a young scientist needing valuable and objective critics to increase my level.

The distribution of *Ace.1G119S* mutation among *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa)

Dabiré K.R.¹, Diabaté A.^{1,7}, Namountougou M.¹, Djogbenou L.², Kengne P.³, Chandre F.², Costantini C.⁶, Gouagna C.⁴, Ouédraogo J-B¹, Simard F.⁴, Baldet T.⁵

¹Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) /Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

²Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, CREC/IRD, Cotonou, Bénin

³Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN)-IRD, 911 Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

⁴IRSS/IRD Antenne de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

⁵Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, CIRAD/IRD, Cotonou, Bénin

⁶OCEAC/IRD, Yaoundé, Cameroun

⁷Laboratory of Malaria and Vector Research /NIAID/ NIH, Rockville, Washington, USA

Corresponding author: Dabiré K. Roch
IRSS/Centre Muraz, BP 390
Bobo-Dioulasso, Burkina Faso
E-mail: dabire_roch@hotmail.com

Abstract

We investigated through transversal sampling at 20 localities across the three different agro-climatic zones of Burkina Faso, the distribution of the acetyl cholinesterase insensitive mutation *ace.1*, conferring the resistance phenotype to organophosphates (OP) and carbamates (CM) in *An. gambiae* s.l. Specimens were identified by PCR assays and characterized for the *ace.1* gene. The overall collection of adults by indoor aerosol spray was a mix of *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* across the Sudan (97.3% vs 2.3%), Sudan-sahelian (78% vs 22%) and the Sahel (91% vs 9%) ecotypes. The distribution of the two molecular forms showed that the S form predominated in the Sudan sites from the West (67% vs 33% for the M form). It was found in similar proportion with the M form in the Sudan-sahelian sites (49% vs 51%) being very rare in the Sahel (100% of M form). The *ace.1* gene was dispersed throughout the Sudan and Sudan-sahelian localities at low frequencies (<50%) and was absent in the Sahel. It was overall most spread in the S molecular form (0.32 vs 0.03) but the highest frequency value was recorded in the M molecular form (0.6). No *An. arabiensis* was detected carrying this mutation. However it occurred in these two climatic zones, its distribution overlapped the cotton growing areas dispersed throughout the two zones. The role of agricultural uses of insecticides facilitating the spread of the *ace.1* mutation is discussed. These results are important at epidemiological level as OP and CM had been proposed to be used in combination with pyrethroid as alternative strategy in vector control programs.

Key-words: *Anopheles gambiae* s.s., *ace.1* mutation, organophosphates, carbamates, Burkina Faso

Introduction

First reported in *Anopheles gambiae* populations from Côte d'Ivoire (Elissa *et al.*, 1993), the Leu-Phe *kdr* had been observed spreading out throughout Africa especially in West Africa (Chandre *et al.*, 1999, Diabaté *et al.*, 2004, Awolola *et al.*, 2005, Tripet *et al.* 2007). *Kdr* mutation was associated prior to the intensive use of DDT and lately to pyrethroids for crop protection particularly in cotton areas (Chandre *et al.*, 1999; Diabaté *et al.* 2002). This mutation had been observed first in the S molecular form of *An. gambiae* s.s. reaching high frequencies whereas it was not found neither in sympatric mosquitoes of the M molecular form nor in *An. arabiensis* species (Chandre *et al.*, 1999; Brooke *et al.*, 1999). But few years after, it has been reported in the M form of the littoral from Benin to Guinea Bissau (Fanello *et al.*, 2000; Dabiré *et al.*, 2007). In-depth investigations carried out lately across inland savannahs detected also *kdr* mutation in the M populations but at very low frequency (Diabaté *et al.*, 2003). In Burkina Faso, some recent investigations performed on a large scale, recorded relatively high frequency of the *kdr* mutation both in the M molecular form and *An. arabiensis* (Dabiré *et al.*, unpubl.). These results were interesting at genetic level because contributing to understand the evolutionary process in *An. gambiae* s.l. genetics. But at operational levels, emergence of resistance within vector populations suggests an eventual failure in vector control mainly focused on the use of insecticide treated nets (ITNs). To prevent failure in ITNs efficacy and to fulfil difficulties related to the re-impregnation of such ITNs, many innovative researches have been conducted on the concept of long lasting nets (LLINs) based on pyrethroid and netting combinations. Even though in many parts of Africa, ITNs and LLINs still achieved a good control of pyrethroids-resistant populations (Darriet *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2005; Dabiré *et al.*, 2006), the reducing of susceptibility was reported at field level (Nguessan *et al.*, 2007). In such context, prospective researches had been initiated in order to anticipate the critical issue of resistance at operational level. Nowadays

two ways are envisioned i) the re-introduction of DDT formerly abandoned for indoor spraying (Rogan and Chen, 2005) and ii) the use of other insecticides such as organophosphates (OP) and carbamates (CM) in mosaic or in mixture with pyrethroids (Guillet *et al.* 2001). This later as soon as conceived, has to solve the resistance against CM and OP conferred by the *ace.1* mutation (Weill *et al.*, 2003). So far described in *Culex* populations from Côte-d'Ivoire (Chandre *et al.*, 1997), the reduced susceptibility to OP and CM was recently observed in *An. gambiae* populations in the North of Côte d'Ivoire and Benin (Nguessan *et al.*, 2003; Corbel *et al.*, 2007). This resistance resulted from a single point mutation (Glycine to Serine at position 119) termed *ace.1* G119S mutation (Weill *et al.*, 2003) that could be detected by PCR-RFLP assay (Weill *et al.*, 2004). The aim of the present study is to gather information on the spread of this mutation in *An. gambiae* s.l. populations from Burkina Faso. This information is crucial in the way to better conceive of CM and OP based-combination to be used in such ITNs.

Materials and methods

Study sites

Burkina Faso covers three ecological zones, ranging from Sudan savannah zone open to arid savannah zone (Sudan-sahelian) extends throughout much of the central part and aridland (Sahel) in the north. The northern part experiences a dry season of 6-8 months. Rainfall is heaviest in the south-west (5-6 months) with a relatively short dry season. The varied ecological conditions are reflected in the different systems of agriculture practiced throughout the country, from arable to pastoral lands. The western region constitutes the main cotton belt extending to the south where some new cotton areas have been cultivated. All ecological zones support the existence of *Anopheles* species, the vector of malaria parasites. Thus, malaria is widespread in the country.

Mosquitoes sampling

Adult mosquitoes were collected by indoor insecticides aerosol spray with pyrethroids insecticides from August to October 2006 in 20 sites throughout the three climatic zones of Burkina Faso (Figure 1). Anophelines species were identified morphologically using standard identification keys of Gillies and Cootzee (1987). They were kept on silicagel into 1.5-ml tubes and stored at -20°C prior to PCR analysis.

PCR analysis

An average of 30 mosquitoes was tested per site for molecular analysis. Genomic DNA was extracted from individual mosquito and PCR amplified to determine the different species within the *An. gambiae* complex (Scott *et al.*, 1993), to characterise the molecular form (M or S) within *An. gambiae* s.s. (Favia *et al.*, 2001) and finally to detect *ace.1* G119S mutation within all members of the complex. This latest procedure is based on slightly modified PCR reaction, described by Weill *et al.*, 2004 using specific primers *Ex3AGdir* (GATCGTGGACACCGTGTTTCG) and *Ex3AGrev* (AGGATGGCCCGCTGGAACAG). PCR was performed in 25µl volume containing 2.5µl of 10X *Taq* DNA polymerase buffer, 200µM desoxynucleoside triphosphate (dNTP) each, 0.1U of *Taq* DNA polymerase (Qiagen, France), 10pmol of each primer and about 1 to 10ng of extracted DNA. PCR conditions included an initial denaturation step at 94°C for 5min followed by thirty five cycles of 94°C for 30s, 54°C for 30s and 72°C for 30s, and a final extension at 72°C for 5min. Fifteen microlitres of PCR product was digested with 5U of *AluI* restriction enzyme (Promega, France) at 37°C during 3 hours in a final volume of 25 µl. The PCR-RFLP amplification products were analysed by electrophoresis onto a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Data were compared between ecological zones and pooled for each molecular form to comparing the genotypes frequency between molecular forms using chi square test.

Results

We analysed in total 568 mosquitoes from 20 localities in three climatic zones of Burkina Faso. The overall species composition indicated that the proportion of the S molecular form of *An. gambiae* s.s. was more frequent (89.7%) than *An. arabiensis* with only 10.2% (Table 1). The molecular S and M forms of *An. gambiae* s.s. were recorded in 16 sites and *An. arabiensis* in 9 sites. Their distribution varied at the country scale according to the climatic ecotypes. The S molecular form predominated (64.5 vs 32.8% for the M form) in the wooded savannah areas of the South and western regions whereas the M form occurred more frequently in the North with a gradient decreasing from North-West to South-West (Figure 2). The M form was the most frequent in the Sahel regions. The central areas were characterised by an overlapped repartition of the two molecular S (39.2%) and M (38.7%) forms with *An. arabiensis* (22.1%) (Fig. 2)

The *ace.1* mutation was recorded in 14 sites at varying frequencies being absent in the Sahel and the central regions (Fig. 2). The overall frequency of *ace.1* mutation was significantly higher in the S form (0.32) than in the M form with only 0.029 ($\chi^2=105$, $df=2$, $P<0.001$). Compared between zones, the *ace.1* frequency in the S molecular form was higher in the Sudan savannah than in the Sudan-sahelian zone (0.38 vs 0.22) where it was detected only in 6 sites ($\chi^2=19.68$, $df=2$, $P<0.001$) (Fig. 3). In the M molecular form, this mutation was detected overall in 5 sites with three located in the Sudan ecotype and the two others in the Sudan-sahelian zone. Even though it was spread across two climatic zones, it was recorded mostly in the cotton growing area (Table 1). Though the *ace.1* gene was less spread within the M molecular form the highest frequency (0.66) was recorded in this form in Houndé located

just on the limit of Sudan region. Furthermore the proportion of homozygous (RR) was significantly higher in the S form (22/289) than in the M molecular form (3/178) (Table 2). No *An. arabiensis* was recorded carrying this mutation.

Discussion

After extensive investigations, the *ace.1* G119S mutation conferring the acetyl cholinesterase resistance phenotype was detected in both M and S forms of *An. gambiae* s.s. in Burkina Faso. This mutation was widely distributed at relatively high frequencies in the S form and at low frequencies in the M molecular form but probably in ongoing spreading process. Alike the *kdr* mutation which was associated to the intensive use of insecticides in agriculture (Chandre *et al.*, 1999; Diabaté *et al.* 2002), the *ace.1* mutation seemed to be also more spread in the cotton growing areas as suggested by our data. The unequal distribution of the resistant phenotype within the M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s. is probably the result of differential insecticide pressure selection. The distribution and temporal dynamics of the molecular S form should expose it to greater insecticide selection pressure (Diabaté *et al.* 2002). Indeed the geographical distribution of this gene coincides with cotton growing areas from the west where also the S form was the most dispersed suggesting that this gene was also selected mainly by the use of insecticide in agriculture as described by Diabaté *et al.* (2002) for the *kdr* mutation. This hypothesis was supported by the very low frequency of this gene recorded either in M and S molecular forms from the central and Sahel sites where cotton growth was rare or absent. Evidence of agricultural selection of this gene was also given by the fact that all specimens carrying this gene were distributed in cotton developing areas both in Sudan and Sudan-sahelian localities being absent in the Sudan-sahelian sites without cotton cropping. As far as resistance to CM and OP was described within *An. gambiae* and *Culex quinquefasciatus* populations from the urban cities stretching the railway extended from the North of Cote-d'Ivoire to Bobo-Dioulasso in Burkina Faso, the emergence

of this resistance had been ascribed to the domestic use of insecticide against culicid nuisance. We expected to detect the *ace.1* mutation mostly in urban agglomerations but there is not the case. Indeed except the cities surrounded by the cotton belt, this mutation is absent in the larger cities of the central region such as Ouagadougou, Kaya etc. The main reason of the ongoing spreading of this gene and its equal distribution in cotton belt even though located in Sudan-sahelian region could result to the use of CM and OP in association with pyrethroids to treat cotton crops. This associated-treatment scheme had been adopted since 1996 in order to manage the pyrethroid-resistance of *Helicoverpa armigera* and *Bemisia tabaci* emerged throughout the cotton belt in Burkina Faso (Sofitex, 1996). All these arguments suggested that like the *kdr* mutation, the *ace.1* gene was prior selected by the agricultural use of insecticide which was intensive in cotton cropping areas. As the molecular S form was the predominated vector, it was prior exposed to the selection pressure than the M form. Some bioassays performed in 2003 on *An. gambiae* populations from four sites located in the cotton belt of the West of Burkina Faso revealed early resistance cases to CM and OP such as propoxur, endosulfan, chropyrifos ethyl and fenitrothion (Baldet, unpubl.) confirming the pattern of genetic resistance revealed in the present study. But the bioassays may be extended to a large scale in order to describe with accuracy the resistance status to OP and CM in Burkina Faso. The relative high proportion of homozygous specimens (RR) suggests that the spreading of this mutation is in ongoing process. Because of the simultaneous spreading of this gene within the S and M forms, it is difficult to predict the evolutionary process of the *ace.1* within the *An. gambiae* s.l. and between the two molecular forms. Nevertheless the pattern of distribution suggests that this gene should occur within the M molecular through introgression from the S to the M form. But some comparative sequencing of the *ace.1* intron between molecular forms and within *An. gambiae* s.l. is crucial to determine the evolutionary history and the level of gene flow between these taxa.

Acknowledgements

This study was financially supported by the MIM project (ID60098A) and partially by a grant of CDC/Atlanta. Authors are grateful to villagers of all localities who facilitated the sampling sessions.

References cited

- Awolola, T.S., Oyewole, I.O., Amajoh, C.N., Idowu, E.T., Ajayi, M.B., Oduala, A., Manafa, O.U., Ibrahim, K., Koekemoer, L.L. and Coetzee, M.; 2005. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Tropica* 95, 204-209
- Brooke, B.D., Hunt, R.H., Koekemoer, L.L, Dossou-Yovo, J. and Coetzee M.; 1999. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for detection of pyrethroid insecticide resistance in the malaria vector species of the *Anopheles gambiae* complex. *J. M. C. A.* 15, 565-568.
- Chandre, F, Manguin, S., Brengues, C., Dossou-Yovo, J., Darriet, F, Diabaté, A., Carnevale, P. and Guillet, P.; 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull. World Health Organ.* 77, 230-4.
- Chandre, F., Darriet, F., Doannio, J.M.C., Rivière, F., Pasteur, N. and Guillet, P.; 1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from West Africa. *J. Med. Entomol.* 34, 664-667
- Corbel, V., N'Guessan, R., Brengues, C., Chandre, F., Djogbenou, L., Martin, T., Akogbéto, M., Hougard, J.M. and Rowland, M.; 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Bénin, West Africa. *Acta Tropica* 3, 207-216
- Dabiré, K.R., Diabaté, A., Baldet, T., Paré-Toé, L., Guiguemdé, T.R., Ouédraogo, J.B., and Skovmand, O.; 2006. Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *Anopheles gambiae* s.s. resistance to pyrethroids. *Malaria Journal*, 5-12 doi: 10.1186/1475-2875-5-12.
- Darriet, F., N'Guessan, R., Koffi, A., Konan, L., Doannio, J.M., Chandre, F., et al., 2000. Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the

- prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC. Bull Soc. Pathol. Exot. 93, 131-4
- Diabaté, A., Baldet, T., Chandre, F., Akogbeto, M., Darriet, F., Brengues, C., Guiguemdé, T.R., Guillet, P., Hemingway, J. and Hougard, J.M.; 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67, 617-622.
- Diabaté, A., Baldet, T., Chandre, F., Dabiré, K.R., Kengne, P., Simard, F., Guiguemdé, T.R., Guillet, P., Hemingway, J. and Hougard, J.M.; 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.
- Diabaté, A., Brengues, C., Baldet, T., Dabire, K.R., Hougard, J.M., Akogbeto, M., Kengne, P., Simard, F., Guillet, P., Hemingway, J. and Chandre, F.; 2004. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de *novo* phenomena. Trop. Med. Int. Health. 9 (12), 1267-73
- Fanello, C, Akogbeto, M. and della Torre, A.; 2000. Distribution of the knockdown resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* s.l. from Benin. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 132.
- Fanello, C., Santomalazza, F. and della Torre, A.; 2003. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. Med. Vet. Entomol. 16, 461-464.
- Favia, G., Lanfrancotti, A., Spanos, L., Sideén-Kiamos, I. and Louis, C.; 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol. Biol. 10, 5-3
- Guillet, P., N'Guessan, R., Darriet, F., Traore-Lamizana, M., Chandre, F. and Carnevale, P.; 2001. Combined pyrethroid and carbamate "two in one" treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. Med. Vet. Entomol. 15, 105-12.
- Henry, M.C., Assi, S.B., Rogier, C, Dossou-Yovo, J., Chandre, F., Guillet, P. and Carnevale, P.; 2005. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Côte d'Ivoire. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73, 859-64.
- N'Guessan, R., Darriet, F., Guillet P., Carnevale, P., Traore-Lamizana, M., Corbel, V., Koffi A. and Chandre, F.; 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. Med. Vet. Entomol. 17, 1-7

- N'Guessan, R., Corbel, V., Akogbéto, M. and Mark, R.; 2007. Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance Area, Benin. *Emerging Infectious Diseases* 2, www.cdc.gov/eid
- Roll Back Malaria, World Health Organization, and United Nations Children Fund: The Africa malaria report 2003. Geneva: WHO; 2003.
- Scott, J.A., Brogdon, W.G. and Collins, F.H.; 1993. Identification of single specimens of *An. gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 520-529
- Tripet, F., Wright, J., Cornel, A., Fofana, A., Mcabee, R., Meneses, C., Reimer, L., Slotman, M., Thiemann, T., Dolo, G., Traoré, S. and Lanzaro, G.; 2007. Longitudinal survey of knock down resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 81-87
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P. and Raymond, M.; 2003. Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423 (6936), 136-137.
- Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M. and Raymond, M.; 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.* 13, 1-7.

Figure 1: Allelic frequency of *Ace.1* mutation in *An. gambiae* s.l. from 20 localities of Burkina Faso

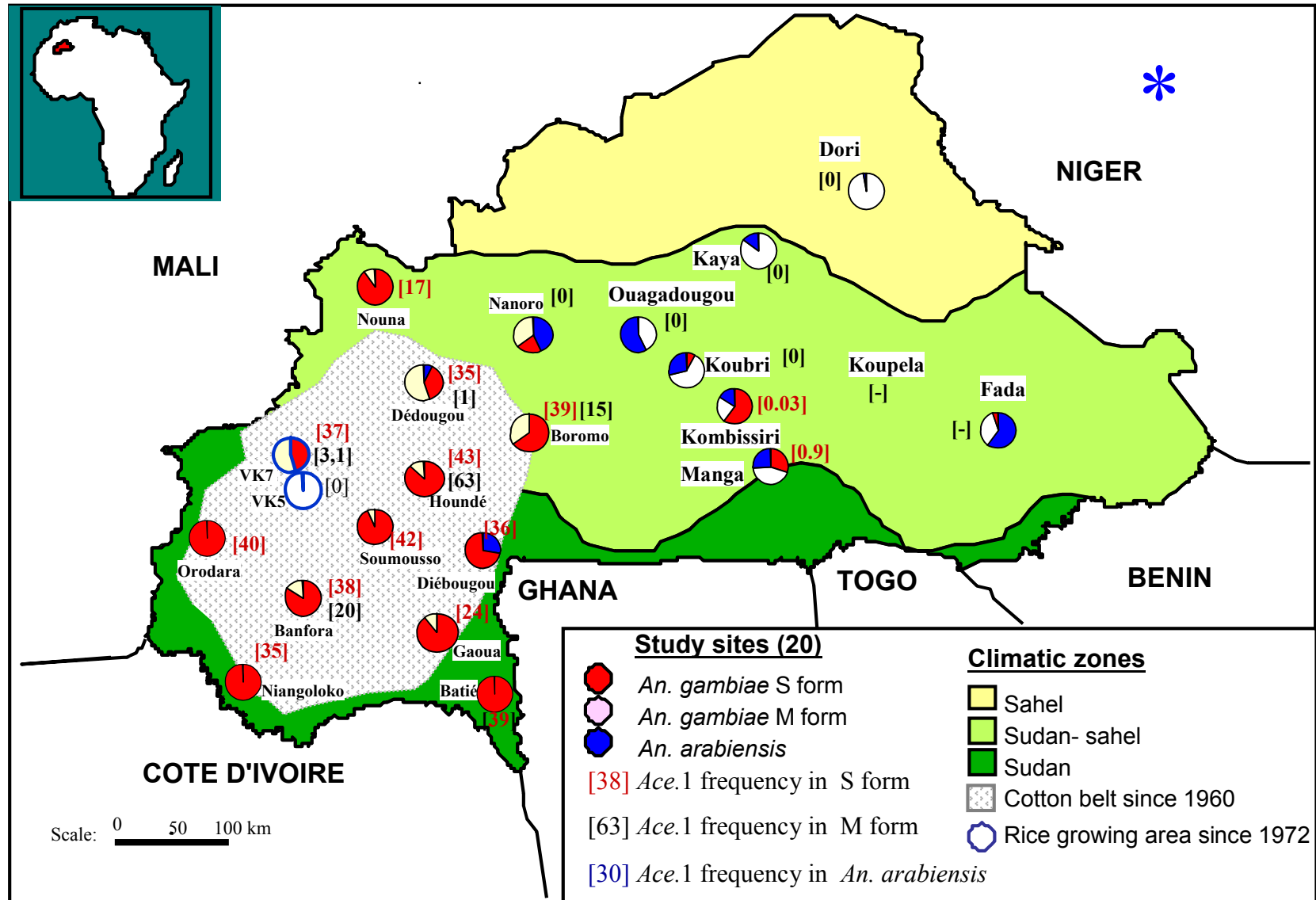


Figure 2: Comparison of the frequency of *ace.1* mutation between the three climatic zones of Burkina Faso

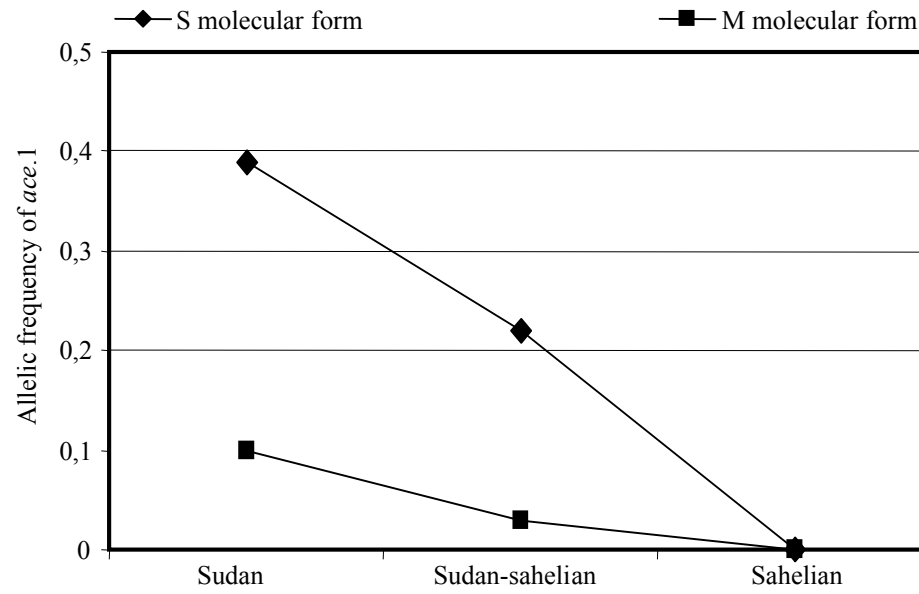


Table 1: number of mosquitoes tested in PCR and the repartition of *ace.1* genotype within *An. gambiae* s.l.

