

MINISTERE DE L'EDUCATION

UNIVERSITE DE BAMAKO

REPUBIQUE DU MALI

Un Peuple - Un But - Une Foi

Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Année : 2002 – 2003

N°

TITRE

**SENSIBILITE DES VECTEURS
DU PALUDISME AU DDT ET
AUX PYRETHRINOIDES DE
SYNTHESE PRECONISES
POUR L'IMPREGNATION AU
MALI**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le **30 Novembre 2002**
Devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
Par

Mademoiselle **Fatoumata DIARRASSOUBA**
Pour obtenir le grade de **Docteur en Pharmacie** (Diplôme d'Etat)

JURY :

Président : Professeur **Amadou DIALLO**

Membres : Docteur **Massambou SACKO**
Docteur **Ousmane KOITA**

Directeur : Docteur **Sékou Fantamady TRAORE**
Co-directeur: Docteur **Guimogo DOLO**

DEDICACES

A DIEU

*LE TOUT PUISSANT, OMNIPOTENT,
CLÉMENT ET MISÉRICORDIEUX POUR
M'AVOIR DONNÉ LA FORCE
NÉCESSAIRE ET LE COURAGE POUR
LA RÉALISATION DE CE MODESTE
TRAVAIL*

**A *Feu* mon Grand-Père,
Mory Moussa SAMAKE
Où que tu sois, saches que
je pense à toi et que je t'aime...**

DEDICACES

❖ A mon père : Soumana DIARRASSOUBA

Toi qui m'a donnée la vie, toi sans qui je n'aurais jamais été ce que je suis actuellement, toi qui a été au début, pendant et à la fin de cette thèse, jamais ne trouverai les mots exacts pour t'exprimer tout mon amour, mon admiration et ma fierté. Je ne t'échangerai jamais, même pour toutes les richesses du monde.

Puisse Dieu te garder encore longtemps auprès de nous et en très bonne santé, car nous n'aurons jamais fini d'avoir besoin de toi.

❖ A ma mère : Assitan SAMAKE

Si l'on avait le pouvoir de se choisir une mère, je n'aurais pas hésité une seconde à te choisir. Tu es l'exemple de ma vie, la lumière qui a guidé mes jeunes pas, qui continue de me guider et tu continueras toujours à me guider. Je n'aurais jamais assez de tes conseils et de ta tendresse.

Puisse Dieu te prêter une longue et solide vie pour que tu te rendes compte à quel point tu es ma référence et pour que tu sois encore fière de moi.

❖ A mes frères : N'Faly DIARRASSOUBA, Ibrahim DIARRASSOUBA

Je n'exprimerai jamais assez tout l'amour que je ressens pour vous. Vous êtes et vous serez toujours mes premiers compagnons pour la vie. Je vous souhaite beaucoup de courage et de chance dans la vie pour qu'ensemble, nous puissions adoucir et remplir de bonheur les vieux jours de nos parents.

❖ A mes cousines : Mansou Geye (Poupée), Fatim Kéita et Saran Konaté

Vous avez toutes, contribué d'une façon ou d'une autre à mon bonheur actuel, à ma thèse. Vous étiez là chaque fois que j'ai eu besoin de vous, vous m'avez soutenue physiquement et moralement dans tous mes moments difficiles. C'est pour cela que cette thèse est aussi la votre.

❖ A mes cousins : Nouhoum DIARRASSOUBA , Ibrahima KOITA et Docteur Sidibé

Par vos conseils, votre humour et votre gaieté, vous m'avez aidé à éviter de nombreuses embûches de la vie. Je ne vous rendrai jamais assez l'affection dont vous me couvrez.

❖ **A TOUS MES COUSINS ET COUSINES :**

Boih, Batogoma, Nènè, Ina, Mani, Mohamed, Fanta, Youssouf, les jumelles, pour ne citer que ceux-ci. Bon courage pour la vie !

❖ **A mes oncles et tantes :**

Je ne vous rendrai jamais assez l'affection que vous me donnez si gracieusement.

❖ **A tous mes grands-pères et grands-mères :**

Merci pour vos bénédictions.