Species and molecular form	Genotype <i>Ace.1</i>			Total tested In PCR
	RR	RS	SS	
<i>An. gambiae</i> S form	22	133	114	269
<i>An. gambiae</i> M form	3	10	165	178
<i>An. arabiensis</i>	0	0	57	59

($\chi^2 = 116$, $df=2$, $P < 0.001$)

Table 2: distribution of the species of *An. gambiae* s.l., molecular forms of *An. gambiae* s.s. and the distribution of the frequencies of *ace.1* gene

Study sites	Geo-references	Agricultural practises	<i>An. gambiae</i> s.l.		Form S			Form M			<i>An. arabiensis</i>		
			N	F(ace.1)	N	%	F(ace.1)	N	%	F(ace.1)	N	%	F(ace.1)
Orodara	10°9'N,4°91'W	cotton, fruit trees	15	0,4	15	100	0,4	0	0	0	0	0	0
Niangoloko	10°26'67"N,3°08'33"W	cotton	19	0,35	19	100	0,35	0	0	0	0	0	0
Banfora	10°37'N4°45'W	cotton	30	0,33	25	83	0,38	5	17	0,2	0	0	0
Batié	9°27'N,2°45'W	cereals, cotton since 1996	27	0,39	27	100	0,39	0	0	0	0	0	0
Gaoua	10°20'N,3°11'W	cereals, cotton since 1996	21	0,21	19	90	0,24	2	10	0	0	0	0
VK5	4°23'41"N,11°24'13"W	rice	46	0	0	0	0	46	100	0	0	0	0
VK7	4°24'42"N,11°23'14"W	rice	58	0,18	26	45	0,37	32	55	0,031	0	0	0
Soumouso	11°01'46"N,4°02'45"W	cotton	29	0,41	27	93,1	0,42	2	6,9	0	0	0	0
Diébougou	10°58'N,3°15'W	cereals, cotton	23	0,36	15	57	0,38	0	0	0	5	22	0
Houndé	11°29,3°31'W	cotton	28	0,46	18	88	0,43	10	12	0,66	0	0	0
Boromo	11°45'N,0°52'W	cotton	28	0,3	23	64	0,39	3	34	0,15	0	0	0
Dédougou	12°28'N,3°27'W	cotton	27	0,19	10	60	0,35	15	40	0,1	2	7	0
Nouna	12°37'N,3°55'W	cotton	27	0,17	17	59	0,29	12	41	0	0	0	0
Nanoro	12°27'N,1°81'67"W	cereals	28	0	6	37,5	0	10	62,5	0	12	42,8	0
Manga	11°40'N,1°05'W	cereals, cotton since 1996	30	0,06	9	30	0,22	13	43,3	0	8	26,7	0
Kombissiri	12°04'N,1°21'3'W	cereals, cotton since 1996	30	0,033	18	60	0,055	7	23,33	0	5	0,17	0
Ouagadougou	12°21'14"N,1°30'41'W	urban, vegetables	26	0	0	0	0	11	42	0	15	58	0
Koubri	12°16'36'N,1°38'69'W	cereals, vegetables	21	0	2	9,5	0	13	62	0	6	28,5	0
Kaya	13°06'N, 1°05'W	cereals	26	0	0	0	0	22	84,6	0	4	15,4	0
Dori	14°03'N, 0°03'W	cereals	29	0	0	0	0	28	96,5	0	1	3,5	0

Article 14

Djogbenou L, **Dabiré K.R.**, Diabaté A., Kengne P., Akogbeto M., Hougard J-M, Chandre F. (2008). Identification and Geographic Distribution of the *Ace.1* Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(2): 298-302

Identification and Geographic Distribution of the *ACE-1^R* Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa

Luc Djogbénou,* Roch Dabiré, Abdoulaye Diabaté, Pierre Kengne, Martin Akogbéto, Jean Marc Hougard, and Fabrice Chandre

Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin; Laboratoire d'Entomologie et de Parasitologie, Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso; Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Research Unit 016, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; Institut de Recherche pour le Développement (IRD/CREC), Cotonou, Benin

Abstract. Resistance of *Anopheles gambiae* to organophosphate and carbamate insecticides was first reported in Côte d'Ivoire, West Africa. Subsequent studies revealed that it resulted from a single point mutation in the oxyanion hole of the acetylcholinesterase enzyme (*ace-1^R* mutation). We investigated the distribution and prevalence of the *ace-1^R* mutation in *An. gambiae* s.l. populations from seven locations in south-western Burkina Faso. The *ace-1^R* mutation was found in both M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s., but it was absent in *An. arabiensis*. Its frequency ranged from 0.25 to 0.5 in S form and 0.04 to 0.13 in M form, though they were sympatric. The lack of homozygous resistance indicated a strong genetic cost associated with the mutation. These data suggest that organophosphate and carbamate resistance conferred by target site insensitivity is spreading in populations of *An. gambiae* s.s. from West Africa.

INTRODUCTION

Anopheles gambiae Giles, the major malaria vector in West Africa, has been subjected to selection pressure by DDT and, more recently, pyrethroids through use of these insecticides for both agricultural and public health purposes.^{1,2} The intensive application of these chemical insecticides led to the development of resistance in many insects including *Anopheles* mosquitoes. The first case of resistance to pyrethroids in *An. gambiae* was reported in 1993.³ This resistance results from a single point mutation (leucine TTA to phenylalanine TTT) in the gene that encodes the sodium channel, and confers the characteristic “knockdown resistance” or *kdr* phenotype.⁴ This mutation is widespread in West Africa and may compromise the use of pyrethroids for public health.^{1,5–7} Some alternative solutions to pyrethroids are therefore necessary.^{8,9}

Preliminary experiments have already been done to test organophosphates (OP) or carbamates (CX) as alternatives to pyrethroids on insecticide-treated nets.¹⁰ However, insensitivity of wild *An. gambiae* to both insecticides, which target acetylcholinesterase (AChE), has been recently reported in West Africa.¹¹ Sequencing of this target site identified a single mutation, (glycine to serine at position 119) in the oxyanion hole of the acetylcholinesterase enzymes that was associated with insensitivity of *An. gambiae* to OP and CX.¹² This mutation, named *ace-1_G119S* or *ace-1^R* (using the *Torpedo* nomenclature), was the same described in *Anopheles albimanus* Weidemann and *Culex pipiens* Say.^{13,14} A Polymerase Chain Reaction (PCR)-based assay was devised to detect its presence in *An. gambiae*, *An. Albimanus*, and *Cx. pipiens*.¹⁴

This study is designed to evaluate the presence and extent of the distribution of the *ace-1^R* mutation within and among *An. gambiae* s.l. populations in south-western Burkina Faso where pyrethroid resistance was also reported in *An. gambiae*.^{2,15}

MATERIALS AND METHODS

Study area. The study was carried out in seven locations in south-western Burkina Faso, based on their different patterns of insecticide use: i) VK7, a village located on the outskirts of rice fields (11°24'N; 4°24'E); ii) two cotton-growing areas, Samandeni (11°27'N; 4°27'E) and Segueré (11°30'N; 4°24'E); iii) two sites in the urban area of Bobo-Dioulasso (11°10'N; 4°17'E) where more than 95% of the households use coils frequently to protect themselves against mosquito bites: Dioullassoba (Bobo 1), located in the center of the city and Kuinima (Bobo 2) on the outskirts; iv) Yegueresso (11°09'N; 4°10'E) and Darsalamy (11°02'N; 4°21'E), two villages not far from the urban area of Bobo-Dioulasso. Yegueresso and Darsalamy are sites with limited use of insecticides because agriculture is done at the subsistence level (e.g., beans and maize). All of these sites were located in the same climatic area (annual rainfall 1,000 mm) (Figure 1).

Mosquito collections. Larvae of *An. gambiae* s.l. were collected in October 2005 (end of the rainy season) and March 2006 (dry season) and were transferred to the IRSS (Institut Régional des Sciences de Santé) laboratory for adult emergence. *An. gambiae* adults were visually sorted according to morphologic identification keys and were kept at –20°C for molecular analysis.

DNA extraction and PCR identification of the *An. gambiae* M and S. Genomic DNA was extracted from individual mosquitoes using the protocol slightly modified from Collins and others.¹⁶ Species of the *An. gambiae* complex and molecular forms of *An. gambiae* s.s. were identified using the methods of Scott and others and Favia and others, respectively.^{17,18}

PCR identification of *ace-1^R* mutations of acetylcholinesterase gene of *An. gambiae*. The *ace-1* gene was amplified by PCR with Ex3AGdir 5'GATCGTGGACACCGTGTTCG3' and Ex3AGrev 5'AGGATGGCCCGCTGGAACAG3' oligonucleotide primers.¹⁴ PCR was performed in 25 µL volumes containing 2.5 µL of 10X *Taq* DNA polymerase buffer, 200 µM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.1 U of *Taq* DNA polymerase (Qiagen, France), 10 pmol of each primer, and 1 to 10 ng of extracted DNA. PCR conditions included an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by thirty

* Address correspondence to Luc Djogbénou, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604, Cotonou, Bénin. E-mail: Luc.Djogbenou@ird.fr

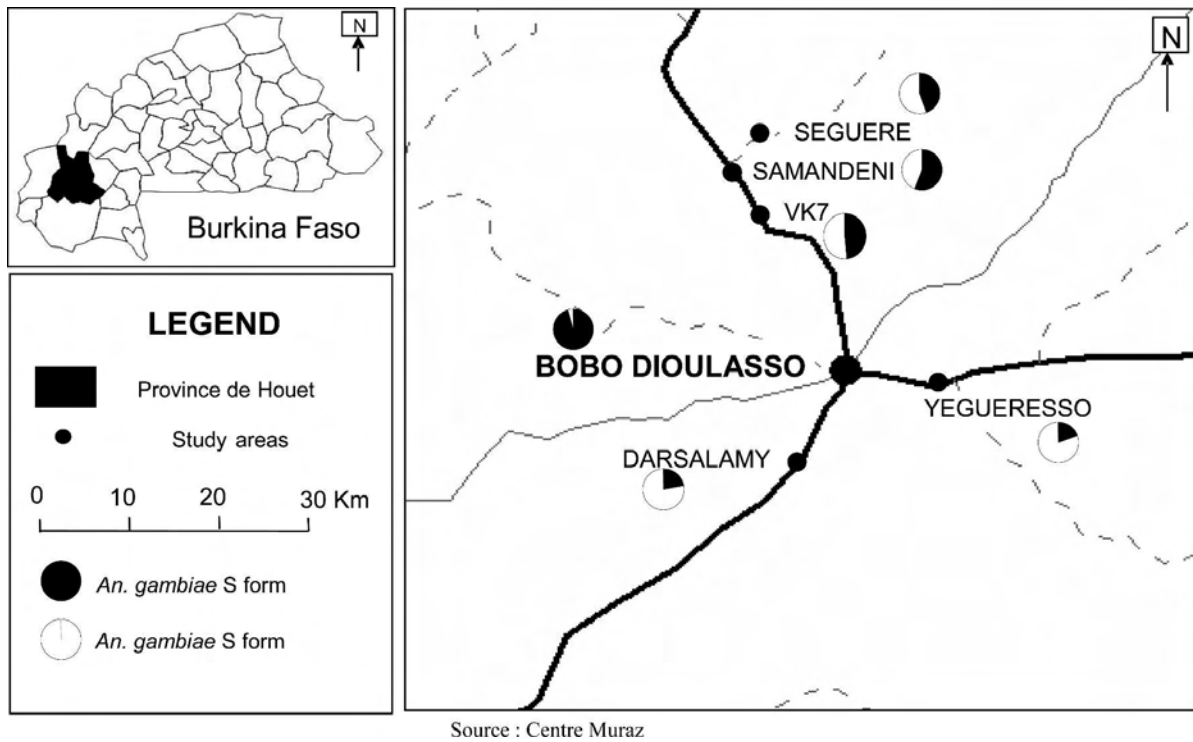


FIGURE 1. The study areas map showing the relative frequency of M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s.

five cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min. Fifteen microliters of this product were digested with 5 U of *AluI* restriction enzyme (Promega, France) in a final volume of 25 µL. The PCR amplification products were analyzed by electrophoresis onto a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Statistical analysis. Conformity of *ace-1^R* frequency with Hardy Weinberg expectations was tested for each population using the exact probability test.¹⁹

RESULTS

The numbers and species of mosquitoes collected are shown in Table 1. A total of 492 mosquitoes were identified to species level and to molecular form (Table 1). Two species of the *An. gambiae* complex were recorded and found in sympatry in six locations out of seven. Overall *An. gambiae* s.s. was predominant with 61%, but *An. arabiensis* (Patton) occurred at a significantly higher frequency in Darsalamy, Yegueresso, Bobo Dioulasso, and Seguer (> 58% in these breeding sites) as opposed to Samandeni (4%) and VK7 (0%). The two molecular forms of *An. gambiae* s.s. were sympatric in all locations, except in Bobo 2 where only S form was identified (Table 1). The S form predominated in urban areas at frequencies of 95–100%. The M form was predominant in Darsalamy and Yegueresso.

The *ace-1^R* mutation was detected in *An. gambiae* s.s. only and was present in all sites, regardless of the different patterns of insecticide use. Its frequency was higher in the urban, cotton, and rice-growing areas, compared with Yegueresso and Darsalamy where insecticide use is limited (Table 2). The *ace-1^R* allele is present in both M and S molecular forms of

An. gambiae but is more frequent in the S form (Table 2). In addition, few specimens analyzed were homozygous for the *ace-1^R* mutation (only 3 of 131 resistant mosquitoes recorded from all sites). A significant departure from Hardy Weinberg equilibrium was observed in some samples because of a strong deficit of homozygous-resistant individuals (Table 2).

DISCUSSION

Pyrethroid-treated bednets remain one of the major tools for malaria vector control in tropical areas. However, the spectrum of resistance to pyrethroids calls for alternative and complementary solutions. Even if they are not recommended for bednets impregnation, OP and CX should be considered as some alternatives for indoor residual spraying. Resistance of *An. gambiae* s.s. to OP and CX has been reported by N'Guessan and others¹¹ using bioassay techniques. This study demonstrated the need to monitor OP and CX resistance

TABLE 1

Frequencies in percentage of *Anopheles gambiae* s.s., S and M molecular forms, and *Anopheles arabiensis* at seven sites in southwestern Burkina Faso.

Area	Site	N	<i>Anopheles gambiae</i> s.s.			<i>Anopheles arabiensis</i> total (%)
			S-form (%)	M-form (%)	Total (%)	
Urban	Bobo 1	60	95.8	4.2	40.0	60.0
	Bobo 2	87	100	0.0	31.0	69.0
Cotton	Samandeni	47	55.6	44.4	95.7	4.3
	Seguer	43	44.4	55.6	41.9	58.1
Ricefield	VK7	166	48.2	51.8	100	0.0
Other sites	Darsalamy	45	22.2	77.8	20.0	80.0
	Yegueresso	44	20.0	80.0	22.7	77.3

* N: number of mosquito tested by PCR analysis.

TABLE 2
Frequencies of the *ace-1^R* allele and genotypes in the *Anopheles gambiae* s.s. and S and M molecular forms.

Area	Site	<i>Anopheles gambiae</i> s.s.		S-form					M-form				
		F(<i>ace-1^R</i>) & (N)	HW	RR	RS	SS	F(<i>ace-1^R</i>)	HW	RR	RS	SS	F(<i>ace-1^R</i>)	HW
Urban	Bobo 1	0.35 (24)	0.175	1	15	7	0.37	0.093	0	0	1	0	—
	Bobo 2	0.33 (27)	0.024	0	18	9	0.33	0.024	0	0	0	0	—
Cotton	Samandeni	0.19 (45)	0.320	0	17	8	0.34	0.021	0	0	20	0	—
	Seguere	0.17 (18)	1	0	6	2	0.38	0.441	0	0	10	0	—
Rice field	VK7	0.24 (166)	0.011	2	69	9	0.46	0.000	0	6	80	0.04	1
Other sites	Darsalamy	0.11 (9)	1	0	2	0	0.50	1	0	0	7	0	—
	Yegueresso	0.15 (10)	1	0	1	1	0.25	—	0	2	6	0.13	1

F (*ace-1^R*) values = frequencies of the *ace-1^R* mutation.

HW = the Exact Probability for rejecting Hardy-Weinberg equilibrium.

(N) = is the number of *An. gambiae* s.s.

among populations of the *An. gambiae* complex in Africa, to determine its spread and anticipate vector control failure where these insecticides are used. Since the development of a molecular test to detect the *ace-1^R* mutation in *An. gambiae*,¹⁴ this study is the first that reports the distribution of the *ace-1^R* mutation in populations of *An. gambiae* s.l. across areas with different patterns of insecticide use in Burkina Faso.

The use of insecticides for crop protection may explain the level of OP and CX resistance observed in some of our rural areas. Diabate and others² showed that agricultural use of insecticides in Burkina Faso was involved in the development of pyrethroid resistance in *An. gambiae* s.l.. In the cotton-growing areas, farmers use huge amounts of insecticides to avoid substantial yield reduction of their crops. Even if the selection pressure is much lower in rice field areas, a high frequency of resistant individuals was observed in VK7. VK7 is located at the periphery of rice fields and the resistant mosquitoes of the S form found in VK7 might have migrated from surrounding cotton areas as was the case for the *kdr* mutation in the same village.² In the urban area of Bobo-Dioulasso the presence of *ace-1^R* should be partly explained by the use of household insecticides, which sometimes contain carbamate. In 1993 in Bouake, Côte d'Ivoire, Elissa and others³ attributed the presence of permethrin resistance to the widespread use of pyrethroids in households. However, during our larval collections in Bobo-Dioulasso, we also noticed important vegetable growing areas within town where farmers apply large amounts of insecticides for crop protection (personal observations). Otherwise the results from the survey conducted in 2002 by Diabate and others² showed high levels of pyrethroid resistance (*kdr* mutation) up to 95.6% in the same area of Bobo 1. In Yegueresso and Darsalamy where limited amounts of insecticide is used to protect crops for subsistence, the level of resistance observed (0.11 for Darsalamy and 0.15 for Yegueresso) in mosquitoes may have been due to a migration from the urban areas of Bobo Dioulasso into these villages.

The molecular M and S forms of *An. gambiae* are incipient species.²⁰ They display a pattern of habitat segregation and a strong assortative mating in nature that results in a strong barrier to gene flow.^{21–23} The *ace-1^R* mutation was detected in both M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s. but at different frequencies. It was significantly higher in the S form, probably reflecting the differences in the insecticide selection pressures the two forms experience in their natural habitats. It is not clear from our data whether the OP and Cx resistance gene was selected in one form and arose later on in the second one through genetic introgression as it has been shown with

the *kdr* mutation. Further studies to clarify this point are needed and eventually that may help to better understand the gene flow pattern between the two forms in natural populations. Although *An. arabiensis* was found in sympatry with the two molecular forms of *An. gambiae*, the *ace-1^R* mutation was never found in this mosquito species suggesting that gene flow between *An. arabiensis* and *An. gambiae* is strongly reduced.

The high relative frequencies of *An. arabiensis* in our mosquito samples across the study area were surprising. Previous studies in the same area have recorded a maximum of 8% of *An. arabiensis* in contrast to the present study where *An. arabiensis* represented 60% of the total collection.^{2,21} Coluzzi and others²⁴ first reported the penetration of this mosquito species into urban settings in southern Nigeria. Many other studies confirmed these observations later in different places drawing attention to the rapid extension of *An. arabiensis* into urban areas.^{25,26} Further studies are needed to understand the current distribution of *An. arabiensis* in West African cities.

The insensitivity of acetylcholinesterase to OP and CX leads to a reduction of the normal enzyme function. Several studies have suggested that the biochemical change introduced by G119S results in a fitness reduction on life-history traits associated with the mutation. This phenomenon was observed with *Cx. pipiens*. Numerous life-history traits are modified in insecticide-resistant individuals as compared with susceptible ones (e.g., an increased larval development time and mortality, a lower male reproductive success, and a lower female survival during overwintering).^{27,28} The data obtained from the field samples in the present study indicate that the frequency of resistant homozygous individuals (*ace-1^{RR}*) is extremely low in adult females (1% homozygous resistant versus 45% heterozygous). The Hardy-Weinberg test showed an excess of heterozygotes. This drastic lack of resistant homozygous *An. gambiae* in the field is consistent with the hypothesis of a high fitness cost associated with the G119S mutation in this species. Additional studies are required to explore this hypothesis through laboratory experiments comparing different life-history traits of the resistant allele, to understand the low frequency of resistant homozygous specimens recorded in the field populations.

In conclusion, we report here that this mutation occurs in many specimens of *An. gambiae* s.s. found in South-Western Burkina Faso in addition to the case in Bouake in Côte d'Ivoire. All these findings suggest that OP and CX resistance may be widespread throughout West Africa. This wide distribution of *ace-1^R* mutation in West Africa theoretically could result either from the spread of the single mutation or from the independent occurrence of the same or different muta-

tions in many countries. Although the rate of mutations generating resistance genes among mosquitoes is unknown, we can consider that the migration including passive transportation of mosquitoes and gene flow play major roles in the dispersion of resistance genes between distant populations.²⁹ Further genetic studies will be performed on mosquito samples to investigate gene flow between Bouake in Côte d'Ivoire and other towns in Burkina Faso. However mosquitoes with resistance for both *kdr* and *ace-1^R* mutations were found in the field. The presence of both resistance mechanisms (*kdr* and *ace-1^R*) in mosquitoes may allow them to be simultaneously resistant to pyrethroids, carbamates, and organophosphates. Although there is no miraculous short-term solution to this resistance problem, it is important for program managers to better understand resistance issues and to promote good practices in chemical-based vector control. Indeed it is essential to use public health insecticides in such a way that they are safe, effective, and affordable, while taking into account resistance problems. This work like others underlines the relationship between vector resistance and the use of agricultural insecticides. It is clear that closer collaboration between resistance experts in agriculture and public health is needed. Public health agencies can definitely benefit from the extensive experience gained by the agricultural sector in promoting integrated pest-management principles as well as disseminating simple and pragmatic guidelines for insecticide resistance management.

Received May 26, 2007. Accepted for publication October 31, 2007.

Acknowledgments: We thank J. B. Ouedraogo, the head of IRSS, for his support during the study. Our thanks also go to A. Ouattara for his participation in mosquito sample collection. Finally, we thank Sébastien Koudénoukpo of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou for his help with the genotyping.

Financial support: This study and Luc Djogbénu were supported by a grant from Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

Authors' addresses: Luc Djogbénu and Martin Akogbéto, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604, Cotonou, Bénin, Tel: +229-21-33-08-25, Fax: +229-21-37-49-81, E-mail: Luc.Djogbenou@ird.fr. Roch Dabiré and Abdoulaye Diabaté, Laboratoire d'Entomologie et de Parasitologie, IRSS/Centre Muraz, BP 153, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, Tel: 226- 97-01-02, Fax: 226-97-04-57. Pierre Kengne, Laboratoire de Lutte Contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France, Tel: 33-4-67-04-32- 23, Fax: 33-4-67-54-20-44. Jean-Marc Hougard and Fabrice Chandre, Institut de Recherche pour le Développement (IRD/CREC), 01 BP 4414 RP, Cotonou, Bénin, Tel: +229-21-37-49-82, Fax: +229-21-37-49-81.

REFERENCES

- Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P, 1999. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Cote d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc* 15: 53–59.
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ, Hougard JM, 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 67: 617–622.
- Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY, Yao K, 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Cote d'Ivoire. *Ann Soc Belg Med Trop* 73: 291–294.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, 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.
- Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M, 2003. Absence of the *kdr* mutation in the molecular 'M' form suggests different pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* s.s. *Trop Med Int Health* 8: 420–422.
- Fanello C, Petrarca V, della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, Allouche A, Curtis CF, Toure YT, Coluzzi M, 2003. The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 12: 241–245.
- Yawson AE, McCall PJ, Wilson MD, Donnelly MJ, 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med Vet Entomol* 18: 372–377.
- Curtis CF, Miller JE, Hodjati MH, Kolaczinski JH, Kasumba I, 1998. Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bednets against malaria vectors? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1769–1775.
- Zaim M, Guillet P, 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol* 18: 161–163.
- Fanello C, Kolaczinski JH, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF, 1999. The *kdr* pyrethroid resistance gene in *Anopheles gambiae*: tests of non-pyrethroid insecticides and a new detection method for the gene. *Parassitologia* 41: 323–326.
- N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, Koffi AA, Chandre F, 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol* 17: 19–25.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M, 2003. Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423: 136–137.
- Ayad H, Georghiou P, 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *J Econ Entomol* 68: 295–297.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M, 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13: 1–7.
- Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, Akogbeto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Chandre F, 2004. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health* 9: 1267–1273.
- Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V, 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg* 37: 37–41.
- Favia G, Dimopoulos G, della Torre A, Toure YT, Coluzzi M, Louis C, 1994. Polymorphisms detected by random PCR distinguish between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10315–10319.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 520–529.
- Rousset F, Raymond M, 1995. Testing heterozygotes excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413–1419.
- 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.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, 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: 319–322.
- della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, Coluzzi M, 2002. Speciation within *Anopheles gambiae*—the glass is half full. *Science* 298: 115–157.
- Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pas-

- teur N, Guillet P, Raymond M, 2000. The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol* 9: 451–455.
24. Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA, 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 483–497.
25. Kristan M, Fleischmann H, della Torre A, Stich A, Curtis CF, 2003. Pyrethroid resistance/susceptibility and differential urban/rural distribution of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s. malaria vectors in Nigeria and Ghana. *Med Vet Entomol* 17: 326–332.
26. Lemasson JJ, Fontenille D, Lochouarn L, Dia I, Simard F, Ba K, Diop A, Diatta M, Molez JF, 1997. Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera:Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J Med Entomol* 34: 396–403.
27. Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C, 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112–113: 287–296.
28. Weill M, Labbe P, Duron O, Pasteur N, Fort P, Raymond M, 2005. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: towards an understanding of the evolution of ace genes. Felowes MDE, Holloway GJ, and Rolff J, eds. *Insect Evol Ecolo*. Oxon, UK: CABI Publishing.
29. Raymond M, Callaghan A, Fort P, Pasteur N, 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 350: 151–153.

Article 15

Dabiré K.R., Diabaté A., Baldet T., Paré L., Guiguemdé T.R., Ouédraogo J.B., Skovmand O. (2006). Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *Anopheles gambiae* s.s. resistance to pyrethroids. *Malaria Journal*, 5-12 doi: 10.1186/1475-2875-5-12

Research

Open Access

Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *Anopheles gambiae* s.s. resistance to pyrethroids

Roch K Dabiré*^{1,2}, Abdoulaye Diabaté^{1,2}, Thierry Baldet³, Léa Paré-Toé², Robert T Guiguemdé², Jean-Bosco Ouédraogo^{1,2} and Ole Skovmand⁴

Address: ¹IRSS, Direction régionale de Bobo-Dioulasso, BP 545 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, France, ²Centre Muraz, BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, France, ³CIRAD-EMVT, Campus International de Baillarguet 34398 Montpellier Cedex 5, France and ⁴Intelligent Insect Control, Montpellier, France

Email: Roch K Dabiré* - dabire_roch@hotmail.com; Abdoulaye Diabaté - a_diabate@hotmail.com; Thierry Baldet - thierry.baldet@cirad.fr; Léa Paré-Toé - lea_toe@yahoo.com; Robert T Guiguemdé - rguiguemde@yahoo.fr; Jean-Bosco Ouédraogo - jb_ouedraogo@hotmail.com; Ole Skovmand - ole.skovmand@insectcontrol.net

* Corresponding author

Published: 10 February 2006

Received: 28 July 2005

Malaria Journal 2006, **5**:12 doi:10.1186/1475-2875-5-12

Accepted: 10 February 2006

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/5/1/12>

© 2006 Dabiré et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The development of mosquito nets pre-treated with insecticide, Long Lasting Impregnated Nets (LLINs) that last the life span of the net, is a solution to the difficulty of the re-impregnation of conventional nets. Even if they showed a good efficacy in control conditions, their efficacy in the field, particularly in areas with resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids, is not well documented. This study compares wide (Olyset®) and small (Permanet®) mesh LLINs in field conditions, using entomological parameters.

Methods: The two LLINs were tested in a rice-growing area of south-western Burkina Faso (West Africa) with year around high density of the main malaria vector *An. gambiae* s.s. In the study village (VK6), there is a mixed population of two molecular forms of *An. gambiae*, the S-form which dominates during the rainy season and the M-form which dominates the rest of the year. The two LLINs Olyset® and Permanet® were distributed in the village and 20 matched houses were selected for comparison with four houses without treated nets.

Results: Mosquito entrance rate was ten fold higher in control houses than in houses with LLINs and there was no difference between the two net types. Among mosquitoes found in the houses, 36 % were dead in LLIN houses compared to 0% in control houses. Blood feeding rate was 80 % in control houses compared to 43 % in LLIN houses. The type of net did not significantly impact any of these parameters. No mosquitoes were found inside Permanet®, whereas dead or dying mosquitoes were collected inside the Olyset®. More than 60% of mosquitoes found on top or inside the nets had had blood meals from cattle, as shown by ELISA analysis.

Conclusion: The percentage of blood-fed mosquitoes in a bed net study does not necessarily determine net success. The efficacy of the two types of LLINs was comparable, during a period when the S-form of *An. gambiae* was carrying the *kdr* gene. Significantly higher numbers of mosquitoes were collected in control houses compared to intervention houses, indicating that the LLINs provided an additional deterrent effect, which enhanced their expected prevention capacity.

Background

The use of insecticide-treated bed nets (ITNs) for individual as for collective protection against malaria has been shown to reduce morbidity of childhood malaria (below five years of age) by 50% and global child mortality by 20%–30% [1-3]. ITNs are now considered to represent efficient tools for malaria vector control, when used on a large scale [4,5]. One of the key issues for their use on a large scale is the impregnation and the re-impregnation that needs technical skills and materials, which may not always be available [6]. Preliminary surveys have shown that less than 5% of nets available in Africa were properly treated or re-treated. The use of mosquito nets pre-treated with insecticide, Long Lasting Impregnated Nets (LLINs), that last the life span of the net, is a solution to this problem [7]. Two LLINs are now available and have been preliminarily recommended by WHO for malaria prevention: the Olyset® [8] net, made of polyethylene netting material (mesh 20 holes/cm²) with permethrin (2% of concentration) incorporated into the polymer before monofilament

yarn extrusion, and the Permanet® [9] net, made of polyester netting material (mesh 25 holes/cm²) with deltamethrin incorporated (55 mg ai/m²) in a resin coating of the fibers.

Resistance to the insecticides used for impregnation may be a limiting factor to impregnated nets in vector control. Pyrethroid resistance of the most important African malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. is already widespread in several West African countries [10,11]. A common resistance is caused by the *kdr* mutation that occasionally is found at very high frequency (>90%) [12,13]. Fortunately, the predominant *kdr* mechanism apparently does not prevent the efficacy of pyrethroid-treated bed nets [14,15]. Contrary to West Africa, malaria vector control failure due to metabolic-based resistance on pyrethroid efficacy was reported in South Africa. This resistance is closely associated with the presence of a high level of oxidase activity and sometimes conferring cross-resistance to the carbamate insecticide in the local vector *Anopheles*

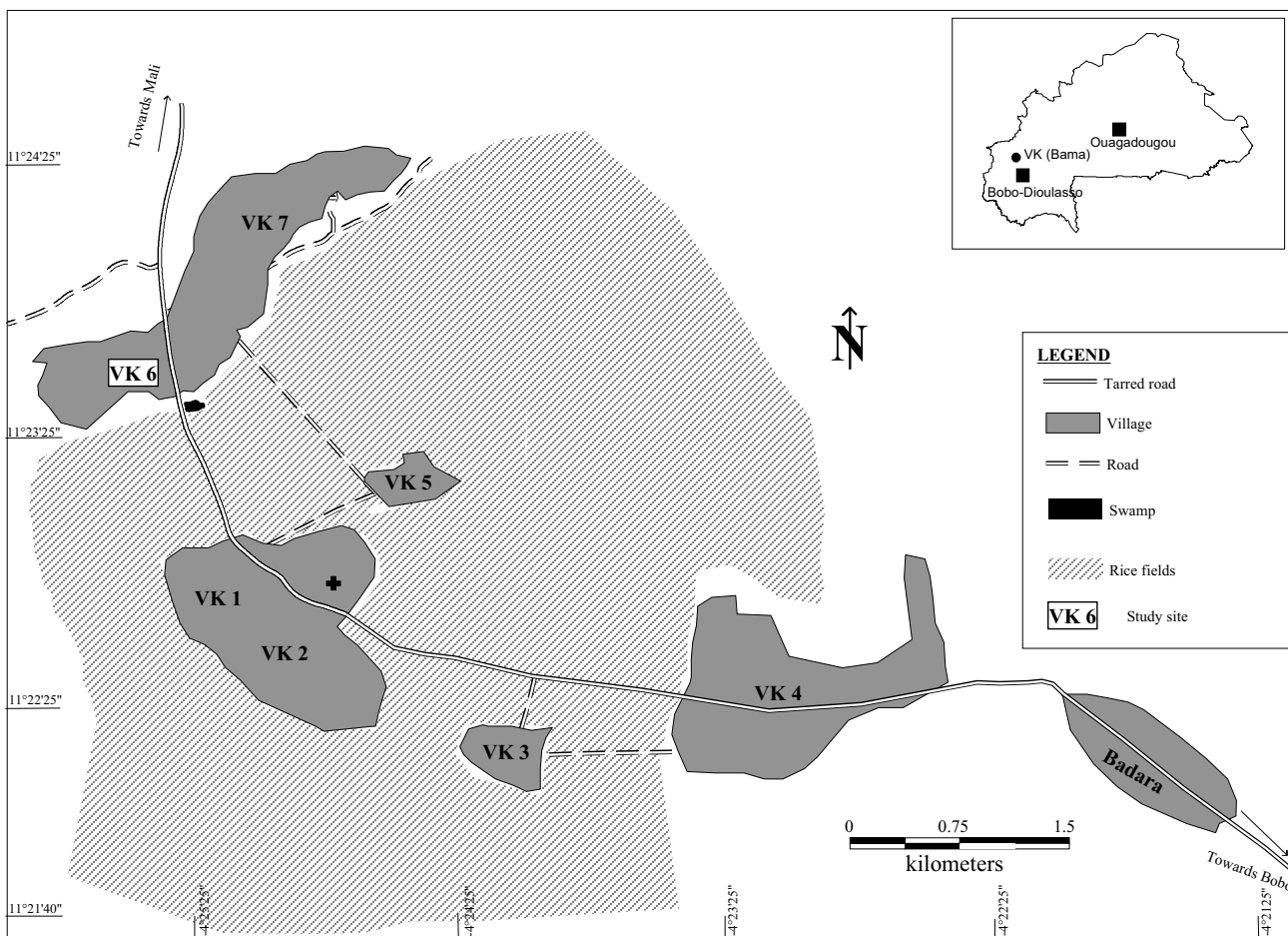


Figure 1
Location of the study site.

funestus, as recently mentioned in Kwazulu Natal and Mozambique (16-17). This oxydase-based resistance has been also observed in *An. gambiae* populations from Cameroon [18,19] and Kenya [20]. Bed nets without insecticide can never provide complete protection against blood-questing mosquitoes. However, when treated with pyrethroids, they reduce the number of mosquitoes entering houses and further reduce the blood-feeding rates of those entering. Torn impregnated nets have been shown still to reduce host/vector contact, and it has been argued that the most important effect of ITN is the mass effect on mosquitoes, whether it is before or after biting [3,21]. However, some authors considered that to be most effective, impregnated nets should have no holes, no entry flaps and should be tucked in under a mattress, which will not allow mosquitoes access inside the bed net [22]. It is likely that most people primarily acquire and use bed nets for their individual protection against mosquitoes biting [23,24].

It has been shown that mosquitoes with *kdr* resistance are less susceptible to the excito-repellent effect of pyrethroids [25] and it may, therefore, be possible that such mosquitoes will enter the wider meshed Olyset® net and bite even when this net is still intact. Therefore, in contrast to most published studies, this study compares intact LLINs with wide (Olyset®) and small (Permanet®) mesh on the entomological parameters in an area with *kdr-An. gambiae* populations.

Materials and methods

Study area

The survey was conducted in "Vallée du Kou", a rice growing area of southern Burkina Faso, West Africa. It is located at 30 km in the North of Bobo-Dioulasso between 4° 24' 42" longitude west and 11° 23' 14" latitude north and is composed of 7 villages with a total of 4,470 inhabitants (Figure 1). Irrigation exists in this area since 1972, and is now sub-permanent with two crops grown per year: from February to June during the dry season and from July to November during the rainy season. An unprotected human sleeping in the central rice-field area (VK5) is exposed to more than 60,000 mosquito bites/year [30]. *An. gambiae* and *An. funestus* are the two major vectors present. *Anopheles arabiensis* is rare and found in sympatry with *An. gambiae* in the surrounding savannah. The two molecular forms M and S of *An. gambiae* were observed in the periphery of the rice field during the rainy season. Huge amount of insecticides, mainly pyrethroids, are used to protect cotton from pest attacks in the neighbouring savannah. Previous studies conducted in this area found resistant *An. gambiae* populations to permethrin and deltamethrin in the periphery of the rice fields, but susceptible in the centre. This resistance is due to the *kdr* mutation, which occurs in the *An. gambiae* S-form popu-

lation (95%), particularly at the end of the rainy season [11]. The *kdr* mutation was also observed in the M form in a very low proportion (4%) [13]. For these reasons and especially because of the high vector density throughout the year, the village of VK6 was selected to study the personal protection by Permanet® and Olyset® nets.

Entomological survey

Mosquitoes collection

In total, 20 households matched in size and near the periphery of the rice field were equipped with Permanet® and Olyset® nets. Matched houses with either a Permanet® or an Olyset® net were not more than 50 metres apart. Mosquitoes were collected four days/month from September to November 2003. Volunteer, informed-sleepers caught blood-seeking mosquitoes in the nets from 8:00 pm to 12:00 pm and again in the early morning at 6:00 am. Residual resting indoor fauna was collected in the houses early in the morning by manual aspirators. All nets were inspected to ensure that they had no holes, no entry flaps and were tucked in under the beds. All mosquitoes found in the nets, on the nets or indoor resting or dead on the floor were collected, counted and morphologically identified. Mosquitoes were classified according to physiological status (unfed, fed and gravid). Mosquitoes collection in the morning at 6:00 am was performed in four houses without any insecticide-treated objects or nets as control. In these control houses, from 6:00 pm to 12:00 pm, blood-seeking females were caught as above and volunteers slept after 12:00 pm under their own untreated nets usually used for personal protection.

Bloodmeal identification

The origin of bloodmeals from fed females captured above and inside the nets were identified as human or bovine using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described by Beier et al. [26]. In total, 45 fed-mosquitoes, respectively 24 and 21 from Olyset® and Permanet®, representing exclusively malaria vectors were analysed by ELISA.

Species and molecular forms of *An. gambiae* identification and *kdr* mutation distribution

A sample of 44 *An. gambiae* collected above and inside the nets (half from both Olyset® and Permanet®) was selected for PCR test. Genomic DNA was extracted from single mosquitoes and PCR amplified to identify the species within *An. gambiae* complex [27], to determine the molecular form (M or S) within the species *An. gambiae* [28], and, finally, to detect the *kdr* mutation [29].

Statistical analyses

Four parameters were compared between the two LLINs: (i) the percentage of house entering (compared to entrance in control houses), (ii) the number of mosqui-

Table 1: Global house entering rate by mosquitoes (percentages are noted in italic) [In each line or row, values sharing a superscript letter are significantly different at 95 % confidence interval]

Mosquito species	Control	LLINs houses	Type of LLINs	
			Olyset®	Permanet®
<i>An. gambiae</i>	8,350 92*	1,263 81.9*	633 85.8	630 78.3
<i>An. funestus</i>	110 1.2	95 6.2*	32 4.3	63 7.8
<i>C. quinquefasciatus</i>	618 6.8*	185 12*	73 9.9	112 13.9
Entry rate	85.5*	14.5*	6.9	7.6
% Deterrency		83	-	-

* Significantly different $P < 0.05$

toes collected above and inside the nets, (iii) the fed rate and (iv) the mortality rate. For each entomological parameter, comparison between treatment was made by performing a two way analysis of variance (ANOVA) and a chi square test at 95 % confidence interval.

Results

Mosquito house entering rate and mosquito house location

Global house entering rate

In total 10,621 mosquitoes were collected during the study (Table 1) and consisted mainly of *Anopheles* and *Culex* with unfed, fed, gravid, half gravid, alive or dead mosquitoes from both control and LLINs-equipped houses. 9,078 mosquitoes were caught in control houses by morning capture, while only 1,543 mosquitoes were collected in either Olyset® or Permanet® LLINs-equipped houses during night and in morning capture. The total number of mosquitoes collected from the different LLINs did not differ significantly ($P > 0.05$). The deterrency rate of the two LLINs was similar, averaging respectively 92% and 91% in Olyset® and Permanet® equipped houses. The global deterrent effect, calculated as the difference of entering rates between control and total of LLINs-equipped

houses, was estimated to 83% (Table 1). Globally, *Anopheles* were significantly more numerous than *Culex quinquefasciatus* irrespective of the LLINs ($P = 0.01$). Whatever the LLINs, *An. gambiae* was the most frequent mosquito, reaching 82%, followed by *C. quinquefasciatus* with 12% and *An. funestus* with 6.2%.

Mosquito house location

Mosquitoes were collected dead or alive, above or inside the nets (both Permanet® and Olyset®) and indoor elsewhere in the house (Table 2). The number of indoor resting mosquitoes did not differ significantly with the two types of LLINs (491 for Permanet®, 506 for Olyset®) and this was significantly higher than the number of mosquitoes collected from the nets (above and inside) whatever the LLINs ($P < 0.05$). The proportion of mosquitoes found above the nets and inside the nets was similar for the two types of nets ($P > 0.05$) with respectively 33.5% and 37.1% for Olyset® and Permanet® equipped houses. The number of mosquitoes collected above the nets was two fold higher on Permanet® than on Olyset®. While dead mosquitoes from Permanet® were exclusively collected above the net, half of them from Olyset® were collected inside the net.

Table 2: Comparison of the proportion of mosquitoes according to their collection place in the LLINs equipped-houses (percentages are noted in italic) [In each line, values sharing a superscript letter are significantly different at 95 % confidence interval]

LLINs	Resting indoor			Above LLIN			Inside LLIN			Total
	Ag ¹	Af	Cq	Ag	Af	Cq	Ag	Af	Cq	
Olyset®	398 53.9*	27 3.7	66 8.9	128 17.3*	2 0.3	2 0.3	107 14.5*	3 0.4	5 0.7	738
Permanet®	363 45.1*	41 5.1	102 12.7	267 33.2*	22 2.7	10 1.2	0 -	0 -	0 -	805

*significantly different $P < 0.05$ ¹Ag : *Anopheles gambiae*, Af : *An. funestus*., Cq : *Culex quinquefasciatus*

Table 3: Comparison of the global mortality rate and the mortality rates following the mosquito collection place in the two LLINs - equipped houses (percentages are noted in *italic*)

Mosquito status	Mosquito collection place	Olyset® house			Permanet® house			Control house		
		Ag	Af	Cq	Ag	Af	Cq	Ag	Af	Cq
Dead	Above LLIN	128	2	2	267	22	10	-	-	-
	Inside LLIN	107	3	5	-	-	-	-	-	-
	Resting indoor	10	0	3	3	0	0	-	-	-
		260			302			0		
		35.3			37.5					
Alive	Above LLIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Inside LLIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Resting indoor	398	27	66	363	41	102	8,350	110	618
		478			503			9,808		

*significantly different, $P < 0.05$ Ag = *Anopheles gambiae*; Af = *Anopheles funestus*; Cq = *Culex quinquefasciatus*

Mortality rate

The global mortality rate was similar in the two LLINs houses averaging 36% (Table 4). Compared to the control houses, a high percentage of mortality was recorded in houses equipped with LLINs (36.4% vs 0%). The proportion of dead mosquitoes collected above the net was significantly higher (37.1%, $n = 299$) on Permanet® than that on Olyset® net (17.9%, $n = 132$). 15.6% of dead mosquitoes were recorded inside Olyset® net while no mosquito was found inside Permanet®. No live mosquitoes were caught above or inside the nets, but a total of 17 dying mosquitoes were collected above the two LLINs. The number of dying mosquitoes was similar in the two types of nets and was trivial compared to the total of dead mosquitoes. All mosquitoes in touch with LLINs (above or inside) were dead. Few dead mosquitoes were collected indoor the LLINs houses ($n = 13$ vs 3 respectively for Olyset® and Permanet® equipped houses). Molecular form identification performed on 44 *An. gambiae* collected above and inside the nets showed that 88.5% of *An. gambiae* tested were of molecular M form and this proportion did not differ significantly between the two LLINs. The *kdr* gene was detected only in the all S form tested in PCR ($n = 5$). No *An. arabiensis* was found in the PCR-analysed mosquitoes.

Mosquito blood-fed status

Less than 40% of mosquitoes collected in the LLINs equipped-houses were engorged while 79.8% were recorded in control houses (Table 5), showing a reduction of the rate of fed females averaging 42%. However, the rate of fed mosquitoes was slightly superior in Olyset®-equipped houses, but it did not differ significantly between the two nets ($P > 0.05$). Within the females collected above or inside the nets ($n = 247$ vs 299, respec-

tively for Olyset® and Permanet®), about 7% were fed mosquitoes regardless of the type of net (Table 5).

Blood meals origin

Overall, 45 specimens of engorged *An. gambiae* collected in and above the nets were analysed to determine the source of the bloodmeal. Most of the engorged females were fed on cattle, respectively 62% and 79% for Permanet® and Olyset® (Table 6). The rate of mosquitoes fed on humans did not differ significantly ($P > 0.05$) irrespective of the LLIN, reaching respectively 21% and 30% for Olyset® and Permanet®. The rate of mosquitoes fed on cattle was high in the LLINs equipped-houses.

Discussion

The study was carried out in a rice field area, where high densities of mosquitoes are observed throughout the year [30]. *An. gambiae* and *C. quinquefasciatus* were resistant to pyrethroids in this area and resistance of the *An. gambiae* S form is pronounced at the end of the rainy season [11]. *Kdr* resistance was also observed in a small proportion (less than 5%) of *An. gambiae* M form, conferring a susceptible status to M population. But as *An. gambiae* S form proportion (even during its maximum peak at the end of rainy season) has never gone beyond 30 %, the global pyrethroid resistance status of this area is an intermediate resistance one [13]. This intermediate resistance status could probably explain that the two LLINs showed a global efficacy and no differential efficacy level was observed.

These results were consistent with those obtained in experimental huts from the Bouaké region in Côte d'Ivoire concerning the efficacy of LLINs in *Anopheles* and *Culex* resistant areas [15]. In contrast, in a resistance area from Danané in the north of Côte d'Ivoire, where the *An.*

Table 4: Comparison of the rate of fed and unfed dead females following their collection place in LLINs equipped houses (percentages are noted in *italic*)

Mosquito status	Mosquito collection place	Olyset® house			Permanet® house			Control house		
		Ag	Af	Cq	Ag	Af	Cq	Ag	Af	Cq
Unfed	Above LLIN	100	1	1	221	17	9	-	-	-
	Inside LLIN	84	3	3	-	-	-	-	-	-
	Resting Indoor	85	8	24	74	12	38	ND	ND	ND
		309			371			726		
Fed	Above LLIN	21	1	0	38	4	1	-	-	-
	Inside LLIN	19	0	2	-	-	-	-	-	-
	Resting indoor	232	16	21	171	26	25	6294	ND	ND
		312			265			7242		
		42.3			32.9			79.8*		
Gravid	Above LLIN	7	0	1	8	1	0	-	-	-
	Inside LLIN	4	0	21	-	-	-	-	-	-
	Resting indoor	81	3	21	118	3	39	ND	ND	ND
		117			168			1110		

* significantly different $P < 0.05$ Ag = *Anopheles gambiae*; Af = *Anopheles funestus*; Cq = *Culex quinquefasciatus* ND : undetermined

gambiae S form was observed with 80% of *ldr*, although the permethrin pre-impregnated Olyset nets showed a good mass effect [21], their efficacy on the reduction of entomological inoculation rate decreased significantly [31]. A similar study may be performed with deltamethrin-LLINs (Permanet®) in a high resistance area, as they would be expected to maintain a better efficacy, as already demonstrated in the semi-natural conditions of experimental huts [14]. Nevertheless, in the intermediate pyrethroids resistance area of the present study, an important mortality was observed both with Permanet® and with Olyset® nets, compare to the control. It is likely that all mosquitoes which have been in contact with the nets were killed. The few dying mosquitoes that were collected above Permanet® and inside Olyset® nets should be considered as truly dead mosquitoes as they were unable to fly away. Furthermore, fed mosquitoes were found dead

or dying above Permanet® or above/inside Olyset® nets. That evokes the possibility that these mosquitoes could bite sleepers and transmit malaria in case they were infected before dying especially inside the Olyset® nets. To respond to this question, sleepers were asked to keep awake in the nets and to collect mosquitoes seeking blood meal from 8:00 pm to 12:00 pm. This showed that mosquitoes caught before midnight above or inside the nets were dead or dying and some of them felt through the aperture of the net. Fed as well as unfed mosquitoes were collected in this way. Two hypothesis could be addressed to explain the presence of fed females in LLINs: i) these mosquitoes have engorged first on cattle and, as it is known that *An. gambiae* bites several times in a gonotrophic cycle [32], they may seek a human host to complete their bloodmeal, even if sleepers are protected by LLINs; ii) the engorged females collected above or inside

Table 5: Bloodmeal origin of fed *Anopheles gambiae* females from LLINs equipped houses analysed by ELISA (percentages are noted in *italic*)

Source of Bloodmeal	Olyset®			Permanet®		
	Inside	Above	Total	Inside	Above	Total
Human	3	2	5	0	8	8
	-	-	20.8*	-	-	38.1*
Bovine	12	7	19	0	13	13
	-	-	79.2	-	-	61.9

*significantly different, $P < 0.05$

the different nets were already blood-fed on cattle and, because in this high anopheline density area *An. gambiae* is very endophilic as a result of the use of bed nets on a large scale, they come inside houses to rest after feeding, even in LLINs-equipped houses. While seeking a place to rest in these houses, they come in contact with the nets and die.

The bloodmeal identification indicated that the majority of fed females had engorged on cattle, confirming the high zoophilic rate (about 70 %) of *An. gambiae* in this particular rice-field area, where Robert et al. [33] also observed high zoophilic rate compared to that of the neighboring savannah villages. This particular zoophilic rate can be explained by i) the proximity of livestock as each household has usually a pair of cattle for rice field tillage living the same concession; ii) because of the high density of mosquitoes in this area with more than 60,000 mosquito bites/year [30], almost every household used nets (but not necessarily treated-nets) for personal protection. For these reasons, *An. gambiae* (and other species also) developed a zoophilic behaviour for host preference. Nevertheless, some human-bloodfed females were found above and inside LLINs. This relatively low proportion of human-bloodfed mosquitoes (30%) should have been engorged on the sleepers as shown in a study carried out in Tanzania [34].