❖ **A mon cher et tendre futur époux : Birama Apho LY**

Ton sens du respect pour ton prochain, ta tolérance, ta sagesse, la bonté de ton cœur et ton sens de l'humour à toute épreuve, font de toi le gendre que tout parent espère pour sa fille et l'époux dont toute femme rêve dans sa vie. Tes conseils, ton amour, ta patience et surtout ta compréhension m'ont été indispensables pour la réalisation de cette thèse, qui est aussi la tienne.

❖ **A mes chers oncle et tante Sitan et Bécaille HAIDARA :**

Vous êtes l'exemple vivant de l'amour, de la tendresse, de la tolérance, de la bonté. Vous êtes ma référence et mes conseillers. Puisse Dieu vous maintenir encore très longtemps en bonne santé, ensemble et avec nous.

❖ **A ma Chère tante Madame Ballo Oumou :**

Merci pour ton aide, tes conseils et encouragements

❖ **A mes amis et compagnons de tous les jours :**

Fatou Barro, Tatiana A. Eroumé, Tita, Nè, Yah, Poupée, Amadou Bocoum, Seydou Traoré, Fatou Fofana, Fatou Sangaré, NaFissa Benjeloum, Amehoun Mariane, Amsétou Foumakoye, Amsétou Germakoye, Mouhamadan Niang, aux sœurs Doumbia, Baténin Sacko, Fanta Diallo, Madani Telly, Moctar Diallo, Police, Yacouba et Lala Sissoko, Evance B. Zougrana, Diablo Sissoko, Youssouf Traoré, Youssef Kalil, Youssouf Maiga, les Frères Togola, les Frères Ongoiba, Sékou Coulibaly, Ismael Macalou, Djoumé Coulibaly, Sékou Koumaré, Lamine et Mohamed Soumaré, Edith Bougouma, Abdrahamane Touré, Aïcha Touré, Eden Kossi, Tohourri Romain, Scholastique Tchoumbé,

Ousmane Ly, Madani Ly, Sara Sissoko, Mahamadou Ibrah, Bagayoko, Vie de Dieu.

❖ **A mes collègues de promotion:**

Diady Daouda Abdoul Haqq, Boubou Traoré, Eana Ouologuen, Zoumana Cissé, Ténin Samaké, Mariam Samaké, Oumar Guindo, Oumar Kassonké, Ibrahim Dembélé, Amina Amadou, Kara Touré, Alpha Adamou, pour ne citer que ceux-ci.

❖ **A mes aînés :**

Dr. Yéya Coulibaly, Dr. Bagayoko Ibhahima, Dr. Zoumana Fané et Dr. Mamadou B. Touré (Pélé)

❖ A tout le personnel de l'Officine Badji Soussoko et au Docteur M. B. Sissoko

❖ A tout le personnel du L.B.M.A.

❖ **Aux Familles:**

Samaké (Hamdallaye Plateau, Bamako)

Diarrassouba (Kalaban-coura)

Samaké (Kalaban-coura)

Coulibaly (Magnabougou, Projet, Bamako)

Ly (Hippodrome, Bamako)

Traoré (Lafiabougou, Bamako)

Konaré (Manantaly et Faladiè Sema)

Doumbia (Manantaly)

Keïta (Point G, Village, Bamako)

Camara (Kati)

Koné (Sikasso)

Koné (Bouaké, Côte d'Ivoire)

Tablé (Bouaké, Côte d'Ivoire)

Nègre (Bouaké, Côte d'Ivoire)

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

A tout le corps professoral de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto-stomatologie.

A tous mes maîtres depuis la maternelle jusqu'à la Faculté, en particulier :

- Le Professeur Amadou DIALLO
- Le Professeur Yéya T. TOURÉ
- Le Docteur Cheick F. TRAORE
- Le Docteur Massambou SACKO
- Le Docteur Abdoulaye TOURÉ
- Le Docteur Guimogo DOLO
- Le Docteur Djibril SANGARÉ
- Le Docteur Ousmane KOITA
- Le Docteur Mamadou B. COULIBALY

- Madame Jeanne PALENFO

A tout les étudiants de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto-stomatologie du Mali (FMPOS)

A tout le personnel de la bibliothèque de la FMPOS.

Adama Sacko : Merci du plus profond de mon cœur pour l'aide inestimable que tu m'as apportée, dans tous les domaines et sans restriction. Ton amour pour le travail bien fait et ordonné ont indéniablement facilité ce travail qui s'est déroulé dans la bonne ambiance qui règne toujours autour de toi. Puisse Dieu te donner une longue vie remplie de bonheur.