A significantly ($P < 0.02$) high proportion of unfed mosquitoes was collected in houses equipped with treated nets compared to control houses. This result confirms that LLINs clearly reduced blood meal rate as had been demonstrated in previous studies on ITNs efficacy carried out in East Africa [24,34,35].

Conclusion

To conclude, both Permanet® and Olyset® showed a good efficacy against *An. gambiae* as no live individual was caught above and inside the nets. Moreover, significantly less mosquitoes were collected in treated houses compared to control ones, indicating that these two LLINs provided, in addition to the mosquito mortality, a deterrent effect [36] which enhances their expected prevention capacity. However, this study needs to be performed in a high resistance area, such as the Lena village where *An. gambiae* populations are dominated by the S form (more than 95%) with 90% of *kdr* gene [11]: this will permit a more precise evaluation of Permanet® efficacy in an area with pyrethroid resistance.

Authors' contributions

DKR participated to the study design, undertook the field study, analysed data and wrote the paper. DA participated in the study design, the data analysis and the manuscript drafting. BT participated to the data analysis and interpre-

tation, the drafting and the revision of the paper. TPL participated to study design. GTR and OJB are administrative authorities who facilitated the implementation of the study. SO designed the study, participated to the analysis of data and the drafting of the manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Vestergaard® company. Authors are grateful to volunteers and households of "Vallée du Kou" who allowed this study to take place.

References

- Lengeler C, Cattani J, De Savigny D: **Net gain. A new method for preventing malaria deaths.** IDRC Ottawa/WHO, Geneva; 1996:189.
- Binka FN, Kubaje A, Adjuik M, Williams LA, Lengeler C, Maude GH, Arma GE, Kajihra B, Adiamo JH, Lengeler C, Smith PG: **Impact of permethrin treated bed nets in child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial.** *Trop Med Int Health* 1996, 1:147-154.
- Nevill CG, Some ES, Mung'ala VO, Mutemi W, New L, Marsh K, Lengeler C, Snow RW: **Insecticide-treated bed nets reduce mortality and severe morbidity from among children on the Kenyan Coast.** *Trop Med Int Health* 1996, 1:139-46.
- Curtis CF: **Appropriate methods of vectors control.** Boca Raton, Florida CRC Press; 1990:5-46.
- WHO: **A global strategy for malaria control, Geneva.** 1990:30.
- Lines J: **Mosquito nets and insecticides for nets treatment: a discussion of existing and potential distribution systems in Africa.** *Trop Med Int Health* 1996, 1:616-632.
- Guillet P, Alnwick D, Cham MK, Neira M, Zaim M, Heymann D, Mukelabai K: **Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention.** *Bull World Health Organ* 2001, 79:998.
- WHO: **Report of the fifth whopes working group meeting (Review of VectoBaWG, Permanet® and Gokilaht-S5EC), Geneva.** 2001:43.
- WHO: **Report of the seventh WHOPES working group meeting (Review of VectoBaWG, Permanet® and Gokilaht-S5EC), Geneva.** 2004:78.
- Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P: **Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire.** *J Am Mosq Contr Assoc* 1999, 15:53-59.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemé TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small G, Hougard JM: **The role of agricultural insecticides in *Anopheles gambiae* s.l. resistance to pyrethroids in Burkina Faso, West Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67:617-622.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P, Guillet P: **Current distribution of pyrethroid resistance gene (*Kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form.** *Parasitology* 1999, 41:319-322.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Dabiré KR, Kengne P, Guiguemé TR, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM: ***Kdr* Mutation, a Genetic marker to Assess events to Introgression Between the Molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the Tropical Savannah area of West Africa.** *Entomol Soc America* 2003, 40:195-198.
- Darriet F, Guillet P, N'guessan R, Doannio JMC, Koffi A, Konan LY, Carnevale P: **Impact de la résistance aux pyréthrinoides sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans la prévention du paludisme: résultats des essais en cas expérimentales avec la deltaméthrine.** *Bull Soc Path Exot* 2000, 93(Suppl 2):131-134.
- Darriet F, Guillet P, N'guessan R, Doannio JMC, Koffi A, Konan LY, Carnevale P: **Impact de la résistance d'*Anopheles gambiae* ss à la perméthrine et à la deltaméthrine sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées.** *Med Trop* 2000, 58:349-354.

16. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembe J, Coetzee M: **Anopheles funestus resistant to pyrethroids insecticides in South Africa.** *Med Vet Entomol* 2000, **2**:181-189.
17. Brooke BD, Kloke G, Hunt RH, Koekemoer LL, Temu EA, Taylor ME, Small G, Hemingway J, Coetzee M: **Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera : Culicidae).** *Bull Entomol Res* 2001, **91**:265-272.
18. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D: **Insecticide Susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera : Culicidae) in Republic of Cameroon.** *J Med Entomol* 2003, **4**:492-497.
19. Etang J, Chandre F, Guillet P, Manga L: **Reduced bio-efficacy of permethrin EC impregnated bed nets against an *Anopheles gambiae* strain with oxidase-based pyrethroid tolerance.** *Malar J* 2005, **3**:46.
20. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangui RW, Hawley WA: **Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenya villages using permethrin-impregnated nets.** *Med Vet* 1999, **13**:239-244.
21. Henry MC, Doanio JMC, Darriet F, Nzeyimana I, Carnevale P: **Efficacité des moustiquaires pré-imprégnées de perméthrine OLYSET® Nets en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoides II. Evaluation parasito-clinique.** *Med Trop* 1999, **59**:355-357.
22. Lindsay SW, Snow RW, Bloomfield GL, Janneh MS, Wirtz RA, Greenwood BM: **Impact of permethrin-treated bed nets on malaria transmission by the *Anopheles gambiae* complex in the Gambia.** *Med Vet Entomol* 1989, **3**:263-271.
23. Van Bortel W, Barutwanonyo M, Delacole C, Coosemans M: **Motivation to acquire and use impregnated mosquito in a stable malaria zone in Burundi.** *Trop Med Int Health* 1996, **1**:71-80.
24. Binka FN, Adongo P: **Acceptability and use for insecticide ednets in northern Ghana.** *Trop Med Int Health* 1997, **2**:499-507.
25. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F, Hougard JM, Guillet P: **Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance.** *Malar J* 2004, **3**:22.
26. Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan TP, Koech DK: **Bloodmeal identification by direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera : Culicidae) in Kenya.** *J Med Ent* 1986, **25**:9-16.
27. Scott JA, Brogdon WD, Collins FH: **Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520-529.
28. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I, Louis C: **Molecular characterisation of ribosomal polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss.** *Insect Mol Biol* 2001, **10**:19-30.
29. 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**:179-84.
30. Baldet T, Diabaté A, Guiguemdé TR: **Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama) Burkina Faso.** *Cahiers Santé* 2003, **13**:55-60.
31. Doannio JMC, Dossou-Yovo J, Diarrasouba G, Chauvancy G, Darriet F, Chandre F, Henry MC, Nzeyimana I, Guillet P, Carnevale P: **Efficacité des moustiquaires pré-imprégnées de perméthrine OLYSET® en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoides I. Evaluation entomologique.** *Med Trop* 1999, **59**:349-354.
32. Koella JC, Sorensen FL, Anderson RA: **The malaria parasite *Plasmodium falciparum* increases the frequency of multiple feedings of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*.** *Proc R Soc Lond Biol Sc* 1998, **265**:763-768.
33. Robert V, Gazin P, Carnevale P: **Malaria transmission in three sites surrounding the area of Bobo-Dioulasso (Burkina Faso): the savanna, a rice field and the city.** *Bull Soc Vect Ecol* 1986, **12**:541-543.
34. Lines J, Lengeler C, Cham K, de Savigny D, Chimumbwa J, Langi P, Carroll D, Mills A, Hanson K, Webster J, Lynch M, Addington W, Hill J, Rowland M, Worrall E, MacDonald M, Kilian A: **Scaling-up and sustaining insecticide-treated net coverage.** *Lancet Infect Dis* 2003, **3**:465-466.
35. Soremekun S, Maxwell C, Zuwakuu , Chen C, Michael E: **Measuring the efficacy of insecticide treated bed nets: the use of DNA fingerprinting to increase the accuracy of personal protection estimates in Tanzania.** *Trop Med Int Health* 2004, **9**:664-672.
36. Maxwell CA, Chambo W, Mwaimu M, Magogo F, Carneiro IA, Curtis CF: **Variation of malaria transmission and morbidity with altitude in Tanzania and with introduction of alphacypermethrin treated nets.** *Malar J* 2003, **2**:28.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Article 16

Diabaté A., Chandre F., Rowland M., N'Guessan R., Duchon S., **Dabiré K.R.**, Hougard J.M. (2006). The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors. *Trop. Med. Int. Health*, 5 (11): 597-603

The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors

A. Diabate¹, F. Chandre², M. Rowland³, R. N'guessan³, S. Duchon⁴, K. R. Dabire¹ and J.-M. Hougard²

1 *Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso*

2 *Institut de Recherche pour le Développement et Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Benin*

3 *London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK*

4 *Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France*

Summary

OBJECTIVE To evaluate the efficacy of permethrin-treated plastic sheeting (ITPS) applied as a lining to the ceiling or walls of rooms against pyrethroid-susceptible and pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*.

METHOD Overnight tests were carried out in veranda-trap experimental huts in Vallée du Kou, where two molecular forms of *A. gambiae*, S and M, occur. The S form is mostly pyrethroid resistant due to the *kdr* mechanism, and the M form is mostly *kdr* susceptible. A variety of ITPS covered surfaces were tested, ranging from ceiling only to all walls plus ceiling covered.

RESULTS ITPS had a major effect on the mortality of mosquitoes, the proportion killed being dependent upon the surface area covered. Homozygotes for *kdr* resistance showed lower rates of mortality than did heterozygotes or homozygotes for susceptibility. Deterred entry of mosquitoes and inhibition of blood feeding were also correlated with surface area covered. The mode of action and efficacy of ITPS seems to bear closer resemblance to that induced by indoor residual spraying (IRS) than to that induced by insecticide-treated nets.

CONCLUSIONS ITPS might be conceived as being equivalent to long-lasting or permanent IRS but without some of the operational constraints normally associated with spraying. High coverage of ITPS could potentially have a mass population effect on mosquitoes and give rise to long-term community protection against malaria. A phase III trial is justified to assess the acceptability of ITPS and its efficacy against malaria.

keywords experimental huts, *Anopheles gambiae*, insecticide treated plastic sheeting, pyrethroid

Introduction

The two main methods of malaria vector control are indoor residual spraying (IRS) and insecticide-treated nets (ITN). In Africa and South Asia, ITNs and IRS are both very effective (Curtis *et al.* 1999; Rowland 1999). There is mixed evidence concerning the relative cost-effectiveness of these two approaches: in some settings IRS appears to be more cost-effective than ITNs, while in other settings the reverse is true (Curtis *et al.* 1999; Rowland 1999; Curtis & Mnzava 2000). As it is impossible to make a generalized statement favouring one approach over the other, the choice depends not only on the question of epidemiological effectiveness but also on the considerations of feasibility and existence of appropriate delivery systems. Where populations are exposed to unstable or epidemic malaria, for example in Asia, African highlands or southern Africa, IRS has the advantage of being readily targeted to places of highest risk (Najera & Zaim 2001). But IRS requires good

infrastructure and logistics, campaign planning and timing to have any chance of success (Rowland 1999), ruling out most countries of sub-Saharan Africa where rural populations are exposed to stable malaria and systems for large-scale IRS do not exist. In these places ITNs have the advantage of being less demanding to implement than IRS and being able to be targeted on individuals most at risk, such as pregnant women and children. This advantage is further enhanced by the recent development of long-lasting insecticidal nets (LLIN) which resist washing and greatly extend the effective life of the insecticide (N'Guessan *et al.* 2001; Graham *et al.* 2005).

In situations of conflict and disaster, the affected populations may be severely exposed to vector mosquitoes, and physical structures in displacement camps for applying IRS or hanging ITN may not exist (Rowland & Nosten 2001). To address this problem, attempts have been made in the last decade to render temporary shelters insecticidal, either by spraying tents with pyrethroid (Hewitt *et al.*

A. Diabate *et al.* **Plastic sheeting for anopheline control**

1995) or by impregnating polyethylene tarpaulins with insecticide during manufacture (Graham *et al.* 2002). Insecticide-treated plastic sheeting (ITPS), the common name given to the factory-impregnated polyethylene tarpaulins are being manufactured commercially for refugee camps and displaced populations affected by natural disasters (Allan & Guillet 2002).

The recent entomological evidence from ITPS trials (Graham *et al.* 2002, 2004) has raised hopes for a new solution to malaria in displaced populations. This development, coupled with the widely recognized operational constraints associated with IRS campaigns in conventional rural settings, has given rise to the concept of using ITPS indoors, fixed to ceilings or walls, as a long-lasting alternative to IRS, in the same way as LLIN has overcome the constraints associated with having to retreat ITN in places where systems for retreatment are rudimentary or absent. This approach might have the additional benefit of increasing not only the residual efficacy of the insecticide but of reducing the hazard associated with insecticide spraying. ITPS put to such application might achieve effective vector control with limited logistic or technical resources.

An entomological evaluation of ITPS was therefore conducted in Burkina Faso in experimental huts that simulate normal mosquito–host contact in domestic environments. The trial was intended as a proof of principle study, the ITPS not having been tested indoors before, to assess the efficacy of ITPS in an area where pyrethroid-susceptible and resistant populations *Anopheles gambiae* occur sympatrically.

Materials and methods

Study area

The efficacy of ITPS was evaluated in experimental huts at the Vallée du Kou field station, Bobo Dioulasso (4°25' W, 11°24' N). Kou is a rice-growing, irrigated valley comprising seven villages, surrounded by wooded savannah. Few insecticides are used on the rice crop, but insecticides are used extensively for cotton protection. The rainy season extends from May to October and the dry season from November to April. The Kou River is a permanent source of irrigation water and there are two rice crops per year from July–November and January–May. The irrigation system and rice fields provide almost year-round mosquito breeding. High densities of *A. gambiae* (up to 200 bites/person/night) are recorded during the rainy season. Two molecular forms of *A. gambiae*, M and S (Gentile *et al.* 2001), occur in the area. The *kdr*-based mechanism conferring resistance to pyrethroids and DDT predominates in the S form.

Experimental procedures

Insecticide-treated plastic sheeting is an experimental, high-density polyethylene, multi-layer film containing 2% w/w of permethrin, manufactured by Sumitomo Chemical Co. The experimental huts used in this study were similar to those described from Côte d'Ivoire (Darriet *et al.* 1998; Guillet *et al.* 2001; N'Guessan *et al.* 2001). Each hut consists of a single room with entry windows on three sides and a screened verandah on the fourth side. Six treatments were randomly allocated to huts: (i) ceiling ITPS (36.5% of available surface), (ii) two walls ITPS (40.5%), (iii) four walls ITPS (62.8%), (iv) four walls and ceiling ITPS (full coverage), (v) untreated plastic sheeting (full coverage) and (vi) control with no plastic sheeting. The huts were occupied by sleepers from 20:00 to 6:00 hours, six nights a week, from September to November 2004. The sleepers were rotated between huts on consecutive nights. Host-seeking mosquitoes entered the huts via the window slits and could exit into the verandah traps. Mosquito collections were started 1 week after introduction of the plastic sheeting. Each morning all female mosquitoes were collected from each hut and scored as alive or dead and unfed or blood-fed. Surviving mosquitoes were provided with 10% honey solution and held for 24 h before scoring delayed mortality.

Before plastic sheeting was installed, we collected mosquitos for several days to check that there was no difference between huts in attractiveness to mosquitoes. To assess the residual activity of insecticide on the plastic sheeting, we did cone bioassays *in situ* each month for 6 months using laboratory-reared, susceptible *A. gambiae* (Kisumu strain). In accordance with the WHO protocol for assessing IRS treatments (WHO 1996), three batches of 15 unfed females, 3–5 days old were exposed to ITPS surfaces for 30 min in each hut. Knocked down mosquitoes were counted at the end of the exposure period and all mosquitoes held for 24 h before scoring mortality.

Genomic DNA was extracted from field-collected mosquitoes and PCR amplified to determine the presence of the molecular forms M or S using the method of Favia *et al.* (2001). Samples of live and dead mosquitoes were taken from selected huts (the control, two walls ITPS, four walls plus ceiling ITPS) for detection of *kdr* alleles in individual mosquitoes using the method of Martinez-Torres *et al.* (1998).

Ethical considerations

Volunteers from the study village were recruited after obtaining informed consent. A medical doctor was on hand during the trial to respond to any side effects of the ITPS or

A. Diabate *et al.* Plastic sheeting for anopheline control

to treat any cases of fever. Confirmed falciparum parasitaemia was treated with Coartem (artemether 20 mg/lumefantrine 120 mg). The protocol received approval from the ethics committees of Centre Muraz (a national research centre), IRD, LSHTM and WHO.

Data analysis

The effect of each treatment was assessed relative to the control arm in terms of detergency (the number of mosquitoes caught in each hut), excito-repellency (the proportion of mosquitoes in the verandah traps), the proportion blood feeding and the proportion killed; the proportional data were analysed using logistic regression (STATA 6 software). Because of non-normality in the number of mosquitoes collected from each hut, this data was analysed using the Wilcoxon rank sum non-parametric test. Genotype frequencies were tested using chi-squared or Fisher's exact test.

Ethical approval

The present study obtained approval from the ethics committees of Centre Muraz, a national research centre close to the study area, and the London School of Hygiene & Tropical Medicine.

Results

In situ bioassays

Eighty-three cone bioassay tests and 1354 mosquitoes were tested on ITPS in two treatment huts and one control over the 6 months of the trial. There was a consistent 100% knockdown and 100% mortality on ITPS throughout this period. Mosquito mortality in the control huts was 1.4% (576 mosquitoes tested) over this period.

Experimental huts trial

Before the ITPS were installed, we collected 859 *A. gambiae* females over 54 hut-nights (9 days × 6 huts). There were no significant differences between huts in the number of mosquitoes collected ($F = 6.9$, d.f. = 5, $P = 0.23$), and hence no evidence of differential attractiveness. This was important to establish in view of the fact that the treatments could not be rotated between huts.

There were 426 hut-nights (71 days × 6 huts) and a total of 5321 *A. gambiae* females collected during the trial. Genotyping of 166 specimens randomly selected from the six huts showed the *A. gambiae* population was composed of M (49.4%) and S (50.6%) molecular forms. The frequency of *kdr* was 0.45 overall. The *kdr* allele was predominantly found in the S molecular form (frequency of *kdr* allele = 0.95) and was present only at low frequency in the M form (0.04).

The main effects of the intervention are shown in Table 1. The hut with untreated plastic sheeting and the unlined control hut showed very consistent results for each of the biological parameters studied. Lining only 36% (ceiling) or 40% (two walls) of available surface was insufficient to deter mosquitoes from entering the huts but lining 63% (four walls) or 100% (four walls and ceiling) had a significant effect, with both treatments deterring over 40% of *A. gambiae* from entering. The permethrin treated sheeting was markedly repellent: the average rate of insecticide-induced exophily was 60%, and there was no significant difference in exit rates between treatments.

Blood-feeding rates were universally high (>70%). Feeding was partially inhibited by the ITPS treatments. The level of inhibition seemed to be correlated with surface area covered, with four walls or four walls plus ceiling covered giving the best protection (Table 1). Mortality rates ranged from 12% to 46% between ITPS treatments. The proportion killed was correlated with the percentage area covered

Table 1 Numbers of *Anopheles gambiae* s.s. collected from experimental huts over 71 nights at Vallée du Kou, Burkina Faso. Numbers in the same column sharing a letter superscript do not differ significantly ($P > 0.05$)

Treatment	Total number in hut	% Deterred	% Blood-fed	95% CI	% Feeding inhibition	% Dead after 24 h	95% CI	% In exit trap	95% CI
Untreated hut (control)	1041 ^a	–	96.9 ^a	(95.7–97.8)	–	1.7 ^a	(1.1–2.7)	27.8 ^a	(25.1–30.6)
Non-insecticidal plastic sheeting	1097 ^a	–	96.2 ^a	(94.9–97.2)	–	1.5 ^a	(0.9–2.4)	29.7 ^a	(27.1–32.5)
Ceiling ITPS	1174 ^a	–7.1	93.7 ^b	(92.2–95.0)	3.3	11.9 ^b	(10.2–13.9)	73.9 ^b	(71.3–76.4)
Two walls ITPS	787 ^{ba}	28.3	87.7 ^d	(85.2–89.8)	9.5	19.8 ^d	(17.2–22.8)	67.7 ^d	(64.4–70.9)
Four walls ITPS	631 ^b	42.5	78.3 ^c	(74.9–81.3)	19.2	44.5 ^c	(40.7–48.4)	78.3 ^c	(74.9–81.3)
Ceiling plus four walls ITPS (full coverage)	591 ^b	46.1	70.6 ^c	(66.8–74.1)	27.1	46.4 ^c	(42.4–50.4)	77.0 ^{bc}	(73.4–80.2)

ITPS, insecticide-treated plastic sheeting.

A. Diabate *et al.* **Plastic sheeting for anopheline control**

feeding rates were only partially inhibited by ITPS. This indicates that ITPS would confer limited personal protection inside the home but should result in satisfactory transmission control when applied at community level through an effect on mosquito longevity. An effect on mortality was the primary outcome when ITPS was erected as makeshift refugee shelter in 'outdoor platform' trials in Pakistan (Graham *et al.* 2002, 2004). Blood-feeding inhibition was greater in the present study because of the stronger anthropophily of African vectors. The protective effect of ITPS was apparent against susceptible phenotypes but little protection was observed against homozygotes for *kdr* resistance. It is worth noting that in early 2000 South Africa failed to control malaria through deltamethrin residual spraying because of the development of pyrethroid resistance. The S. African programme was obliged to revert from deltamethrin to DDT to achieve control, as *A. funestus* was susceptible to DDT still (Hargreaves *et al.* 2000; Najera & Zaim 2001). An increased level of mixed function oxidase activity rather than *kdr* resistance was associated with the failure of pyrethroids in southern Africa.

Insecticide-treated plastic sheeting may favour the selection of pyrethroid resistance, as a higher proportion of mosquitoes homozygous for resistance survived in the ITPS huts. By contrast in a previous study in experimental huts permethrin treated nets seem unlikely to select for pyrethroid resistance, at least in areas where the *kdr* mutation is rare and present mainly in heterozygous form (Corbel *et al.* 2004). ITN and ITPS act at different stages of the gonotrophic cycle, and the difference in selection rates probably reflects a difference in mosquito behaviour during these two reproductive stages. Blood is a limited resource, and host-seeking mosquitoes on encountering an ITN en route to a host may persist in their attempt to penetrate the toxic barrier particularly if they have a degree of resistance and are less irritated by the toxin. Resistant females would be killed as readily as susceptible females if they stay longer on the toxic surface while persisting in their attempt to probe for a blood meal; consequently they too would pick up a lethal dose of insecticide (Chandre *et al.* 2000). By contrast, once they are fed, females become relatively quiescent and seek a refuge where they can digest their meals without risk of predation. Resistant blood-fed females, on first signs of irritation in a pyrethroid treated 'refuge', stand to gain nothing by persisting on that surface so presumably move away to the verandah more readily than they would when seeking a blood meal at the earlier stage in the gonotrophic cycle. Being resistant they are more likely to survive the encounter with the toxic surface than blood-fed susceptible phenotypes.

The rapid spread of pyrethroid resistance in the major malaria vectors reinforces the need to identify alternative insecticides and to develop and implement effective and sustainable resistance management strategies (Chandre *et al.* 1999; Hargreaves *et al.* 2000; Kolaczinski *et al.* 2000; Diabaté *et al.* 2002, 2004; Etang *et al.* 2003; Asidi *et al.* 2005). The use of ITPS as a long-lasting alternative to IRS has the potential to be widely implemented at community level with relatively limited technical or logistical infrastructure in place. The persistence of the insecticide on the plastic sheeting is a crucial point, and it is reasonable to expect a residual effect for several years. A trial at community level would be necessary to estimate the acceptability and efficacy of ITPS against malaria and the operational factors involved in implementation. A square metre of thin ITPS costs about 10 cents according to the manufacturer (T. Itoh, personal communication), i.e. about \$4 required to cover a 40 m² bedroom. In that situation, lining a wall and ceiling with ITPS could be cheaper than buying a family size LLIN (estimated to \$5) and if it were to last for more than a year or two ITPS might be more cost-effective than IRS which requires vertical organization and repeated six-monthly campaigns. There remains the speculation of how ITPS could be implemented in practice. To have a major impact on malaria a majority of sleeping rooms should be furnished with ITPS, necessitating good popularity or subsidized distribution or erection of ITPS by malaria control programmes. But once erected the team may not have to return for several years, with considerable cost savings over IRS. Looking beyond the pyrethroids, it would be also interesting to assess the efficacy of ITPS treated with a different class of insecticide to which there is no irritability and no resistance, particularly in areas where pyrethroid resistant mosquitoes predominate. A dual intervention with LLIN and ITPS should also be investigated, as it could have a strong protective effect in areas of pyrethroid resistance by reducing both the blood-feeding rate and the population density of mosquitoes.