A tout le personnel du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme de la Faculté de médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (MRTC/FMPOS), en particulier : Abdallah Diallo, Ibrahima Bader, Abdramane Fofana, Boubacar Coulibaly, Moussa Diallo, Alpha yaro, Adama Dao, Oumou Niaré, Moussa Kéita, Ibrahim Moussa Sissoko et Mohamed Fofana. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre sympathie, tolérance et votre disponibilité à toute épreuve qui ont rendu agréable mon passage dans votre équipe.

Aux Sieurs Dr. Sakaï (Grand-père) et S. Karambé, je ne saurais dire combien votre gentillesse m'a marquée tout au long de ce travail. Veuillez accepter l'expression de ma profonde reconnaissance.

A tous les informaticiens du MRTC : Sidy Soumaré, Madane Soumaré Salimata, Amadou Diallo et Mady Diarra

A tous les chauffeurs du MRTC : Mamadou Keïta, Abdoulaye Koné, Yoro Sidibé, Moro Diakité, Moumine Diallo, Madou Diallo, Issouf Oueleguem.

Aux garçons de salle du MRTC, Bemba Diarra et Abdoulaye Coulibaly
A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cet ouvrage.

Veillez recevoir ici nos sentiments les plus respectueux.

AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et président du jury :

Professeur Amadou Diallo,

Professeur agrégé de Biologie Animale et de Zoologie

Chargé du cours de Biologie Animale et de Zoologie à la FMPOS

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Votre bonne humeur inaltérable et contagieuse, votre disponibilité constante à partager la grande expérience scientifique que vous avez, font de vous un maître d'approche facile. Trouvez ici toute notre admiration ainsi que notre profond respect.

A notre maître et juge :

Docteur Massambou Sacko

Maître de Conférences en Santé Publique

Coordinateur du Programme National de Lutte contre le Paludisme

Chargé du cours de Santé Publique à la FMPOS

Nous sommes très affectés par la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Vos qualités d'homme de science n'échappent à personne et nous pensons que votre expérience et votre sagesse, vous permettront de juger ce modeste travail.

A notre maître et juge :

Docteur Ousmane Koïta

PhD en Parasitologie, Biologie Moléculaire

Chef du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de la Faculté des Sciences Techniques (FAST)

Nous sommes très honorés par votre présence dans ce jury.

Vos qualités humaines et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un maître respectable et admiré.

Nous vous prions cher maître, d'accepter nos remerciements.

**A notre maître et directeur de thèse :
Docteur Sékou Fantamady Traoré**

PhD en entomologie médicale

Chargé du cours de Biologie Cellulaire à la FMPOS

Nous avons admiré votre disponibilité, votre rigueur scientifique et vos qualités humaines.

Ce travail est le fruit de l'effort conjugué de toute une équipe de recherche à laquelle vous avez su inculquer l'esprit de compétitivité, puisse ce travail exprimer toute ma profonde reconnaissance.

A notre maître et co-directeur de thèse :

Docteur Guimogo Dolo,

PhD en Entomologie – Parasitologie Médicales

Chargé du cours de génétique à la FMPOS

Cher maître, vous nous avez fait un inestimable honneur en acceptant de co-diriger ce travail malgré vos multiples fonctions.

Votre sens du partage, votre courage, votre disponibilité constante et vos qualités sociales ont fait de vous un homme apprécié de tous. Soyez assuré de notre profond attachement et de notre entière confiance.