Acknowledgements

The study was funded by the WHO Pesticide Evaluation Scheme, the Institut de Recherche pour le Développement and the Gates Malaria Partnership of the London School of Hygiene & Tropical Medicine. We are grateful to the heads of IRSS and Centre Muraz for their support during the study. Our thanks also go to A Ouattara, D Traoré, T Kabero and to the sleepers in the huts for their participation in the present work. Finally we wish to thank Professor Martin Akogbéto of the Centre Entomologique de Cotonou for his support and to Luc Djogbénou, Joseph Chabi and Sébastien Koudénoukpo for their help with the

A. Diabate *et al.* **Plastic sheeting for anopheline control**

genotyping. The ITPS was kindly provided by Dr Takaaki Itoh of Sumitomo Chemical Co., Japan.

References

- Allan R & Guillet P (2002) Roll back malaria challenges in complex emergencies. *International Aid & Trade Review* **1**, 27–29.
- Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA *et al.* (2005) Experimental hut evaluation of bed nets treated with an organophosphate (chlorpyrifos methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide resistant *A. gambiae* and *C. quinquefasciatus* mosquitoes. *Malaria Journal* **4**, 25.
- Chandre F, Darriet F, Manga L *et al.* (1999) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull WHO* **77**, 230–234.
- Chandre F, Darriet F, Duchon S *et al.* (2000) Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology* **14**, 81–88.
- Corbel V, Chandre F, Brengues C *et al.* (2004) Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malaria Journal* **3**, 1–9.
- Curtis CF & Mnzava AEP (2000) Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization* **78**, 1389–1400.
- Curtis CF, Mnzava AEP, Misra S & Rowland M (1999) Malaria control: bednets or spraying? Summary of the presentations and the discussion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* **93**, 460.
- Darriet F, Guillet P, N'Guessan R *et al.* (1998) Impact de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.s. à la perméthrine et la deltaméthrine sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées. *Médecine Tropicale* **58**, 349–354.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F *et al.* (2002) The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**, 617–622.
- Diabaté A, Brengues C, Baldet T *et al.* (2004) The spread of the Leu-Phe *Kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomenon. *Tropical Medicine and International Health* **9**, 1–7.
- Etang J, Manga L, Chandre F *et al.* (2003) Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology* **40**, 491–497.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I & Louis C (2001) Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect Molecular Biology* **10**, 19–23.
- Gentile G, Slotman M, Keitmaier V, Powell J & Caccone A (2001) Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* **10**, 25–32.
- Graham K, Mohammad N, Rehman H *et al.* (2002) Insecticide treated plastic tarpaulins for control of malaria vectors in refugee camps. *Medical & Veterinary Entomology* **16**, 404–408.
- Graham K, Rehman H, Ahmad M, Kama M, Khan I & Rowland M (2004) Tents pre-treated with insecticide for malaria control in refugee camps: an entomological evaluation. *Malaria Journal* **3**, 1–7.
- Graham K, Kayedi MH, Maxwell C *et al.* (2005) Multi-country trials comparing wash resistance of PermaNet and conventional insecticide treated nets against anopheline and culicine mosquitoes. *Medical & Veterinary Entomology* **19**, 72–83.
- Guillet P, N'guessan R, Darriet F, Traoré-Lamizana F, Chandre F & Carnevale P (2001) Combined pyrethroid and carbamate «two in one» treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology* **15**, 105–112.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembe J & Coetzee M (2000) *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology* **14**, 181–189.
- Hewitt S, Rowland M, Nasir M, Kamal M & Kemp E (1995) Pyrethroid sprayed tents for malaria control: an entomological evaluation in Pakistan's North West Frontier Province. *Medical & Veterinary Entomology* **9**, 344–352.
- Kolaczinski JH, Fanello C, Herve JP, Conway DJ, Carnevale P & Curtis CF (2000) Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bulletin of Entomological Research* **90**, 125–132.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS *et al.* (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*Kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* **7**, 179–184.
- N'Guessan R, Darriet F, Doannio JMC, Chandre F & Carnevale P (2001) Olyset net® efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire. *Medical and Veterinary Entomology* **15**, 97–104.
- Najera JD & Zaim M (2001) Malaria vector control: insecticides for indoor residual spraying. *WHO/CDS/WOPES/2001* **3**, 1–94.
- Rowland M (1999) Malaria control: bednets or spraying? Malaria control in the Afghan refugee camps of western Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* **93**, 458–459.
- Rowland M & Nosten F (2001) Malaria epidemiology and control in refugee camps and complex emergencies. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **95**, 741–754.
- Tami A, Mubyazi G, Talbert A, Mshinda H, Duchon S & Lengeler C (2004) Evaluation of Olyset insecticide-treated nets distributed seven years previously in Tanzania. *Malaria Journal* **3**, 19.
- WHO (1996) *Report of the WHO Informal Consultation on the Evaluation and Testing of Insecticides*. WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). WHO/CTD/WHOPES/IC/96.1.
- WHO (2001) *Report of the Fifth WHOPES Working Group Meeting*. WHO/HQ, Geneva 30–31 October 2001, Review of Olyset net, bifenthrin 10%WP WHO/CDS/WHOPES/2001.4.

A. Diabate *et al.* **Plastic sheeting for anopheline control**

Corresponding Author A. Diabate, Laboratoire de Parasitologie-Entomologie, IRSS/Centre Muraz, BP 390 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Tel.: +226 20970102; Fax: +226 20970457; E-mail: a_diabate@hotmail.com

Utilisation de recouvrements d'intérieur en plastique pré-imprégnés d'insecticide pour le control des vecteurs de la malaria

OBJECTIF Evaluer l'efficacité de recouvrements en plastique traité à la perméthrine et appliqués comme doublures aux plafonds et aux murs des chambres pour lutter contre *Anopheles gambiae* sensible ou résistant à la pyréthroïde.

MÉTHODE Des tests ont été effectués durant la nuit en utilisant des pièges de véranda sous forme de huttes expérimentales, dans la Vallée du Kou, où sont présentes deux formes moléculaires de *An. Gambiae*, les formes S et M. La forme S est surtout résistante à la pyréthroïde par le mécanisme *kdr* et la forme M plutôt *kdr* susceptible. Une variété de surfaces recouvertes de plastique traité à la perméthrine a été testée et ce, allant du traitement du plafond seul au traitement du plafond plus tous les murs.

RÉSULTATS Les recouvrements en plastique traité à la perméthrine avaient un effet majeur sur la mortalité des moustiques; la proportion tuée dépendant de la surface recouverte. Les homozygotes pour la résistance *kdr* avaient un taux de mortalité plus faible que les hétérozygotes ou les homozygotes pour la sensibilité. La dissuasion de l'entrée des moustiques dans les pièces et l'inhibition de la succion de sang étaient en corrélation avec la surface de la zone recouverte. Le mode d'action et l'efficacité des recouvrements en plastique traité à la perméthrine semble avoir une similitude plus proche de celle induite par la pulvérisation résiduelle des intérieurs que de celle induite par les moustiquaires imprégnés d'insecticide.

CONCLUSION Les recouvrements en plastique traité à la perméthrine pourraient être conçus comme étant équivalents à une pulvérisation résiduelle de longue durée ou permanente des intérieurs, mais sans les contraintes opérationnelles normalement liées à la pulvérisation. L'application étendue des recouvrements en plastique traité à la perméthrine pourrait avoir un effet de masse potentiel sur la population de moustiques et donner lieu à une protection de longue durée aux communautés contre la malaria. Un essai de phase III se justifie alors, afin d'évaluer l'acceptabilité des recouvrements en plastique traité à la perméthrine et leur efficacité contre la malaria.

mots clés huttes expérimentales, *Anopheles gambiae*, recouvrements en plastique traité aux insecticides, pyréthroïde

Uso intradomiciliario de laminado plástico pre-impregnado con insecticida para el control de vectores de malaria

OBJETIVO Evaluar la eficacia del laminado plástico tratado con permetrina (LPTP) aplicado como cobertor del cielorraso o las paredes de habitaciones, contra *Anopheles gambiae* tanto sensible como resistente a piretroïdes.

MÉTODO Se llevaron a cabo pruebas durante la noche con trampas en barracas experimentales en el Vallée du Kou, en el cual co-existen dos formas moleculares, S y M, de *An. gambiae*. La forma S es en su mayoría resistente a piretroïdes, debido al mecanismo *kdr*, y la forma M es en su mayoría *kdr* sensible. Se probó el cubrir una variedad de superficies con LPTP, desde solo el cielorraso hasta paredes y cielorraso conjuntamente.

RESULTADOS El LPTP tuvo un efecto importante sobre la mortalidad de los mosquitos, siendo la proporción de muertes dependiente de la superficie cubierta. Los homocigotos para resistencia por *kdr* mostraron una menor tasa de mortalidad que los heterocigotos o los homocigotos sensibles. También se encontró una correlación con el área cubierta y la disminución en la entrada de los mosquitos o la inhibición de la alimentación por sangre. El modo de acción y la eficacia del LPTP se parece más al inducido por el rociamiento residual intradomiciliario que al de las mosquiteras impregnadas.

CONCLUSIONES Se puede concebir el LPTP como equivalente al rociamiento intra-domiciliario de larga duración o permanente, pero sin algunas de las restricciones operacionales asociadas al mismo. Una alta cobertura de LPTP podría, potencialmente, tener un efecto de masa sobre los mosquitos y proteger, a largo plazo, a la comunidad frente a la malaria. Está justificado el realizar ensayos de fase III, para evaluar la aceptabilidad del LPTP y su eficacia frente a la malaria.

palabras clave barracas experimentales, *Anopheles gambiae*, laminado plástico tratado con insecticida, piretroïde

Article 17

Pennetier C., Costantini C., Corbel V., Licciardi S., **Dabiré KR**, Lapied B., Chandre F., Hougard J-M (2008). A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae*. *Emerging Infectious Diseases* (soumis)



**A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors:
low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on
mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus
resistant *Anopheles gambiae***

Journal:	<i>Emerging Infectious Diseases</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Pennetier, Cédric; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Costantini, Carlo; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Corbel, Vincent; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Licciardi, Séverine; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Roch, DABIRE; Centre MURAZ, Entomology Lapiéd, Bruno; Université d'Angers, RCIM, UPRES EA 2647 / USC INRA Chandre, Fabrice; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Hougard, Jean-Marc; Institut de Recherche pour le Développement, UR016</p>
Keywords:	malaria, <i>Anopheles gambiae</i> , bed nets, pyrethroid, resistance, repellents, insecticides, mixtures





January 10th, 2008

Editor-in-Chief Emerging Infectious Diseases journal
National Center for Infectious Diseases
Centers for Disease Control and Prevention
Mailstop D-61
1600 Clifton Road
Atlanta, GA 30333
USA

Dear Editor,

You recently published a research article that alarmed the malaria control community about pyrethroid resistance in *An. gambiae* that appears to threaten the future of Long Lasting Insecticidal Nets (LLIN) and indoor residual spraying in Benin, West Africa (N'Guessan *et al.*, 2007). As mentioned in the conclusion of the article, "Use of LLIN should be encouraged but scale-up of treated nets may ultimately select for further resistance" and "the need to develop alternative insecticides to replace or supplement pyrethroids on nets is urgent ...".

Our research group in Benin is currently working on an alternative concept that consists of treating nets with a mixture of a non-pyrethroid insecticide and a repellent compound. Preliminary results under laboratory conditions were quite encouraging (Pennetier *et al.*, 2005 & 2007). We have the pleasure to submit to *Emerging Infectious Diseases journal* a manuscript entitled: "A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae*" authored by Cédric Pennetier, Carlo Costantini, Vincent Corbel, Séverine Licciardi, Roch K. Dabiré, Bruno Lapied, Fabrice Chandre and Jean-Marc Hougard. All authors have seen and approved this version of the manuscript and it is not currently submitted for publication elsewhere.

You will find three attached files, one containing the text, one containing the four tables and another containing a figure.

Sincerely yours

Cédric Pennetier

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.

1
2
3 **A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose**
4 **mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal**
5 **than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae***
6
7
8
9

10
11
12 Cédric Pennetier^{1*}, Carlo Costantini², Vincent Corbel³, Séverine Licciardi¹, Roch K. Dabiré⁴,
13
14 Bruno Lapied⁵, Fabrice Chandre¹ and Jean-Marc Hougard¹
15
16
17

18
19
20 ¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Centre de Recherche
21
22 Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin
23

24
25 ² Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Institut de Recherche en Sciences
26
27 de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso
28

29
30 ³ Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le
31
32 Développement (IRD), Montpellier, France
33

34
35 ⁴ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) / Centre Muraz, Bobo-Dioulasso,
36
37 Burkina-Faso
38

39
40 ⁵ Laboratoire RCIM, UPRES EA 2647 / USC INRA, Université d'Angers, Angers, France
41

42
43 * corresponding author
44
45

46 **Abstract**
47

48 The spread of resistance to pyrethroids in the major Afrotropical malaria vectors *Anopheles*
49
50 *gambiae* s.s. urge the development of new strategies to control resistant mosquito populations.
51
52 Impregnating mosquito nets with an insect repellent mixed with an organophosphorous
53
54 insecticide at low-dosage could restore mortality of multilocus resistant *Anopheles gambiae*
55
56 s.s. In experimental huts, we tested the efficacy of repellent-insecticide-treated nets (RITNs)
57
58 against susceptible and insecticide resistant *Anopheles gambiae* populations in a rice-growing
59
60

1
2
3 area near Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. During the first two weeks post-treatment, RITNs
4
5 nets were as effective as deltamethrin against susceptible mosquitoes, and more effective in
6
7 killing *Anopheles gambiae* carrying *kdr* or *Ace.1^R* resistance genes. The mixtures did not
8
9 select for either the *Kdr* or the *Ace.1^R* alleles. Our field trial indicates that mixing repellents
10
11 and organophosphates on bed-nets could be used to control insecticide-resistant malaria
12
13 vectors, provided improved residual activity of RITNs is achieved and safety is verified.
14
15

16
17 **Keywords:** malaria, *Anopheles gambiae*, bed nets, pyrethroid, resistance, repellents,
18
19 insecticides, mixtures.
20
21

22
23 **One sentence summary:** Impregnating mosquito nets with an insect repellent mixed with an
24
25 organophosphorous insecticide at low-dosage were as effective as standard impregnated net
26
27 with deltamethrin against susceptible malaria vector mosquitoes, and more effective in killing
28
29 *Anopheles gambiae* carrying insecticide resistance genes, without selecting for either the *Kdr*
30
31 or the *Ace.1^R* alleles.
32
33
34
35
36
37
38

39 Introduction

40
41
42 Pyrethroids are to date the only class of insecticides that are recommended by the World
43
44 Health Organization (WHO) and the Centers for Disease Control (CDC) for net impregnation
45
46 to control malaria transmission (1, 2). Unfortunately, resistance to pyrethroids in malaria
47
48 vectors is becoming widespread across Africa with both metabolic resistance and target site
49
50 modification induced by the knockdown resistance (*kdr*) gene mutations (3). It is somehow
51
52 still uncertain whether spread of resistance genes will pose a serious threat to vector control
53
54 programs based uniquely on pyrethroids. Some studies have shown that *kdr* resistance did not
55
56 decrease the level of protection conferred by ITNs (4) and did not induce *Kdr* selection (5).
57
58
59 Conversely, more recent studies have reported a fitness advantage for *Kdr* resistant
60

1
2
3 phenotypes (6), and a decrease in the efficacy of ITNs in an area of pyrethroid resistance from
4
5 Benin (7). It is becoming increasingly clear that alternative insecticidal molecules are needed.
6
7 However fewer and fewer novel active ingredients become available, and the timeframe
8
9 needed to satisfy the regulatory requirements of public health formulations is exceedingly
10
11 long (8). The optimal use of existing compounds remains at present the only option for
12
13 managing insecticide resistance in malaria vectors control. Two tactics have already been
14
15 explored: i) the alternation of different classes of insecticides by rotation of active ingredients
16
17 and mosaic treatments (9, 10), and ii) the use of insecticide mixtures (10, 11).
18
19
20
21
22

23
24 The possibility to achieve both vector mortality and excito-repellency by optimal use of
25
26 existing ingredients led us to test a new concept corresponding to the mixture of insect
27
28 repellents with non-pyrethroid insecticides (12). The rationale behind this concept is to mimic
29
30 with non-pyrethroid compounds the original features of pyrethroids i.e. both the lethality and
31
32 irritancy. Laboratory results showed that a combination of propoxur and DEET induced
33
34 irritancy, knockdown, and mortality as high as deltamethrin against a susceptible strain of
35
36 *Aedes aegypti*, and significantly higher mortality against a pyrethroid-resistant strain of this
37
38 mosquito. Such findings were mostly explained by a strong synergistic interaction (in terms of
39
40 mortality and KD effect) between DEET and propoxur (12). Similar synergism was also
41
42 observed in a test tunnel apparatus by mixing DEET or another insect repellent, i.e.
43
44 KBR 3023, with an organophosphate, i.e. Pirimiphos Methyl (PM), on mosquito nets baited
45
46 with guinea pigs (13). These studies constitute a first step towards the development of an
47
48 alternative strategy based on insect repellents for malaria vectors control in areas of
49
50 pyrethroid resistance.
51
52
53
54
55

56
57 In this study we present results of the first evaluation of this new strategy under field
58
59 conditions. The objective of the trial was to compare the efficacy of mosquito nets
60

1
2
3 impregnated with mixtures of DEET + PM or KBR 3023 + PM (hereafter repellent +
4
5 insecticide treated-nets, or RITNs) with respect to bed-nets treated with a standard
6
7 formulation of a pyrethroid, i.e. deltamethrin. The field trial was carried out in an area where
8
9 *Anopheles gambiae s.s.* populations are both susceptible or resistant to pyrethroids,
10
11 organophosphates and carbamates depending on the season, due to temporal fluctuations in
12
13 the relative frequency of the two molecular forms of *An. gambiae*, M and S, which in this area
14
15 carry insecticide resistant alleles at contrasting frequencies (14, 15). In particular, the S-form
16
17 carries the knockdown resistant (*Kdr*) and the insensitive acetylcholine esterase (*AcEI^R*)
18
19 alleles at high frequency, whereas these alleles float at much lower frequency in the M-form.
20
21 In this paper we present the response of the vector populations to the lethal effect of the
22
23 formulations tested. A detailed account of the behavioural effects of the repellent + insecticide
24
25 mixtures is presented in a companion paper. Moreover, we investigated under laboratory
26
27 conditions, whether RITNs could select for the insecticide resistance genes.
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Methods**

37 *Study area*

38
39 The field trial was carried out in the village of VK7, in the valley of the Kou river near Bobo-
40
41 Dioulasso, south-western Burkina Faso. The area is exploited by farmers for large-scale
42
43 cultivation of rice. Rice paddies provide extensive sites for mosquito breeding throughout
44
45 most of the year, particularly for the molecular form M of *Anopheles gambiae s.s.*
46
47
48 Conversely, the molecular form S of this malaria vector appears mainly during the wet
49
50 season, as it breeds mostly in puddles created by rains, and other rain-dependent larval
51
52 habitats.
53
54
55
56
57
58
59
60

Repellent and insecticide formulations

1
2
3 An organophosphate insecticide and two repellent formulations were evaluated as mixtures
4 impregnated on mosquito nets: *Pirigrain 250*, is an emulsifiable concentrate (EC) formulation
5 containing 25% Pirimiphos Methyl (PM) produced by CGI (*Compagnie Générale des*
6 *Insecticides*, Cergy Pontoise, France). KBR 3023 (hydroxyethyl isobutyl piperidine
7 carboxylate, also known as icaridin) was formulated as a liquid concentrate containing 25%
8 of active ingredient. DEET (diethyl-3-methylbenzamide) was also formulated as a liquid
9 concentrate containing 30% of active ingredient. The two repellent formulations are designed
10 and distributed for application on clothing by the company *Osler* (Melun, France).

11 Deltamethrin was our pyrethroid of choice because it is one of the two gold standard
12 pyrethroid used for net impregnation with permethrin; it has a good toxicology profile and has
13 undergone the WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). A standard suspension
14 concentrate at 20% (KO-Thrin[®], Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, Germany), which
15 is routinely used to impregnated bed-nets was used in the trial. No toxic or repellent
16 chemicals other than those mentioned above were declared in the formulations tested.

17 *Mosquito nets and treatments*

18 We used polyester nets of 100 denier netting and 156 mesh size. To simulate the conditions of
19 bed-net wear and tear that can be encountered in the field, six holes, each measuring 4 x 4 cm,
20 were cut on the sides and ends of each net. The nets were impregnated with the repellent
21 DEET or KBR 3023 at a dose of 10 g/m² and the insecticide PM at a dose of 150 mg/m² and a
22 control treatment with a standard pyrethroid deltamethrin at a dose of 25 mg/m² by dipping.

23 *Experimental huts and mosquito collections*

24 The treated nets were set inside 4 experimental huts, following the same design and
25 procedures described in Darriet *et al.* (16) and N'Guessan *et al.* (17). Briefly, the huts are
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 3.5 x 2 x 2 m and built with local materials so that mosquitoes can fly only through four entry
4
5 baffles that hinder them to escape from the hut once inside. In this way the majority of
6
7 mosquitoes entering the hut can be accounted for. A veranda-trap made of polyethylene
8
9 sheeting and mesh screening measuring 2 m long, 1.5 m wide, and 1.5 m high, projects from
10
11 the back wall of each hut. Movement of mosquitoes to and fro the huts and the verandas was
12
13 unimpeded during the night. Each experimental hut rests on a concrete base surrounded by a
14
15 water-filled moat to prevent entry of ants that would otherwise eat mosquitoes knocked down
16
17 on the floor of the hut.
18
19
20

21
22 Local adult male volunteers recruited for the study slept on mats under the nets from 20:00 to
23
24 05:00; at 18:00, before the start of the tests, they removed spiders and other mosquito
25
26 predators. At 05:00, the volunteers closed the entry baffles, lowered the curtain separating the
27
28 sleeping room from the veranda-trap, and collected all mosquitoes from the room, bed-net,
29
30 and veranda, whether dead or alive. Female mosquitoes were scored by location as dead or
31
32 alive, fed or unfed, and identified to morpho-species. To minimise bias in individual
33
34 attractiveness and spatial variation in mosquito densities, the sleepers and bed-nets were
35
36 rotated between huts. Two replicates of the trial, each running for 27 nights over 4 weeks,
37
38 were carried out: the first at the end of the dry season (May 5th to June 3rd), when mainly the
39
40 molecular form M of *An. gambiae* is present in the village; the second at the end of the rainy
41
42 season (September 18th to October 14th), when the form S constitute the majority of the *An.*
43
44 *gambiae* population.
45
46
47
48
49
50
51
52

53 *Ethical issues*

54
55 Informed consent was obtained from the human volunteers prior to enrolling them in the
56
57 study. Malaria chemoprophylaxis and medical surveillance was provided them during and 3
58
59
60

1
2
3 weeks after the trial. The IRD and Burkina Faso national ethical committees issued formal
4
5 ethical approval of the protocol.
6
7
8
9

10 *Molecular analyses*

11
12 To determine the presence and relative frequency of the molecular forms M and S of *An.*
13
14 *gambiae* s.s., genomic DNA of field-collected mosquitoes was extracted and amplified by
15
16 PCR according to the method of Favia *et al.* (18). Samples of mosquitoes that were alive or
17
18 dead at the time of collection were taken from the control hut for molecular detection in
19
20 individual mosquitoes of the *Kdr* and *Ace1^R* alleles using the methods of Martinez-Torrez *et*
21
22 *al.* (19) and Weill *et al.* (20), respectively.
23
24
25
26
27
28

29 *Statistical analysis*

30
31 The entomological impact of each treatment on mosquitoes was expressed relative to the
32
33 control in terms of the overall mortality rate; this is the proportion of mosquitoes that were
34
35 found dead at the time of collection, and those that died after having hold them during 24 h
36
37 post-exposure. We considered that the mortality rate is the response expected to have the most
38
39 significant epidemiological impact. For statistical purposes, we fitted a logistic regression
40
41 model assuming a binomial error distribution with regression parameters calculated by
42
43 maximum likelihood with the software GLIM v.4 (21); we used the number of dead
44
45 mosquitoes y as response variable, and the total number n of mosquitoes collected in the hut
46
47 as binomial denominator. The proportion of dead mosquitoes $p = y/n$ was related to the time
48
49 (in days) post-treatment, the insecticidal treatment, and season (i.e. replicate). The statistical
50
51 significance of main effects and interaction terms in the model was tested with F-tests by
52
53 analysis of deviance (ANODEV), by looking at the change in deviance caused by the removal
54
55 of each term from the maximal model after having allowed for overdispersion in the data by
56
57
58
59
60

1
2
3 calculating a variance heterogeneity coefficient with the Williams' algorithm (22, 23).
4
5 Confidence limits for median (ET₅₀) were calculated using Fieller's theorem (22, 23).
6
7
8
9