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADN : Acide Désoxyribonucléique
 AGD1 : amorce d'*Anopheles gambiae* diagnostic 1
 AGD2 : amorce d'*Anopheles gambiae* diagnostic 2
 AGD3 : amorce d'*Anopheles gambiae* diagnostic 3
 AGD4 : amorce d'*Anopheles gambiae* diagnostic 4
 An : *Anopheles*
 AR : Amorce d'*Anopheles arabiensis*
 B : Bamako
 Bp : Base paire
 CDS : Control of Communicable Diseases
 CMDT : Compagnie Malienne de Développement du Textile
 CPS : Cellule de Planification et de Statistique
 ddl : degrés de liberté (tests statistiques, X^2 de Pearson)
 DDT : Dichloro Diphényle Trichloracétique
 Dnase : Enzyme permettant la destruction de l'ADN
 DNTP : Di-Nucléotide Tris-Phosphate
 DNSI : Direction Nationale de la Statistique et de l'Informatique
 EDMS : Enquête Démographique et de la Santé Mali
 EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
 FOR : Amorce aller
 GA : Amorce d'*Anopheles gambiae s.s.*
 GIS : Geographical Informatic System
 HCl : Chlorure d'Hydrogène
 HR : Heure
 ISFRA : Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée
 Kbp ou Kb: Kilobase paires
 Kd : knock down
 kdr : knock down resistance
 kds : knock down sensibility
 LBMA : Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
 loc. cit. : loco citado (endroit cité)
 M : Mopti
 Mal : Malaria
 MgCl₂ : Chlorure de magnésium
 MII : Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide
 MIM : Multilateral initiative on Malaria
 ml : millilitre
 mM: Milli-mole
 mn : Minute
 MS : Ministère de la Santé
 NaCl : Chlorure de Sodium
 Nb exp : Nombre exposé
 Nb : Nombre
 Ng : Nanogramme
 °C : degré Celcius
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
 Pmol : Pico-mole
 PNLP : programme National de Lutte contre le Paludisme
 REV : Amorce retour
 RS : Remote Sensing

S : Savane

s.l. : Sensu lato (sens large)

s.s. : Sensu stricto (sens strict)

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

t/mn : tours par minute

TBE : Tris Borate EDTA

TDR : Tropical Diseases Research

TE : Tris EDTA

UN : Amorce universelle, commune à toutes les espèces du complexe *Anopheles*

UV : Ultra-Violet

μl : micro-litre

WHO/VBC : WORLD HEALTH ORGANISATION/VECTOR BIOLOGY AND CONTROL

SOMMAIRE

	Pages
1. INTRODUCTION	1
2. GENERALITES	6
2.1 Le paludisme	6
2.2 Les Anophèles	9
2.1.1 Systématique	9
2.1.2 Morphologie	9
2.1.3 Biologie	9
2.3 Lutte anti-vectorielle	12
2.3.1 Les méthodes de lutte non chimique	12
2.3.1.1 Lutte mécanique et modification de l'environnement.....	12

2.3.1.2 Lutte biologique	12
2.3.1.3 Lutte génétique	15
2.3.2 Les méthodes de lutte chimiques	16
2.3.2.1 Composés minéraux, dérivés du pétrole, lécithines.....	16
2.3.2.2 Composés Organochlorés	16
2.3.2.3 Composés Organophosphorés	17
2.3.2.4 Les Carbamates	19
2.3.2.5 Les synergistes	19
2.3.2.6 Les analogues d'hormones	19
2.3.2.7 Les insecticides végétaux : Pyrèthres et Pyréthri-noïdes....	20

2.4 La résistance des vecteurs aux insecticides

2.4.1 Définition de la résistance	24
2.4.2 Différents mécanismes de résistance	24
2.4.3 Résistance croisée DDT-Pyréthri-noïdes	25
2.4.4 Définition de la rémanence	25

3. OBJECTIFS

3.1 Objectif Général.....	26
3.2 Objectifs Spécifiques	26

4. MATERIELS ET METHODES

4.1 ZONES D'ETUDE	27
4.1.1 Zone inondée	27
4.1.1.1 Sélingué	27
4.1.1.2 Niono	28
4.1.2 Zone exondée	30
4.1.2.1 Pimpéréna	30
4.1.2.2 Banambani	31
4.2. TEST STANDARD DE SENSIBILITE DE L'OMS (WHO/VBC/81.806)	
4.2.1 Matériels	33
4.2.1.1 kit de bio essais de l'OMS	33
4.2.1.2 Echantillonnage des moustiques adultes	34
4.2.2 Conditions du test	34
4.2.3 Manipulation des éprouvettes	35