10 11 **Results**

12 13 14 15 *Vector population composition and insecticide resistance status*

16
17
18 Molecular analysis revealed, as expected, a marked change between seasons in molecular
19 form composition and insecticide resistance status (Table 1). During the dry season replicate
20 of the trial, the molecular form S accounted for 5% of the *Anopheles gambiae* s.s. population,
21 whereas at the end of the dry season it represented 85% of the sample. Accordingly, the *Kdr*
22 allele, which confers resistance to pyrethroids, was found at a frequency of 8% in the *An.*
23 *gambiae* s.s. sample during the dry season replicate and at 88% at the end of the rainy season.
24 Similarly, the frequency of the *Ace1^R* allele, which confers resistance to organophosphates
25 and carbamates, increased from 1% at the end of the dry season to 40% during the rainy
26 season. The change in frequency of the insecticide resistance genes reflects the fact that these
27 genes float at high frequency only in the molecular form S of *An. gambiae*.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 44 *Efficacy of repellents + OP mixtures against deltamethrin*

45
46
47 The analysis of deviance showed that the three-way interaction term between
48 TIME*TREATMENT*SEASON was statistically significant ($F_{n,m}=4.705$; $P=0.01$), indicating
49 that the decrease with time in the lethal effect was significantly different for treatments and
50 between seasons. Hence, the minimal adequate model was those with a different curve
51 relating the decrease of mortality with days post-treatment for each combination of treatments
52 and seasons (Figure 1). Accordingly, the estimates of the regression parameters for the six
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 logistic curves are shown in Table 3, together with the inferred effective times in days post-
4
5 treatment.
6
7

8
9 During the dry season replicate, lethality of the PM+KBR 3023 mixture lasted longer than
10
11 KO-thrin over the first 15 days post-treatment ($ET_{90}^{PM+KBR} = 11.2$ days vs. $ET_{90}^{KO-thrin} = 4.7$
12
13 days – Figure 1d and Table 2). The PM+DEET mixture was as efficient as KO thrin over only
14
15 about 4 days (figure 1 d). The efficacy of the nets impregnated with the two mixtures
16
17 decreased faster ($b^{PM+KBR} = -0.339 \pm 0.059$; $b^{PM+DEET} = -0.192 \pm 0.036$) than KO-Thrin
18
19 ($b^{KOthrin} = -0.099 \pm 0.048$) (Figure 1d). This explains the shorter median effective time of the
20
21 two mixtures.
22
23
24
25
26

27 The trend was different for the rainy season replicate, because the lethality of nets
28
29 impregnated with KO-thrin was consistently lower than that of the dry season replicate
30
31 (Figure 1c), in view of the change in molecular form composition and insecticide resistance
32
33 status of the vector population (Table 1). Efficacies of the PM+DEET and PM+KBR 3023
34
35 were significantly higher than the deltamethrin formulation against the *An. gambiae*
36
37 population carrying high frequencies of the *Kdr* and *Ace1^R* genes. Indeed, KO-thrin never
38
39 induced more than 55% mortality throughout the course of the replicate, whereas the
40
41 PM+DEET and PM+KBR 3023 mixtures killed $\geq 90\%$ of the exposed mosquitoes up until
42
43 about 4 and 7 days post-treatment, respectively (Table 3 and Figure 1e).
44
45
46
47
48
49

50 There was no difference between the model estimates of the PM+DEET mixture between the
51
52 two replicates (Student t-test: $t_a=0.248$; $P=0.8$; $t_b=0.101$; $P=0.92$) (Figure 1a), indicating that
53
54 the response in mortality through time was the same across seasons. Conversely, the
55
56 PM+KBR 3023 efficacy changed significantly across replicates ($t_a= 3.34$; $P<0.01$; $t_b=2.01$;
57
58 $P<0.05$): lethality was lower during the rainy season shortly after impregnation of the nets,
59
60 but the decrease with time in efficacy was subsequently slower (Figure 1d). Similarly, a

1
2
3 significant difference in efficacy between the two seasons was observed for KO-thrin ($t_a=$
4 2.55; $P<0.05$; $t_b=4.06$; $P<0.005$), with induced mortality being much lower during the rainy
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

significant difference in efficacy between the two seasons was observed for KO-thrin ($t_a=$ 2.55; $P<0.05$; $t_b=4.06$; $P<0.005$), with induced mortality being much lower during the rainy season than the dry season; lethality of the nets, however, was always higher during the dry season replicate up until the end of the 27-days replicates, despite a slower decrease with time in efficacy for the rainy season replicate (Figure 1c).

Impact of treatments on insecticide resistance genotypes

A total of 192 *An. gambiae* females were genotyped for molecular form status, *Kdr* and *AceI^R* genes. Because of severe restrictions in gene flow between the M and S molecular forms (24, 25) which lead to marked differences in their resistance status (15), we chose to investigate the selection pressure of our three treatments only against the S molecular form of *An. gambiae* (88% of the total population collected in rainy season, Table 1). The results of *Kdr* genotyping of 151 specimens are shown in Table 3. The gene was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p=1$). There was no evidence for a significantly higher frequency of *Kdr^R* allele in those that survived the three treatments. No *Kdr^s/Kdr^s* or *Kdr^R/Kdr^s* mosquito survived with the KO-thrin treatments in contrast with PM+DEET and PM+KBR treatments, but samples of susceptible genotype was too low. The results of the *AceI^R* genotyping of 151 S form *An. gambiae* are shown in table 4. We observed an heterozygote excess for *AceI^R* gene (p value). There is no evidence for a significantly higher frequency of *AceI^R* allele in those that survived the three treatments.

Discussion

Our results from an area of insecticide resistance near Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, demonstrated that a mixture of an organophosphate (pirimiphos-methyl) and an insect

1
2
3 repellent (either DEET or KBR 3023) on mosquito nets was as lethal as the pyrethroid
4
5 deltamethrin for a few days against a susceptible *An. gambiae* s.s. population. However, the
6
7 efficacy of the two mixtures was substantially higher than deltamethrin against a multilocus
8
9 resistant *An. gambiae* population (mainly composed of the molecular form S) carrying two
10
11 resistance genes for pyrethroids and organophosphates/carbamates (*Kdr* and *Ace1^R*,
12
13 respectively), at moderate to high frequency. The efficacy of the mixtures was due to strong
14
15 synergism between the two active ingredients, as demonstrated in another study (Pennetier et
16
17 al., submitted). Some OPs like chlorpyrifos methyl (11, 26), or pirimiphos methyl (27), and
18
19 the carbamate carbosulfan (27, 28), were also recently tested on nets to verify their efficacy in
20
21 terms of induced mortality against pyrethroid-resistant populations of *An. gambiae*, and were
22
23 found as lethal as deltamethrin, lambda cyalothrin, or permethrin. The major constraint to the
24
25 use of OPs or carbamates on bed-nets is their higher toxicity to humans (9, 29), and the
26
27 possibility to induce a selection pressure for resistance mechanisms other than *Kdr*, such as
28
29 the insensitive acetyl cholinesterase (*AcE1^R*) (30). In view of these results, the concept of
30
31 mixing an insect repellent with an organophosphate (OP) offers a potential alternative to the
32
33 use of pyrethroids on mosquito nets;
34
35
36
37
38
39
40
41

42 There are, however, several advantages in using mixtures of insect repellents and OPs. First,
43
44 the addition of a repellent allows the use of lower dosages of OPs. The recommended dose of
45
46 pirimiphos methyl to achieve a mortality close to 100% is 1000 mg/m² (27, 31). This is six
47
48 fold the dosage that we used in our mixtures. The possibility to use insecticides with different
49
50 modes of action at lower dosages than either ingredients used alone was also observed in
51
52 previous studies with OP/pyrethroid mixtures (10, 11). Second, the behavioural effects of
53
54 pyrethroids on mosquito nets, such as irritancy, that confer personal protection to the sleeper
55
56 under the net are restored by the presence of the repellent in RITNs. Previous laboratory
57
58 studies on repellent + OP mixtures already focused on this property. These studies showed
59
60

1
2
3 that the mixtures have the same irritant effect than pyrethroids (12), and induce protection
4
5 against blood feeding (13). Our field trial confirmed the excito-repellency of the repellent +
6
7 OP mixtures (data presented in a companion paper). Third, we could not detect significant
8
9 differences in the frequency of two important insecticide resistance genes, *Kdr* and *AcE1^R*
10
11 among mosquitoes that survived or died after exposure to RITNs, indicating that PM+DEET
12
13 and PM+KBR 3023 would not select for any of these two resistance alleles. Thus, RITNs
14
15 appear as a promising tool to control malaria vectors in areas of insecticide resistance.
16
17
18

19
20
21 Our results show that mortality in response to treated nets changed between seasons
22
23 depending on the combination of repellent and insecticide used. The response to the
24
25 PM+DEET mixture did not change with the resistance status of the *An. gambiae* population,
26
27 whereas the PM+KBR 3023 efficacy decreased significantly at the end of the rainy season,
28
29 but lasted comparatively longer than during the dry season replicate of the trial. This
30
31 difference may result from a difference in mode of action of the two insect repellents used in
32
33 our trial, and their interaction with the insecticide pirimiphos-methyl. Indeed, PM is an AChE
34
35 inhibitor and it has been recently shown that DEET exerts a neurotoxic effect through
36
37 alteration of both neuronal function and synaptic transmission (32). DEET increases the
38
39 release of ACh in synaptic cleft, which led to hypothesize that synergism between the OP and
40
41 DEET due to the implication of pre-synaptic muscarinic receptors involved in the negative
42
43 feedback regulation process (33), which thereby modulated Ach release. The exact mode of
44
45 action of KBR 3023 is not known yet, hence it is probably premature to propose an
46
47 explication of why its efficacy changed in response to changes in the resistance status of the
48
49 vector population.
50
51
52
53
54
55
56

57
58 At present, it is as yet not possible to envisage the use of RITNs in community-based vector
59
60 control programmes because of the short persistence of the lethal effect induced by the OP +

1
2
3 repellent mixture (1-2 weeks depending on season and combination). This is presumably due
4
5 to the high vapour pressure of the repellents, which act mainly in the vapour phase, and hence
6
7 do not persist long enough on the net at higher than threshold concentrations. However, long-
8
9 lasting formulations, such as resins, micro capsules, cyclodextrins, etc. might increase the
10
11 persistence of the mixture on the net. We suggest that industry should have a vital role to play
12
13 in the development of such more adapted formulations. We are currently testing a
14
15 microencapsulated formulation of DEET + PM with encouraging preliminary results (data not
16
17 shown).
18
19
20
21

22
23 Another factor preventing the immediate application of the RITN concept in the field is the
24
25 lack of knowledge of the toxicological properties of repellent + OP mixtures. Despite the fact
26
27 that the two repellents and pirimiphos-methyl are reported as safe products (34-38), little is
28
29 known about the interaction of repellents with OPs. It is worth noting, however, that the
30
31 reported neurological pathologies occurred after rats received DEET and PBO by dermal
32
33 application (39, 40). We used an AChE inhibitor (an OP, pirimiphos-methyl) with DEET, but
34
35 in our case none of these compounds were applied on the skin, and the DEET concentration
36
37 we used on nets was lower by >5 fold than that applied on the soldiers' skin during the Gulf
38
39 War episode. Nevertheless, it is crucially important to confirm by appropriate toxicological
40
41 studies that there are no adverse health effects in using organophosphate- + repellent at the
42
43 operational doses that are used to impregnated bed-nets.
44
45
46
47
48
49

50
51 In summary, we conclude that the application of low doses of an OP + insect repellents as
52
53 mixtures on mosquito nets was as much or more lethal shortly after application than the
54
55 pyrethroid deltamethrin against the malaria vector *An. gambiae* in an area of multiple
56
57 insecticide resistance. The recent concept of combining repellents with insecticides is still
58
59 limited by the short residual effect of the treatments and the lack of toxicological knowledge,
60

1
2
3 but it appears as a potential tool warranting further development for the control of malaria
4
5
6 vectors and management of insecticide resistance in areas of endemic transmission.
7
8
9

10 11 **Acknowledgments**

12
13 We sincerely thank the team of VK7 for their excellence during field work, and the people of
14
15 VK7 for their hospitality. Many thanks to Seth Irish who provided helpful comments.
16
17

18
19 This study was financially supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR, program
20
21 REACT n° 2006 SEST 030 01) and Osler Company (Melun, France). CP was supported by
22
23 Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de Cotonou (Volontaire International
24
25 fellowship) and François Lacoste and the Fondation de France (Student fellowship).
26
27

28
29 Mr Cédric Pennetier of Institut de Recherche pour le Développement is a PhD student. His
30
31 current research interests are identifying alternative chemicals or new strategies to maintain
32
33 the effectiveness of impregnated materials used in vector control programs.
34
35

36 37 **Conflict of interest statement**

38
39
40 The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.
41
42
43
44
45

46 47 **Legends**

48
49 **Table 1:** Frequency of S molecular form of *An. gambiae*, of Knock Down Resistance (*Kdr*)
50
51 allele and insensitive acetylcholinesterase (*Ace.1^R*) allele. Samples have been randomly taken
52
53 in the control hut.
54
55
56
57
58
59
60

	S form frequency (n tested)	<i>Kdr</i> frequency (n tested)	<i>Ace1^R</i> frequency (n tested)
May-June (dry season)	0,05 (43)	0,08 (41)	0,01 (40)
September- October (rainy season)	0,85 (49)	0,88 (48)	0,40 (49)

Table 2: Regression parameters (SE) and median and 90% effective time (95% confidence interval) expressed in days of the minimal adequate regression model fitted to the experimental hut data. A) First trial run in dry season (May and June); B) second trial run in rainy season (September and October).

A. Dry season				
treatment	<i>a</i>	<i>b</i>	ET ₅₀	ET ₉₀
PM+DEET	2,814 (±0,737)	-0,194 (±0,039)	14,5 (11.1-16.4)	3,2
PM+KBR	5,932 (±0,628)	-0,337 (±0,032)	17,6 (16.8-18.2)	11,1
KO-Thrin	2,693 (±0,656)	-0,100 (±0,033)	26,8 (22.7-42.2)	4,9
B. Rainy season				
treatment	<i>a</i>	<i>b</i>	ET ₅₀	ET ₉₀
PM+DEET	2,907 (±0,520)	-0,184 (±0,030)	15,8 (13.8-17.7)	3,9
PM+KBR	1,424 (±0,657)	-0,090 (±0,036)	15,9 (5.4-22.7)	-8,6
KO-Thrin	0,136 (±0,320)	-0,030 (±0,019)	4,5 (0-13.9)	-68,1

Table 3: Mortality rate among *Kdr* genotypes.

<i>Kdr</i>	Number tested		Mortality % (n)		P (F exact test)*
	SS or RS	RR	SS or RS	RR	
PM+DEET	4	45	25% (1)	57,8% (26)	0,323
PM+KBR	7	44	40% (2)	59,1% (26)	0,239
KOThrin	2	49	100% (2)	53,1% (17)	0,064

*Numbers of the *Kds/Kds* and *Kdr/Kds* were too small to allow χ^2 tests on the numbers of each genotype; therefore significance tests were carried out on numbers of *Kdr* and *Kds* alleles among live and dead mosquitoes.

Table 4: Mortality rate among *Ace.1^R* genotypes.

<i>Ace1^R</i>	Number tested		Mortality % (n)		P (F exact test)*
	SS	RR or RS	SS	RR or RS	
PM+DEET	4	39	50% (2)	59% (23)	0,662
PM+KBR	3	28	33,3% (1)	50% (14)	1,000
KOThrin	4	29	75% (3)	31% (9)	0,442

*Numbers of the *Ace.1^H/Ace.1^H* and *Ace.1^H/Ace.1^S* were too small to allow χ^2 tests on the numbers of each genotype; therefore significance tests were carried out on numbers of *Ace.1^R* and *Ace.1^S* alleles among live and dead mosquitoes.

Figure 1: Decline with time of RITN efficacy. (A) Comparison between PM+DEET treated net efficacy between the two seasons. (B) Comparison between PM+KBR treated net efficacy between the two seasons. (C) Comparison between KO-Thrin treated net efficacy between the two seasons. (D) Comparison between PM+DEET, PM+KBR and KO-thrin during the first trial in dry season. (E) Comparison between PM+DEET, PM+KBR and KO-thrin during the second trial in rainy season. Curves drawn according logistic plane regression of Equation (1) whose parameters are shown in Table 2.

References

1. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol.* 2000 Mar;14(1):1-5.
2. CDC. Insecticide Treated Bed Nets. In: *Malaria_Vector_Control*, editor. Center of Disease Control and Prevention. Atlanta, USA: http://www.cdc.gov/malaria/control_prevention/vector_control.htm#itn; 2007.

3. Pinto J, Lynd A, Vicente JL, Santolamazza F, Randle NP, Gentile G, et al. Multiple Origins of Knockdown Resistance Mutations in the Afrotropical Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE*. 2007;2(11):e1243.
4. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, et al. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Nov;73(5):859-64.
5. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, et al. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2000;14(1):81-8.
6. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F, Hougard JM, et al. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behavior of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J*. 2004 Jul 8;3(1):22.
7. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging Infectious Diseases*. 2007 February;13(2):199-206.
8. Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol*. 2002 Apr;18(4):161-3.
9. Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, Carnevale P. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol*. 2001 Mar;15(1):105-12.
10. Hougard JM, Corbel V, N'Guessan R, Darriet F, Chandre F, Akogbeto M, et al. Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull Entomol Res*. 2003 Dec;93(6):491-8.
11. Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, et al. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J*. 2005 May 26;4(1):25.
12. Pennetier C, Corbel V, Hougard JM. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jun;72(6):739-44.
13. Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapied B, et al. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J*. 2007;6:38.
14. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, et al. 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*. 1999 Sep;41(1-3):319-22.
15. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, Akogbeto M, et al. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health*. 2004 Dec;9(12):1267-73.
16. Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doannio JM, Koffi A, Konan LY, et al. [Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets]. *Med Trop (Mars)*. 1998;58(4):349-54.
17. N'Guessan R, Darriet F, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P. Olyset Net efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire. *Med Vet Entomol*. 2001 Mar;15(1):97-104.

18. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*. 2001;10(1):19-23.
19. Martinez Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*. 1998;7(2):179-84.
20. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, et al. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*. 2004 Feb;13(1):1-7.
21. Payne C. The GLIM system release 3.77 Manual. Numerical Algorithms Group Ltd, Oxford. 1987.
22. Collett D. Modelling Binary Data. Chapman & Hall/CRC, London. 1991.
23. Crawley M. GLIM for Ecologists. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1993.
24. Stump AD, Shoener JA, Costantini C, Sagnon N, Besansky NJ. Sex linked differentiation between incipient species of *Anopheles gambiae*. *Genetics*. 2005 Mar;169(3):1509-19.
25. Stump AD, Fitzpatrick MC, Lobo NF, Traore S, Sagnon N, Costantini C, et al. Centromere-proximal differentiation and speciation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 1;102(44):15930-5.
26. N'Guessan R, Boko, P., Odjo, A., Chabi, J., Akogbeto, M., Rowland, M. Experimental hut trials of chlorpyrifos methyl against *Kdr* resistant and susceptible *An. gambiae*, West Africa: an insecticide to replace DDT or supplement pyrethroids. *Malaria Journal*. 2007;(submitted).
27. Kolaczinski JH, Fanello C, Herve JP, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF. Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bull Entomol Res*. 2000 Apr;90(2):125-32.
28. N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, et al. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol*. 2003 Mar;17(1):19-25.
29. WHO. A generic risk assessment model for insecticide treatment and subsequent use of mosquito nets. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/20046. 2004.
30. Corbel V, Hougard JM, N'Guessan R, Chandre F. Evidence for selection of insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase by carbamate-treated nets in *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire. *J Med Entomol*. 2003 Nov;40(6):985-8.
31. Fanello C, Kolaczinski JH, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF. The *kdr* pyrethroid resistance gene in *Anopheles gambiae*: tests of non-pyrethroid insecticides and a new detection method for the gene. *Parassitologia*. 1999 Sep;41(1-3):323-6.
32. Lapied B, Penetier C, Stankiewicz M, Gautier H, Fournier D, Hougard JM, et al. The insect repellent DEET exerts neurotoxic effects through alterations of both neuronal function and synaptic transmission. FENS 2006, 5th Forum of European Neuroscience; 2006 July 8-12; Vienna, Austria; 2006.
33. Corbel V, Stankiewicz M, Bonnet J, Grolleau F, Hougard JM, Lapied B. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology*. 2006 Mar 2:1-12.
34. Koren G, Matsui D, Bailey B. DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *Cmaj*. 2003 Aug 5;169(3):209-12.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
35. McGready R, Hamilton KA, Simpson JA, Cho T, Luxemburger C, Edwards R, et al. Safety of the insect repellent N,N-diethyl-M-toluamide (DEET) in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Oct;65(4):285-9.
36. Buka RL. Sunscreens and insect repellents. *Curr Opin Pediatr.* 2004 Aug;16(4):378-84.
37. Kendrick DB. Mosquito repellents and superwarfarin rodenticides--are they really toxic in children? *Curr Opin Pediatr.* 2006 Apr;18(2):180-3.
38. Tomlin CDS. *The e-Pesticide Manual, a World Compendium.* British Crop Protection Council, London, United Kingdom. 2007.
39. Abdel-Rahman A, Abou-Donia S, El-Masry E, Shetty A, Abou-Donia M. Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Toxicol Environ Health A.* 2004 Jan 23;67(2):163-92.
40. Abou-Donia MB, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Abdel-Rahman A, Bullman SL, Khan WA. Co-exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and/or permethrin causes sensorimotor deficit and alterations in brain acetylcholinesterase activity. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004 Feb;77(2):253-62.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

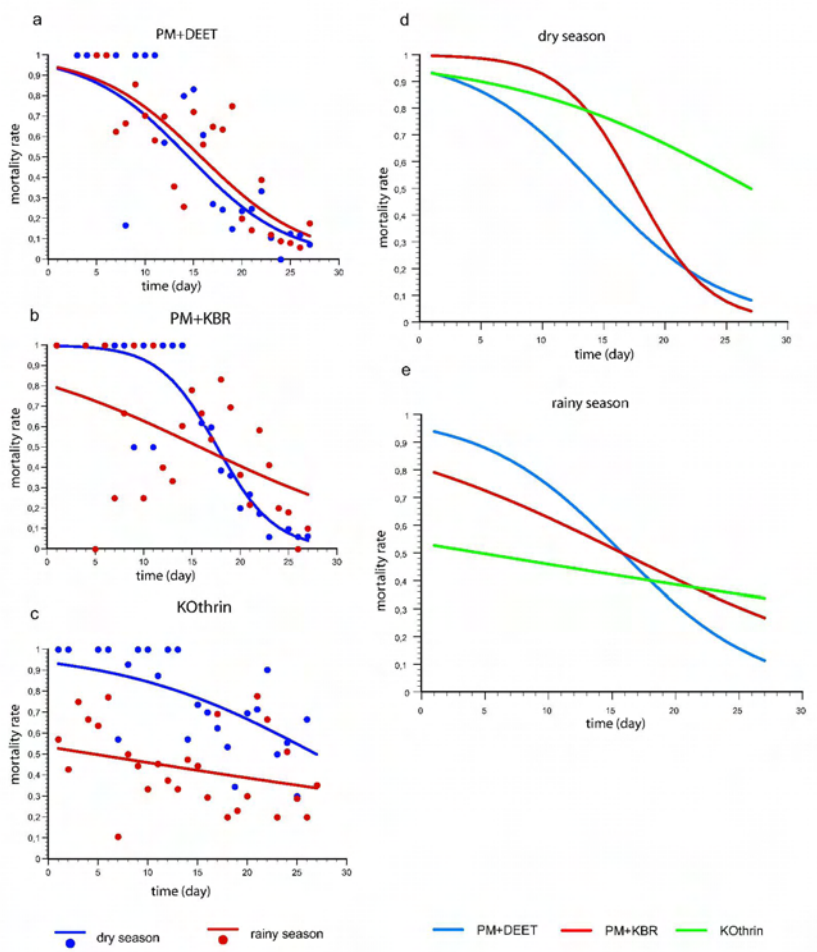


figure 1

210x297mm (600 x 600 DPI)

EMERGING INFECTIOUS DISEASES

Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Road, N.E.
Mail stop D61
Atlanta, GA 30333
Phone: 404-371-5329
Fax: 404-371-5449

A Peer-Reviewed Journal Tracking and Analyzing Disease Trends

Checklist for Authors

First Author and Manuscript Title: Cédric Pennetier, manuscript entitled: “A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae*”

<input checked="" type="checkbox"/>	This manuscript (or one with substantially similar content) has not been published and is not being considered for publication elsewhere.
<input checked="" type="checkbox"/>	Corresponding author is the primary contact for proofing the manuscript and galleys.
<input checked="" type="checkbox"/>	Financial support for this research is clearly disclosed in the manuscript.
<input checked="" type="checkbox"/>	Any organization with a financial interest in the subject matter is disclosed in the manuscript.
<input checked="" type="checkbox"/>	Authors have disclosed any conflict of interest related to this article.
<input checked="" type="checkbox"/>	Research has been approved by appropriate human or animal subjects research review boards, which are named in the text of the manuscript.
<input type="checkbox"/>	DNA and amino acid sequences have been submitted to a sequence database and accession numbers are used to refer to the sequences.
<input checked="" type="checkbox"/>	All persons who have made substantial contributions to this work but did not fulfill the authorship criteria are named in the Acknowledgments.
<input checked="" type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from all persons listed in the acknowledgments.
<input checked="" type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from all persons listed as authors on this manuscript.
<input type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from the publishers of any figures or tables previously published or adapted from published figures or tables.
<input type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from persons identifiable in photographs, case descriptions, or pedigrees.
<input checked="" type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from persons named in personal communications (oral or written) stating that they agree to be named and that the information cited is accurate.
<input checked="" type="checkbox"/>	All pages are double-spaced, numbered, and left justified (ragged right margin).
<input checked="" type="checkbox"/>	All references are cited in the text, follow Uniform Requirements (http://www.icmje.org/index.html), and have been checked for accuracy and completeness.
<input checked="" type="checkbox"/>	Legends for figures are at the end of the text.
<input type="checkbox"/>	Each figure is in a separate file.
<input checked="" type="checkbox"/>	The abstract meets the word count requirement for the type of manuscript (50 words for dispatches, 150 words for all others).
<input checked="" type="checkbox"/>	All units of measure are expressed in SI units per Instructions to Authors.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

<input checked="" type="checkbox"/>	A short (2-3 sentence) biography is provided for the first author or both if two authors.
-------------------------------------	---

Additional notes or statements:

Peer Review

Article 18

Esnault C., Boulesteix M., Duchemin J.B., Koffi A., Chandre F., **Dabiré K.R.**, Robert V., Simard F., Fontenille D., Biémont C. (2008). High genetic differentiation between molecular forms of *Anopheles gambiae* in Africa. *PLoS One* 3(4): e1968. doi:10.1371/journal.pone.0001968

High Genetic Differentiation between the M and S Molecular Forms of *Anopheles gambiae* in Africa

Caroline Esnault¹, Matthieu Boulesteix¹, Jean Bernard Duchemin², Alphonsine A. Koffi³, Fabrice Chandre⁴, Roch Dabiré⁵, Vincent Robert^{6,7}, Frédéric Simard^{8,9}, Frédéric Tripet¹⁰, Martin J. Donnelly¹¹, Didier Fontenille⁹, Christian Biémont^{1*}

1 Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (UMR 5558), CNRS, Université de Lyon, Université Lyon1, Villeurbanne, France, **2** Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES), Réseau International de l'Institut Pasteur, Niamey, Niger, **3** Institut Pierre Richet, Institut National de Santé Publique, Abidjan, Côte d'Ivoire, **4** Unité de Recherche 016, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), CREC, Cotonou, Bénin, **5** Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo Dioulasso, Burkina Faso, **6** Unité de Recherche 77, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Scientifique du Muséum 504, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, **7** Institut Pasteur, Antananarivo, Madagascar, **8** Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), Yaoundé, Cameroun, **9** Unité de Recherche 016, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France, **10** Centre for Applied Entomology and Parasitology, School of Life Sciences, Keele University, Staffordshire, United Kingdom, **11** Vector Group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool, United Kingdom

Abstract

Background: *Anopheles gambiae*, a major vector of malaria, is widely distributed throughout sub-Saharan Africa. In an attempt to eliminate infective mosquitoes, researchers are trying to develop transgenic strains that are refractory to the *Plasmodium* parasite. Before any release of transgenic mosquitoes can be envisaged, we need an accurate picture of the differentiation between the two molecular forms of *An. gambiae*, termed M and S, which are of uncertain taxonomic status.