4.2.4 Procédure	35
4.3. ETUDE DE LA REMANENCE D'UN PYRETHRINOIDE SUR LES MOUSTIQUAIRES IMPREGNEES : LA PERMETHRINE	
4.3.1 Collecte des moustiquaires	37
4.3.2 Echantillonnage des moustiques adultes	37
4.3.3 Conditions du test	38
4.3.4 Procédure	38
4.4. DETERMINATION DE LA FREQUENCE DU GENE <i>KDR</i> DANS LA POPULATION VECTRICE	
4.4.1 Identification moléculaire des membres du complexe <i>An. gambiae</i>	
4.4.1.1 Identification des espèces	39
4.4.1.2 Identification des formes moléculaires	44
4.4.2 Caractérisation moléculaire du gène	46
4.5 DETERMINATION QUALITATIVE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DE GENES CONFLICTUELS IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE DES VECTEURS	
4.5.1 Définition du terme «gènes conflictuels»	49
4.5.2 Séquençage de l'ADN	50
4.5.2.1 Purification de l'ADN	50
4.5.2.2 Technique de séquençage de l'ADN	51
4.6. ANALYSE DES DONNEES	
4.6.1 Tests de sensibilité	53
4.6.2 Tests de rémanence	54
4.6.3 Détermination de la fréquence du gène <i>kdr</i>	54
4.6.4 Détermination qualitative des séquences nucléotidiques de gènes conflictuels	54
5 RESULTATS	
5.1 TESTS DE SENSIBILITÉ d'<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	
5.1.1 Zone inondée	56
5.1.2 Zone exondée	58
5.1.3 Analyse des tests de sensibilité	60
5.1.4 Temps de « knock down »	62
5.1.5 Mortalité d' <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	66
5.1.6 Test de sensibilité d' <i>Anopheles funestus</i>	67

5.2 TESTS DE REMANENCE DE LA PERMETHRINE SUR LES MOUSTIQUAIRES IMPREGNEES	70
--	----

5.3 DETERMINATION DE LA FREQUENCE DU GENE *KDR* DANS LA POPULATION VECTRICE

5.3.1 Composition de la population d' <i>An. gambiae s.l.</i>	71
5.3.2 Proportion de moustiques ayant survécu au test de sensibilité après 24 heures dans les différentes localités étudiées	73
5.3.3 Fréquence du gène <i>kdr</i>	76

5.4 DETERMINATION QUALITATIVE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DE GENES CONFLICTUELS IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE DES VECTEURS 78 |

6. DISCUSSIONS	79
-----------------------------	----

7. CONCLUSIONS	90
-----------------------------	----

8. RECOMMANDATIONS	92
---------------------------------	----

9. BIBLIOGRAPHIE	93
-------------------------------	----

10. ANNEXES

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire endémo-épidémique due à un protozoaire du genre *Plasmodium*. Il existe quatre espèces humaines : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale*. La transmission est assurée par des moustiques du genre *Anopheles*.

Le paludisme, aussi connu sous le nom de malaria est une maladie à laquelle sont exposées environ 2,4 milliards de personnes, soit 40% de la population mondiale (OMS, 1992). Il tue chaque année 1,5 à 2,7 millions de personnes, dont 1 million d'enfants de moins de 5 ans. Cette affection est une véritable préoccupation mondiale. Des cas de paludisme importés ont été observés dans des pays où l'on pensait avoir éradiqué le vecteur. En Europe, notamment en France, 2700 cas de paludisme, dont 76% à *P. falciparum*, ont été diagnostiqués en 1985. Le paludisme n'est donc pas seulement circonscrit en Afrique, surtout subsaharienne, où il représente la première cause de morbidité et de mortalité. En effet, 80 à 90% des 300 à 500 millions des cas annuels de paludisme dans le monde sont enregistrés en Afrique (OMS, 1996).

Plusieurs actions ont été entreprises pour contrôler cette grave maladie, mais, elle reste toujours aussi meurtrière. Suite à l'échec des campagnes d'éradication (OMS, 1955), l'OMS a proposé de nouvelles approches de lutte antipaludique à la conférence ministérielle d'Amsterdam (1992). Ces nouvelles stratégies sont axées sur quatre composantes techniques:

- le diagnostic précoce et le traitement rapide des cas de fièvre;
- la planification et la mise en œuvre de mesures de prévention sélectives et durables y compris la lutte antivectorielle;
- la détection précoce, l'endiguement ou la prévention des épidémies;

-le renforcement des capacités locales en matière de recherches fondamentale et appliquée pour permettre et favoriser une évaluation régulière de la situation du paludisme dans les différents pays.

En Afrique de l'ouest, deux principaux vecteurs transmettent l'espèce *Plasmodium falciparum*. Il s'agit d'*Anophèles gambiae s.l.* (Giles, 1902) et d'*An. funestus* (Giles, 1900) [in Gillies et De Mellon, 1968]. *Anopheles gambiae s.l.* comporte *An. arabiensis* et les trois formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s* nommées Mopti, Savane et Bamako (Touré et al., 1983).