Methodology/Principal Findings: Insertion patterns of three transposable elements (TEs) were determined in populations from Benin, Burkina Faso, Cameroon, Ghana, Ivory Coast, Madagascar, Mali, Mozambique, Niger, and Tanzania, using Transposon Display, a TE-anchored strategy based on Amplified Fragment Length Polymorphism. The results reveal a clear differentiation between the M and S forms, whatever their geographical origin, suggesting an incipient speciation process.

Conclusions/Significance: Any attempt to control the transmission of malaria by *An. gambiae* using either conventional or novel technologies must take the M/S genetic differentiation into account. In addition, we localized three TE insertion sites that were present either in every individual or at a high frequency in the M molecular form. These sites were found to be located outside the chromosomal regions that are suspected of involvement in the speciation event between the two forms. This suggests that these chromosomal regions are either larger than previously thought, or there are additional differentiated genomic regions interspersed with undifferentiated regions.

Citation: Esnault C, Boulesteix M, Duchemin JB, Koffi AA, Chandre F, et al. (2008) High Genetic Differentiation between the M and S Molecular Forms of *Anopheles gambiae* in Africa. PLoS ONE 3(4): e1968. doi:10.1371/journal.pone.0001968

Editor: Philip Awadalla, University of Montreal, Canada

Received: December 21, 2007; **Accepted:** March 7, 2008; **Published:** April 16, 2008

Copyright: © 2008 Esnault et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the PAL+ program of the french Ministry of Research and CNRS.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: biemont@biomserv.univ-lyon1.fr

Introduction

Malaria causes the deaths of more than one million people each year, mostly in Africa (WHO/UNICEF World Malaria Report 2005). This disease and the relevant mortality are due to one of four *Plasmodium* species, which are transmitted by mosquitoes. *Anopheles gambiae* is the major vector in sub-Saharan Africa, which has the greatest disease burden. Various methods have been developed to control mosquitoes. However, the failure of traditional measures together with the spread of insecticide-resistance in natural vector populations [1,2], have spurred on attempts to find alternative, unconventional approaches. One of the most innovative strategies sets out to replace the entire wild populations of *An. gambiae* with genetically modified, *Plasmodium*-resistant individuals. This idea seems more plausible following the successful genetic transformation of some anopheline species,

including *An. gambiae*, and the identification of putative target genes and gene drive mechanisms [3]. To ensure that the transgene spreads throughout the entire wild populations, however, we need to understand the population structure and level of gene flow of mosquito populations. This makes it very important to know whether the genetic differentiation between the two 'molecular forms' of *An. gambiae*, termed M and S, which are suspected of currently undergoing speciation [4–6], is a general phenomenon affecting all African populations. The distinction between the two forms was primarily based on sequence polymorphism in ribosomal DNA loci [7], which was subsequently confirmed by microsatellite data in Cameroon [8] and Mali [9], by the insertion patterns of various transposable elements (TEs) in Cameroon [10] and of the short interspersed nuclear elements (SINEs) *Maque* and *SINE200* in Burkina Faso, Central African Republic, Mali, and Kenya [11,12]. The *kdr* allele, which confers

knock-down resistance to pyrethroid insecticides and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), was mainly present in S individuals, and so this too was segregated between the two molecular forms [see 4, 12 for reviews]. Studies of the gene flow within and between the two molecular forms revealed, however, complex patterns of differentiation. Some analyses revealed greater differences between ecological zones [13], and between allopatric populations of a given molecular form than between the M and S populations [14], suggesting that the M and S speciation is not yet complete. Some data suggest that islands of speciation are present within the genomes of these two forms, mostly in the region near the centromeres of the X and 2L chromosomes and in a region of the 2R chromosome, whereas genetic differentiation remains weak in other regions of the genome [15–18]. This could explain why the estimates of genetic differentiation between the M and S forms vary depending on the type of markers used, and the location of the markers in the genome [8,9,13,19]. To find out whether the genetic differentiation between the M and S molecular forms is found throughout the geographical range of *An. gambiae*, we studied the insertion polymorphism of three TEs. Because the insertion sites of these TEs were scattered throughout the *An. gambiae* genome, this study provides an overview of a large portion of the mosquito genome. The insertion patterns of these TEs reveal clear differentiation between the M and S forms, whatever the geographical origin of the populations.

Results and Discussion

Twenty-one *An. gambiae* populations from ten African countries were studied: two populations from Benin, two from Burkina Faso, two from Cameroon, three from Ghana, five from Ivory Coast, one from Madagascar, one from Mali, one from Mozambique, three from Niger, and one from Tanzania (see Fig. 1, which also indicates the number of mosquitoes of the M and S molecular forms in each population). The M and S forms were distinguished on the basis of their rDNA sequence polymorphism. The non-Long Terminal Repeat (LTR) retrotransposon *Aara8*, the LTR retrotransposon *Ozymandias*, and the DNA transposon *Crusoe* were taken into consideration [10]. Individual TE insertion profiles were obtained by the Transposon Display method [20,21]. This technique is very similar to the Sequence-Specific Amplification Polymorphism, except that the PCR amplifies a DNA sequence defined by one primer anchoring to a conserved region of the TE, and another primer anchoring to an adaptor attached to flanking sites generated by enzymatic restriction digestion. The presence and absence of TE insertions can thus be scored in individuals (Fig. 2). We therefore compared the TE insertion profiles of individuals from all the populations by estimating the inter-population differentiation indices, Φ_{st} . This parameter is analogous to F_{st} , and can be used to analyze the presence/absence data [22] obtained by Transposon Display. The mean Φ_{st} values between the M and S populations (0.57 ± 0.07 for *Aara8*, 0.19 ± 0.04 for *Ozymandias*, 0.23 ± 0.05 for *Crusoe*), are higher than the Φ_{st} between M populations (0.12 ± 0.06 , 0.07 ± 0.04 , and 0.11 ± 0.07 , for *Aara8*, *Ozymandias*, and *Crusoe*, respectively) or S populations (0.10 ± 0.06 , 0.12 ± 0.09 , and 0.12 ± 0.07 , for *Aara8*, *Ozymandias*, and *Crusoe*, respectively) (see Table S1 for the between-population Φ_{st} and the associated P-values). A graphical representation using a Principal Coordinate Analysis (PCoA) (Fig. 3–5) clearly distinguishes between individuals of these two forms, whatever the TE and the population considered, and shows that individuals of a given molecular form cluster together. This similarity of the results for all three TEs is reinforced by significant Pearson correlation coefficient values between the Φ_{st} values

obtained for the three TEs ($r = 0.72$ for *Aara8* vs *Ozymandias*; $r = 0.70$ for *Aara8* vs *Crusoe*; $r = 0.77$ for *Ozymandias* vs *Crusoe*; P-values $< 1 \times 10^{-4}$). These data thus clearly reveal a high degree of differentiation between the M and S molecular forms in all 21 populations studied, with some “specific” TE insertion sites being present at high frequency in one or other form (Table 1). Among 20 such sites, 6 were found in all individuals (4 on M and 2 on S), whereas 14 were present at high frequency in one form or the other (see Fig 6). To check for possible differentiation between populations of the M or S forms, we did Principal Coordinate Analysis (PCoA) on either the M or the S populations. No structuration between populations of either the M or S form was detected, which suggests the absence of specific insertion sites for groups of populations apart from the M and S forms. This indicates that most insertion sites were widespread and highly polymorphic between populations.

To localize the specific TE insertions on the chromosome arms of *An. gambiae*, we extracted the corresponding ^{33}P labeled bands from polyacrylamide gels, and sequenced the DNA to make sure that the bands corresponded to the expected TEs and to obtain the sequences flanking the TEs. Among the 20 specific insertion sites that were attempted to be sequenced (13 on M and 7 on S), 7 were not isolated, 7 were isolated but were found to be integrated within repeated sequences or transposable elements and could not be localized, 3 were located in the “unannotated” chromosome. This suggests that some of these insertions were embedded within the heterochromatin or were inserted within nests of TEs, which could themselves be heterochromatic. The localization of some of the TEs specific to one of the molecular forms within the heterochromatin, raises the important possibility that drastic differences in the composition of heterochromatin may exist between populations, and the question of the influence of heterochromatin on genetic differentiation and speciation processes, once again highlighting the need for more intensive research on this particular genomic region [23]. Three of the specific insertions were however unambiguously localized on chromosomes. They consisted of two *Crusoe* (*Crusoe*-1, *Crusoe*-2) and one *Ozymandias* (*Ozym*-1) insertions specific to the populations of the M molecular form. These insertions were localized in the division 21 of the 2L chromosome (outside the known inversions), and division 16 of the 2R chromosome (outside the 2Rd inversion, at 800 kb from the inversion breakpoint) for *Crusoe*, and division 33 of the 3R chromosome for *Ozymandias*. These locations are outside the genomic regions previously identified as being genetically differentiated in the M and S forms [4,8,9,16,17,19] (see Fig. 7), suggesting either that the chromosomal regions involved in this differentiation are more extensive than expected, or that there are additional differentiated regions interspersed with undifferentiated regions. More detailed analyses of these regions are necessary. It has been shown that differential population adaptation can be determined from a subset of genes while gene flow still exists between the species under speciation [24,25]. The “islands of speciation” that define the M and S forms may thus be extending gradually, reducing gene flow and fixing some TE insertions close to the selected islands. Because the three localized insertions were outside the known inversions and not in the “islands of speciation”, these sites could result simply from genetic drift that has occurred after the separation of the M and S forms. If so, the fixed sites and the sites at high frequency would correspond to the sites of high occupancy frequency in the original founders, and the polymorphic insertion sites (sites with low occupancy frequency) would correspond to more recent transposition events, as observed in colonizing species [26]. This kind of insertion site frequency

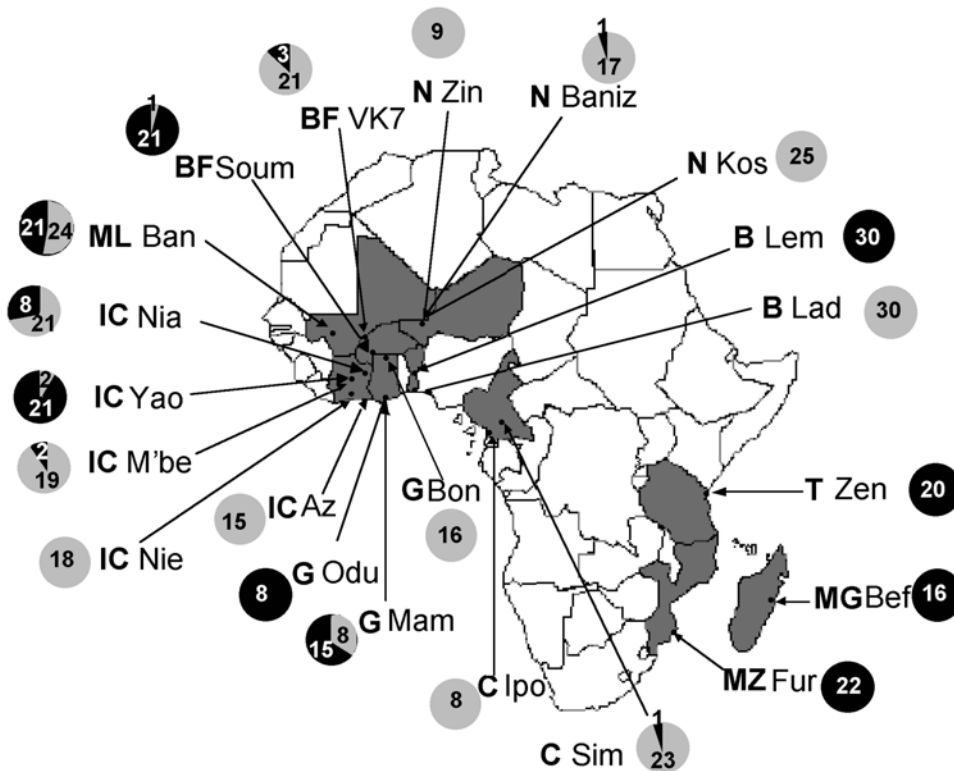


Figure 1. Geographic origin of the African *An. gambiae* populations. Sample sizes of the M and S molecular forms in each population are indicated in gray and black, respectively. Az = Azureti, Ban = Bankoumana, Baniz = Banizoumbou, Bef = Beforona, Bon = Bonia, Fur = Furvela, Ipo = Ipono, Kos = Kosseye, Lad = Ladji, Lem = Lema, Mam = Mampong, M'be = M'be, Nia = Niamoue, Nie = Nieky, Odu = Odumasy, Sim = Simbok, Soum = Soum, VK7 = Vallée du Kou, Yao = Yaokoffikro, Zen = Zenet, Zin = Zindarou. The populations were from **B** = Benin, **BF** = Burkina Faso, **C** = Cameroon, **G** = Ghana, **IC** = Ivory Coast, **MG** = Madagascar, **ML** = Mali, **MZ** = Mozambique, **N** = Niger, **T** = Tanzania. doi:10.1371/journal.pone.0001968.g001

pattern is compatible with the idea that *An. gambiae* has speciated or differentiated relatively recently [27]. According to the hypothesis of founder effects, the presence of fixed TE insertion sites in each molecular form could suggest that gene flow is more restricted than it has usually been thought to be, which would be consistent with the virtual absence of hybrids in nature [8, although an unusual frequency of hybrids was found in a population from Guinea Bissau; J. Pinto, personal communication]. However, among the 6 fixed sites that we sequenced, only one (*Crusoe-1*) was localized on the chromosome arms, the others were either on the unknown chromosome, or clearly embedded within heterochromatin or other transposable elements. In addition, *Crusoe-1*, which is fixed in the M form, reaches a frequency of 0.35 in the S form, suggesting it had been a site of high frequency in the initial population from which the M and S forms both derive. The two other localized sites, *Ozym-1* and *Crusoe-2*, which were outside the known inversions and the “islands of speciation”, were present at an intermediate frequency in the M populations (Fig 6), but at very low frequency in the S form. All these data are in agreement with founder events (26, 28) and then global expansion in Africa.

The wide distribution of *An. gambiae* suggests the possibility of population adaptations to local climatic conditions, resulting in local differentiation between populations of a same molecular form, as has indeed been observed for M populations in Cameroon and Mali, in addition to the M and S molecular form differentiation [29]. Both the M and S forms exist in Western Africa, while only the S form has been found in Eastern Africa, which implies that the S form has greater climatic adaptability or

migratory capacities than the M form. Although these two forms may coexist in the same area, they appear to be in the process of incipient speciation throughout Africa. No differences have been observed in *Plasmodium* infection rates between sympatric M and S forms in Cameroon [6]. Therefore, any attempt to construct a genetically-modified, *Plasmodium*-resistant mosquito, with the intention of replacing natural, infected populations, or any other strategy of controlling *An. gambiae*, will have to take this incipient speciation between the M and S molecular forms of the mosquito into account.

Materials and Methods

Mosquitoes

A total of 446 *An. gambiae* mosquitoes (257 M and 189 S) were sampled from 21 sites in Africa: Ladji (6°21' N, 2°27' E), Lema (7°46' N, 2°14' E) in Benin, Vallée du Kou (VK7, 11°24' N, 4°24' W), Soum (12°35' N, 2°17' E) in Burkina Faso, Simbok (3°49' N, 11°28' E), Ipono (2°22' N, 9°49' E) in Cameroon, Bonia (10°52' N, 1°07' W), Mampong (5°24' N, 0°36' W), Odumasy (5°53' N, 0°01' W) in Ghana, Azureti (5°12' N, 3°46' W), M'be (7°14' N, 5°1' W), Niamoue (5°52' N, 4°49' W), Nieky (5°24' N, 4°16' W), Yaokoffikro (7°11' N, 5°1' W) in Ivory Coast, Banizoumbou (13°32' N, 2°40' E), Kosseye (13°31' N, 2°1' E), Zindarou (13°26' N, 2°55' E) in Niger, Beforona (18°58' S, 48°15' E) in Madagascar, Bankoumana (12°50' N, 5°47' W) in Mali, Furvela (23°43' S, 35°18' E) in Mozambique, and Zenet (5°16' S, 38°36' E) in Tanzania. The species and molecular form of the specimens were identified using Fanello *et al.*'s protocol [30].

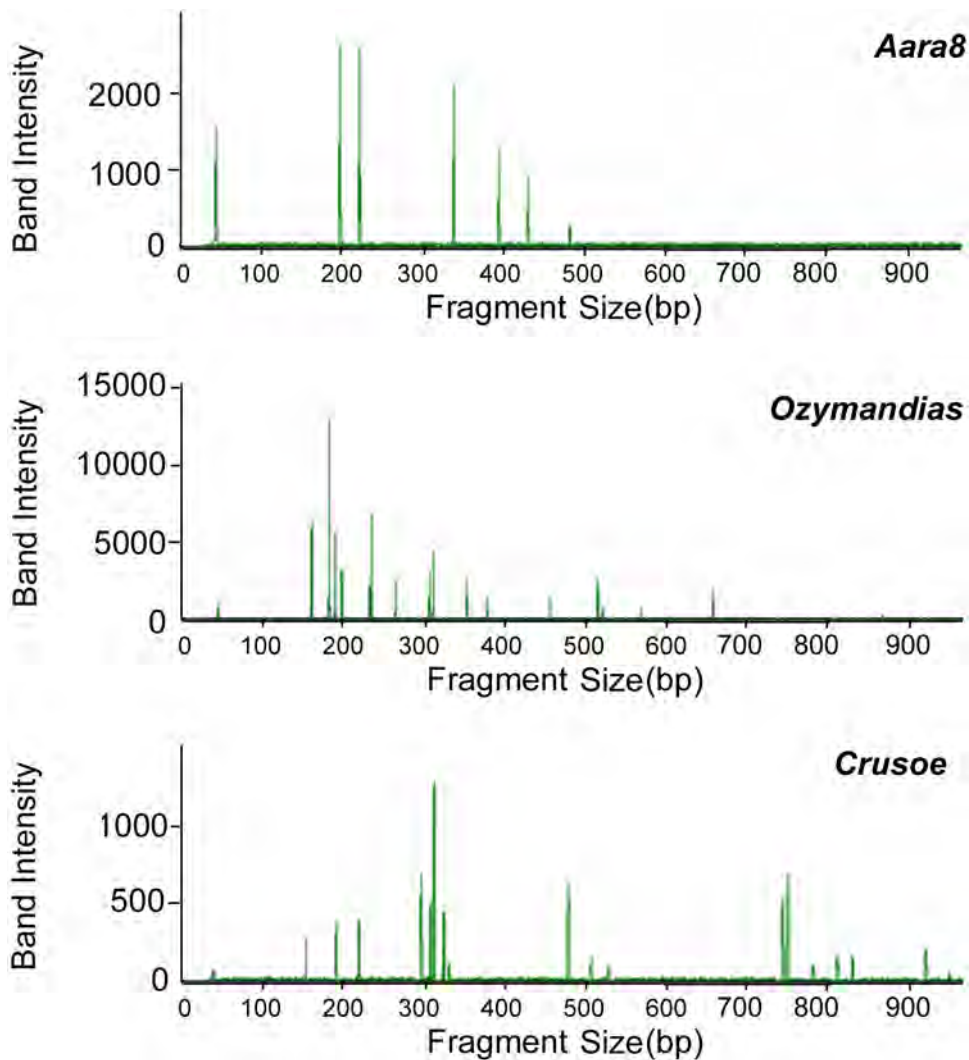


Figure 2. Example of individual TE profiles obtained by Transposon Display with *Aara8*, *Ozymandias*, and *Crusoe*. Each peak in the TE profile corresponds to one TE insertion in the individual analyzed. Because the probability that two TE copies would be inserted independently at the same site in two different individuals is negligible, fragments of the same size were assumed to be of identical descent, and each TE fragment of a given size was considered to be a single insertion. The matrices of the presence/absence of peaks were used to estimate genetic distances and do the PCoA analyses shown in Fig. 3, 4, and 5. doi:10.1371/journal.pone.0001968.g002

Transposon Display

Total genomic DNA was isolated from individual mosquitoes using a standard phenol-chloroform extraction procedure after proteinase K digestion. The Transposon Display was performed using a modified version of the protocol used by Zampicini et al. [31], as follows: 50 to 100 ng of genomic DNA was digested with 10 units of *HhaI* for 6 hours at 37°C; during the first round of amplification, 3 mM of MgCl₂ and 0.625 Units of Taq Polymerase were used; during the second amplification run, 0.2 μM of adaptor primer, 0.05 μM of nested TE-specific primer with HEX fluorescent labeling, 2.5 mM of MgCl₂ and 0.625 Units of Taq Polymerase were used. The last steps of the nested-amplification cycles lasted 45 sec, instead of 1 min. The sequences of adaptors and primers are shown in Table S2. Negative controls were performed using the adaptor-primer or the element specific-primer alone.

The PCR products were diluted 5-fold, and 1 μl of the dilution was loaded onto a MegaBace 1000 capillary sequencer (Amersham BioSciences) with an ET900-ROX standard size marker

(Amersham BioSciences). Raw data were analyzed by GeneticProfiler software (Amersham BioSciences). To confirm whether the amplified DNAs were identical to the expected TE product, 6–8 fragments were cloned using the Topo TA cloning kit (Invitrogen), following the Manufacturer's instructions, and sent to GenoScreen for sequencing. All analyzed fragments corresponded to the expected TE.

Data analysis

Each band on the capillary gels was automatically ascribed a molecular weight according to the DNA ladder, which was loaded on each capillary. We assumed that the DNA bands with the same molecular weight shared the same TE insertion. The individual TE insertion patterns obtained from the Transposon Display were thus recorded as a binary matrix of 0 and 1 denoting the absence or presence of a given peak on the capillary gel, respectively. The between-population genetic divergence, Φ_{st} , was calculated for each pair of population samples for the three transposable elements considered separately. This Φ_{st} , which allows for the

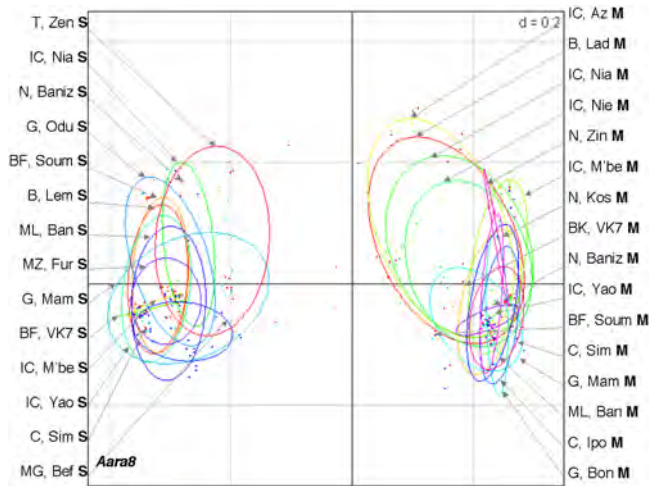


Figure 3. Principal Coordinate Analyses (PCoA) of the *Aara8* profiles obtained by the Transposon Display technique. The ellipses, calculated for each population, were centered on the gravity centre of each scatterplot, and the size of their axes was equal to 1.5 (the square root of the eigen values of the covariance matrix) times the standard deviation of the coordinates of the projections on the first and second axes. The percentage of variance explained by the first two axes was 75.4%, and the F value of MANOVA test between individuals of each molecular form was equal to 18.6 ($p < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0001968.g003

dominant nature of TE, is an analogue of the fixation index of inter-population differentiation, F_{ST} [22,32]. Because the inter-population index values calculated from samples consisting of less than 5 individuals were not reliable, these values were not included in the calculation of the mean Φ_{ST} values between populations. Graphical representations of the proximities between individuals were obtained using a Principal Coordinate Analysis (PCoA), using the R package ade4 [33]. All individuals were included in these analyses, because those from small samples were not expected to bias the results, as they were not assigned *a priori* to any specific population. For each population, we then drew the ellipses centered on the gravity center of each scatterplot, with the size of the two first axes equal to 1.5 times the standard deviation of the coordinates of the projections on the axes. MANOVA between molecular forms was performed using JMP Version 7 software (SAS Institute Inc.), and the variance components were tested for significance by nonparametric randomization tests with the null hypothesis of no population structure.

The detection of population differentiation by the PCoA is based on the sites that are either fixed or at high frequency in a form and not in the other. Hence sites with very high insertion polymorphism play no role in the differentiation.

Identification of transposable element insertion sites

Fragments obtained from the Transposon Display were separated on a 6% denaturing polyacrylamide gel. Samples were diluted with one volume of loading dye (95% formamide, 0.05% xylene cyanol FF, and 0.05% bromophenol blue), heat denatured at 95°C for 5 min, and immediately cooled on ice. Polyacrylamide gel was pre-run at 75 W for 30 min. Six μ l of each sample were run at 75 W for 4 h in 1xTBE. We used radioactive ^{33}P labeling; the gel was transferred to Whatman 3 MM paper, and vacuum dried at 65°C for 1 h; dried gels were exposed to X-ray films overnight or for 48 h, depending on the signal intensity [34]. The fragments of interest were cut from the gels, the DNA was eluted from the bands at 100°C for 15 min and resuspended in

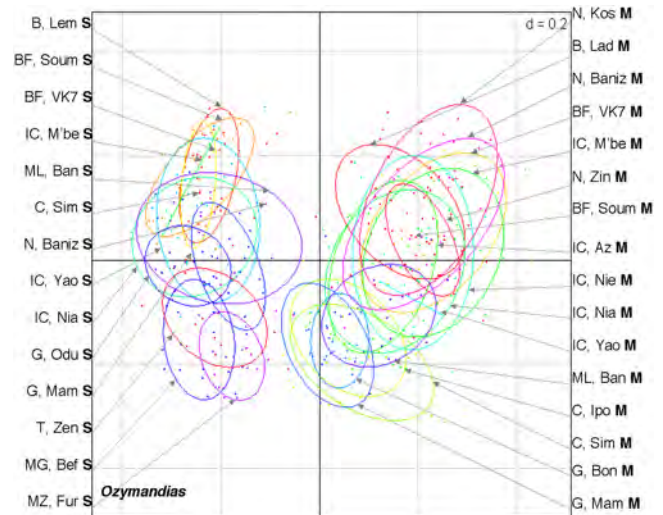


Figure 4. Principal Coordinate Analyses (PCoA) of the *Ozymandias* profiles. The percentage of variance explained by the first two axes was 55.1%, and the F value of MANOVA test between individuals of each molecular form was equal to 4.3 ($p < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0001968.g004

150 μ l of sterile water. The fragments were amplified according to the second amplification run of the Transposon Display protocol, and cloned using the Topo TA cloning kit (Invitrogen). About 5 clones for each fragment were sequenced by GenoScreen. The genomic localizations of the sequenced DNAs were determined by interrogation of the *Anopheles gambiae* genome database (Ensembl Agamp3 assembly, release 46.3i). Among the 14 sequenced fragments, only three presented a flanking sequence localized in only one site on the chromosome arm. These three fragments corresponded to two insertions of the DNA transposon *Crusoe* and to one insertion of the LTR retrotransposon *Ozymandias*. Their specificity to the M form was confirmed by PCR. Amplifications were performed following the second amplification run of Transposon Display, using primers *Crusoe*-1F 5'-CCTATT-

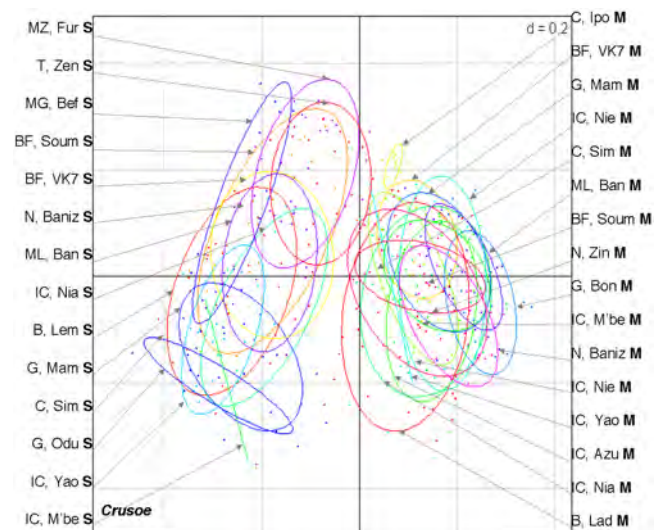


Figure 5. Principal Coordinate Analyses (PCoA) of the *Crusoe* profiles. The percentage of variance explained by the first two axes was equal to 55.0% and the F value of MANOVA test between individuals of each molecular form was equal to 4.1 ($p < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0001968.g005

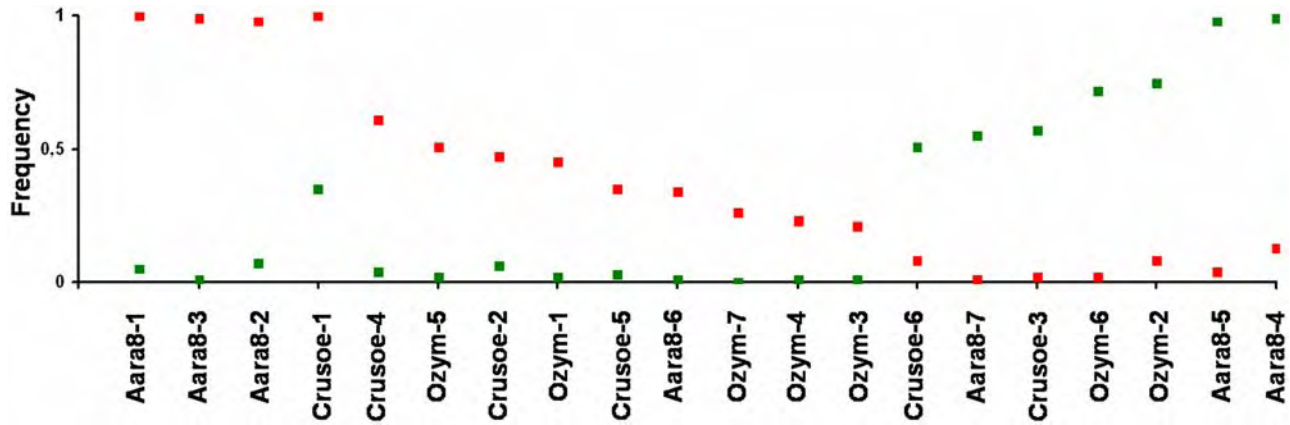


Figure 6. Frequencies of the 20 insertion sites sequenced in the M (red squares), and S (green squares) molecular forms. Insertion sites localized on the chromosomes: *Crusoe*-1-2, *Ozym*-1. Insertion sites localized on the unknown chromosome: *Aara8*-2-3-5. Insertion sites integrated within other transposable elements or repeated sequences: *Aara8*-1-4-6, *Ozym*-2-5, *Crusoe*-3-4. Insertion sites not isolated: *Aara8*-7, *Ozym*-3-4-6-7, *Crusoe*-5-6.
doi:10.1371/journal.pone.0001968.g006

Table 1. Number of insertion sites and average site numbers ± SE of *Aara8*, *Ozymandias*, and *Crusoe* for the populations of the S and M molecular forms.

	Number of insertion sites				Mean insertion sites number ± SE	
	Specific to M molecular form	Specific to S molecular form	Common to both forms	Total number of loci with an insertion	M molecular form	S molecular form
<i>Aara8</i>	4	3	3	110	6.58 ± 1.71	6.69 ± 1.43
<i>Ozymandias</i>	5	2	12	245	19.41 ± 5.78	12.99 ± 3.73
<i>Crusoe</i>	4	2	7	169	10.33 ± 3.01	11.67 ± 3.84

doi:10.1371/journal.pone.0001968.t001

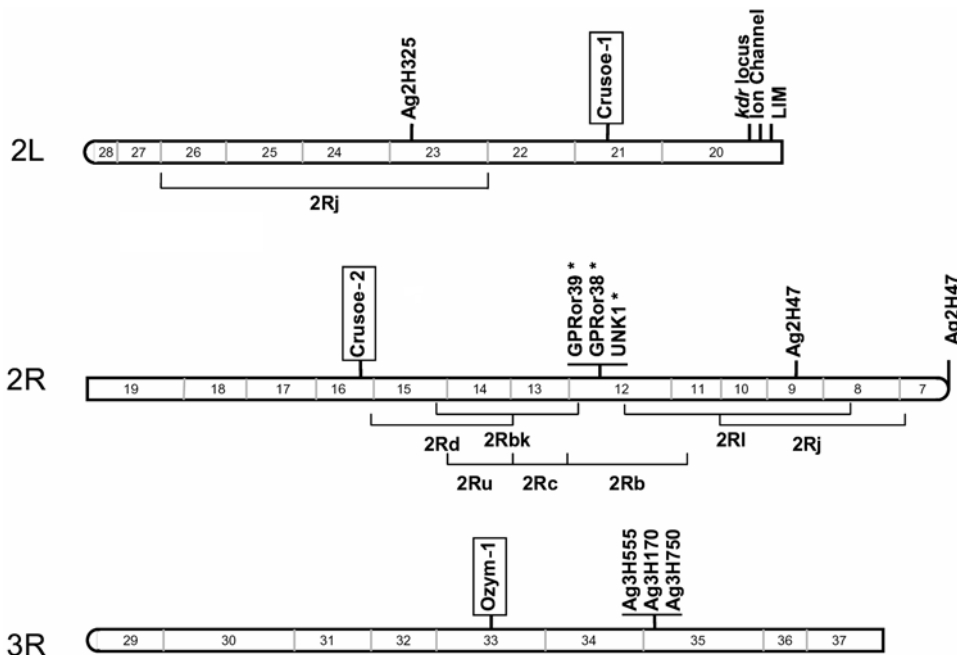


Figure 7. Position on chromosomes 2 and 3 of the three TE insertions specific to the M molecular form (in box). The loci Ag2H325, Ag2H417, Ag2H769, Ag3H555, Ag3H170, Ag3H750 from [8], *kdr* from [4], and *Ion channel* and *LIM* from [17], have been shown to differentiate the two M and S forms in previous studies. The chromosomal inversions of the *An. gambiae* genome are indicated below the chromosome arms. The GPRor39, GPRor38, and UNK1 loci, indicated by asterisks, have been shown to discriminate between the two forms only in Cameroon [16].
doi:10.1371/journal.pone.0001968.g007

GATTTGTCCGACACTG-3', Crusoe-1R 5'-TCACTTCAGGTTCGAAACAG-3', Crusoe-2F 5'-CCTATTGATTGTCCGACACTG-3', Crusoe-2R 5'-TTTACCTGGC TTTTGGCAAT-3' and Ozym-1F 5'-TGCTATAAGCAATCCACCACA-3', Ozym-1R 5'-CTCAAAGTGTGCTTCTCACC-3' for the Crusoe-1, Crusoe-2 and Ozym-1 insertions, respectively.

Supporting Information

Table S1

Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae*
 Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001968.s001 (1.58 MB DOC)

Table S2

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001968.s002 (0.03 MB DOC)

References

- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, et al. (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. *Parasitologia* 41: 319–322.
- Amorosa LF Jr., Corbellini G, Coluzzi M (2005) Lessons learned from malaria: Italy's past and sub-Sahara's future. *Health Place* 11: 67–73.
- Boete C (2006) Genetically Modified Mosquitoes for Malaria Control. Austin, Texas, U S A: Landes Biosciences. pp 174.
- della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, et al. (2002) Speciation within *Anopheles gambiae*—the glass is half full. *Science* 298: 115–117.
- Fanello C, Petrarca V, della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, et al. (2003) The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 12: 241–245.
- Wondji C, Simard F, Petrarca V, Etang J, Santolamazza F, et al. (2005) Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J Med Entomol* 42: 998–1005.
- 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.
- Wondji C, Simard F, Fontenille D (2002) Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol* 11: 11–19.
- Wang R, Zheng L, Toure YT, Dandekar T, Kafatos FC (2001) When genetic distance matters: measuring genetic differentiation at microsatellite loci in whole-genome scans of recent and incipient mosquito species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10769–10774.
- Boulesteix M, Simard F, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene HP, Fontenille D, et al. (2007) Insertion polymorphism of transposable elements and population structure of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms in Cameroon. *Mol Ecol* 16: 441–452.
- Barnes MJ, Lobo NF, Coulibaly MB, Sagnon NF, Costantini C, et al. (2005) SINE insertion polymorphism on the X chromosome differentiates *Anopheles gambiae* molecular forms. *Insect Mol Biol* 14: 353–363.
- della Torre A, Tu Z, Petrarca V (2005) On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 755–769.
- Yawson AE, Weetman D, Wilson MD, Donnelly MJ (2007) Ecological zones rather than molecular forms predict genetic differentiation in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. in Ghana. *Genetics* 175: 751–761.
- Lehmann T, Licht M, Elissa N, Maega BT, Chimumbwa JM, et al. (2003) Population Structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *J Hered* 94: 133–147.
- Stump AD, Fitzpatrick MC, Lobo NF, Traore S, Sagnon N, et al. (2005) Centromere-proximal differentiation and speciation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15930–15935.
- Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV (2005) Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol* 3: e285.
- Turner TL, Hahn MW (2007) Locus- and population-specific selection and differentiation between incipient species of *Anopheles gambiae*. *Mol Biol Evol* 24: 2132–2138.
- Slotman MA, Reimer IJ, Thiemann T, Dolo G, Fondjo E, et al. (2006) Reduced recombination rate and genetic differentiation between the M and S forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Genetics* 174: 2081–2093.
- Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Caccone A (2001) Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 10: 25–32.
- Van den Broeck D, Maes T, Sauer M, Zethof J, De Keukeleire P, et al. (1998) Transposon Display identifies individual transposable elements in high copy number lines. *Plant J* 13: 121–129.
- Casa AM, Brouwer C, Nagel A, Wang L, Zhang Q, et al. (2000) The MITE family heartbreaker (Hbr): molecular markers in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10083–10089.
- Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Mol Ecol* 4: 135–147.
- Johnson L (2007) Transposon silencing: The extraordinary epigenetics of a transposon trap. *Heredity*. doi:10.1038/sj.hdy.6801064.
- Machado CA, Kliman RM, Markert JA, Hey J (2002) Inferring the history of speciation from multilocus DNA sequence data: the case of *Drosophila pseudoobscura* and close relatives. *Mol Biol Evol* 19: 472–488.
- Wu C-I, Ting C-T (2004) Genes and speciation. *Nature Rev Genet* 5(2): 114–122.
- Garcia Guerreiro MP, Fontdevila A (2007) The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXVI. Molecular structural analysis of *Oswaldo* retrotransposon insertions in colonizing populations unveils drift effects in founder events. *Genetics* 175: 301–310.
- Mukabayire O, Caridi J, Wang X, Touré YT, Coluzzi M, Besansky NJ (2001) Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single-copy loci. *Insect Mol Biol* 10: 33–46.
- Macpherson JM, Gonzalez J, Witten DM, Davis JC, Rosenberg NA, et al. (2008) Nonadaptive explanations for signatures of partial selective sweeps in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* (in press).
- Slotman MA, Triplet F, Cornel AJ, Meneses CR, Lee Y, et al. (2007) Evidence for subdivision within the M molecular form of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* 16: 639–649.
- Fanello C, Santolamazza F, della Torre A (2002) Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol* 16: 461–464.
- Zampicini G, Blinov A, Cervella P, Guryev V, Sella G (2004) Insertional polymorphism of a non-LTR mobile element (NLRCth1) in European populations of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) as detected by transposon insertion display. *Genome* 47: 1154–1163.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Chesed D, Dufour AB, Thioulouse J (2004) The ade4 package - I : One-table methods. *R news* 4: 5–10.
- Melayah D, Bonnard E, Chalhoub B, Audeon C, Grandbastien MA (2001) The mobility of the tobacco Tnt1 retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors. *Plant J* 28: 159–168.

Acknowledgments

We thank Abdoulaye Diabate for his help with collecting wild mosquitoes, Emmanuelle Lerat and Cristina Vieira for their helpful comments, the technical DTAMB platform at Lyon for providing access to the MegaBACE™ capillary sequencer, Corinne Mhiri for her help with sequencing of some specific TE insertions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DF CB MD CE MB. Performed the experiments: CE. Analyzed the data: CB CE. Contributed reagents/materials/analysis tools: DF VR FS JD RD MD MB AK FC FT. Wrote the paper: CB CE.

RESUME

Au Burkina Faso, les vecteurs du paludisme sont représentés essentiellement par quatre espèces anophéliennes dont la répartition géographique varie en fonction des faciès agro-climatiques: il s'agit d'*Anopheles gambiae* s.s., d'*An. arabiensis*, d'*An. funestus* et *An. nili*. Les deux dernières espèces ont une répartition plus focalisée à l'Ouest du pays tandis qu'*An. arabiensis* est plus représentée au centre et à l'Est du pays.

L'analyse moléculaire d'*An. gambiae* s.s. a révélé que cette espèce était subdivisée en deux formes moléculaires S et M. Ces formes moléculaires sont rencontrées sur tout le territoire avec une prédominance de la forme S dans les savanes humides à l'Ouest du pays. La forme M est plus représentée au centre et au nord du pays mais aussi dans les zones rizicoles.

A l'instar d'*An. gambiae* s.s., *An. funestus* est elle aussi subdivisée en deux entités identifiables seulement au niveau chromosomique, les formes Kiribina et Folonzo sympatriques dans les savanes du centre et de l'Ouest du pays. Dans cette partie du pays, elles prennent le relais d'*An. gambiae* s.s. dans la transmission du paludisme vers la fin de la saison des pluies (Septembre et Octobre). La forme Kiribina serait la seule représentée dans les sites irrigués en l'occurrence la plaine rizicole de la Vallée du Kou.

L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) essentiellement à base de pyréthrinoïdes est le principal outil de lutte contre le paludisme. Vulgarisée à large échelle, l'efficacité de cet outil est menacée par l'apparition de la résistance d'*An. gambiae* s.l. principal vecteur, aux insecticides. La mutation *kdr* Leu-Phe est le principal gène impliqué dans cette résistance aux pyréthrinoïdes. Détectée essentiellement dans les populations de la forme moléculaire S en 2000 à de très forte fréquence (90%), cette mutation s'est vite propagée dans la forme moléculaire M atteignant des fréquences de plus de 60% par endroits. Trouvée chez un seul spécimen d'*An. arabiensis* à l'époque, elle a été détectée à une fréquence de plus de 30 % chez cette espèce dans la zone soudano-sahélienne où elle n'avait pas été rencontrée jadis.

Bien que des échecs opérationnels n'aient pas encore été rencontrés dans ces zones de résistance, la gestion éventuelle de cette résistance a orienté les recherches vers l'utilisation d'autres insecticides notamment les carbamates (CM) et les organophosphorés (OP) en mélange ou en mosaïque avec les pyréthrinoïdes. Là encore, l'émergence du gène *ace.1^R*, principale mutation conférant une résistance croisée à ces deux familles d'insecticides a été détectée principalement dans les zones cotonnières de l'Ouest. L'émergence récente de cette mutation détectée à la fois dans les formes moléculaires S et M d'*An. gambiae* mais probablement aussi chez *An. arabiensis* au Sud-Ouest du pays serait attribuée à l'introduction au milieu des années 90 des CM et des OP en rotation avec les pyréthrinoïdes contre les ravageurs du coton. Dans un contexte où en Afrique de l'Ouest la propagation du gène *kdr* prend de l'ampleur traduisant un souci majeur de l'efficacité à long terme des MII, la pulvérisation intradomiciliaire à base de DDT, jadis abandonnée pour les mêmes raisons de résistance, anime à nouveau les débats.

Dans ce contexte, la mise au point de nouvelles formulations ou de combinaisons d'insecticides s'avère indispensable. L'avènement des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (LLINs) prend le relais avec pour objectif d'améliorer à la fois la disponibilité de l'insecticide mais aussi la durabilité des moustiquaires.

De façon globale, la lutte contre le paludisme demeure toujours un challenge et aucune technique ne saurait à elle seule en porter l'exclusivité. On assiste alors à la multiplication des essais de nouveaux médicaments et vaccins au moment où la publication du génome de l'anophèle donne de l'espoir quant à l'utilisation des moustiques génétiquement modifiés comme stratégie complémentaire des méthodes actuellement utilisées dans la lutte contre le vecteur du paludisme.

Mots-clés : paludisme, vecteurs, *Anopheles gambiae* s.l., formes moléculaires M et S, *Anopheles funestus*, résistance aux insecticides, *kdr*, *ace.1^R*, Burkina Faso, Afrique de l'Ouest

SUMMARY

In Burkina Faso, malaria vectors are composed mainly by *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. funestus* and *An. nili*. Their distribution varied following the agro-climatic zones. The two latest species were focused in the western regions of the country whereas *An. arabiensis* was most spread in the centre and the eastern regions.

The molecular identification of *An. gambiae* s.s. revealed that the two molecular forms M and S were found elsewhere in the country scale but the S form was predominantly distributed in the western humid savannahs whereas the M form was found in the centre and the north and also in the rice growing areas.

An. funestus represented by the two chromosomal forms termed Kiribina (standard chromosomal arrangement) and Folonzo (inversed arrangements) sympatric in the Western part of the country transmitted malaria toward the end of the rainy season where *An. gambiae* density decreased.

The insecticide impregnated bednets (ITNs) were perceived as the strongest tool to reduce malaria transmission. But their efficacy in the long term was controversial due to the occurrence of the Leu-Phe based *kdr*. Detected formerly in the S populations at high frequencies (80%), this mutation conferring resistance to pyrethroids increased dramatically in the M form reaching 60% in some areas. Formerly detected only in one specimen in 2000, the frequency of this mutation increased in *An. arabiensis* populations averaging 30% in the sudan-sahelian zone where it was formerly absent.

However no resistance was observed in the operational scale, the occurrence of this pyrethroid resistance suggested the failure of this strategy in the long term. The research of alternative ways had implied the use of new insecticides such as carbamates (CM) or organophosphates (OP) or new pyrethroid-based combinations. Herein the emergence of *ace.1^R* mutation conferring the resistance to CM and OP occurred among the populations of both M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s. and probably also within *An. arabiensis* populations mainly in the cotton belt of the West.

Meanwhile the finding of durable tool such as vaccines, the vector control has been enhanced by the use of long lasting impregnated nets (LLINs) expected to improve the efficacy of classic impregnated nets.

Globally the prevention against malaria remains a long term challenge and must regroup multidisciplinary concepts. In the context of the publication of the whole genome both of *An. gambiae* and *P. falciparum*, the use of genetically modified mosquitoes can now be properly envisioned not exclusively but in the way to complete the package of the successful strategies being in use in the field.

Key-words: malaria, vectors, *Anopheles gambiae* s.l., molecular forms S and M, *Anopheles funestus*, insecticides resistance, *kdr*, *ace.1^R*, Burkina Faso, West Africa