Le Mali, est un pays d'endémie palustre. Le paludisme y est responsable de 13% de mortalité et de 15,6% de morbidité dans la population générale (Diani, 1985). Les enfants et les femmes enceintes constituent la principale cible de cette maladie. En effet, au Mali, 16 à 28% des enfants de 0 à 5 ans en meurent chaque année et 42% des femmes enceintes présentent des signes d'anémie (DEAP/1993).

Au Mali ainsi que sur le reste du continent africain, *P. falciparum* entraîne facilement la mort au cours d'un épisode aigu de paludisme. De plus, un accès palustre est responsable d'au moins trois jours d'arrêt de travail, lorsque cela est multiplié par le nombre de cas de paludisme par an, force est alors de constater l'importance de l'impact économique de cette maladie. Devant cette situation dramatique, le Mali, conformément à la déclaration d'Amsterdam (1992), dispose depuis 1993 d'un Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Ce PNLN ayant fait de la lutte antivectorielle son cheval de bataille, s'emploie à la vulgarisation des matériaux imprégnés d'insecticides (MII). Dans ce cadre, trois insecticides de la famille des pyréthrinoïdes furent retenus pour l'imprégnation des supports: la perméthrine, la deltaméthrine et la lambdacyhalothrine. Cependant, le Mali étant un pays agricole, les pesticides sont utilisés de façon intense dans les zones de culture du coton, du riz et du sorgho, contre les insectes ravageurs, punaises et acridiens (Telly, 1999). Ces mêmes insecticides sont également

utilisés en zones urbaine et rurale contre la nuisance des insectes. Cette utilisation importante et peu contrôlée des pesticides, pourrait être responsable de l'apparition d'une résistance des vecteurs aux insecticides préconisés dans la lutte contre le paludisme et compromettre de façon inquiétante l'alternative efficace de contrôle de cette grave maladie.

Depuis les années soixante, la résistance aux insecticides a été rapportée dans plusieurs régions d'Afrique (Akogbeto, 2001 et Diabaté et *al.*, 2001). Récemment, des études menées dans différentes régions d'Afrique ont indiqué que les plus hauts niveaux de résistance se trouvent chez les populations de moustiques d'Afrique occidentale et australe (Anonyme, 2001). En effet, il a été prouvé que la résistance aux pyréthrinoïdes pouvait atteindre 80 à 90% dans certaines parties de la Côte d'Ivoire, du Bénin et du Burkina Faso chez *Anopheles gambiae*, principal vecteur du paludisme. En Afrique du Sud, *Anopheles funestus*, métaboliquement résistant aux pyréthrinoïdes, est présumé avoir migré du Mozambique. En revanche, en Afrique orientale, la résistance aux insecticides reste encore faible. En 2001, à Harare au Zimbabwe, les scientifiques se sont penchés sur la résistance aux insecticides chez les vecteurs africains du paludisme lors d'un symposium. Vu la grande menace qu'implique la propagation de la résistance aux insecticides chez les populations de moustiques vecteurs, au moment où la résistance aux médicaments antipaludiques à travers l'ensemble du continent devient alarmante (Sinou, 2002), la politique de vulgarisation des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes se voit confrontée à un important défi à relever. Dans plusieurs pays, des tests de sensibilité ont été réalisés, notamment en Côte d'Ivoire (Elissa et *al.*, 1993), au Bénin (Akogbeto et *al.*, 1999), au Cameroun (Etang et *al.*, 2000). Des moustiques résistants à la perméthrine parmi les populations d'*Anophèle* d'un certain nombre de pays ont été découverts. Une réduction de la sensibilité à la perméthrine a été également signalée au Kenya (OMS, 1996). Au Mali, en 1995 et en 1998, des études menées dans le but de surveiller et de vérifier l'état de la sensibilité quelques

temps après l'utilisation des moustiquaires imprégnées, ont démontré qu'*An. gambiae* était sensible aux pyréthriinoïdes et au DDT (Coulibaly et *al.*, 1998).

Une moustiquaire imprégnée avec une dose trop forte d'insecticide entraînerait également une apparition rapide de résistance, pendant qu'une dose trop faible entraînerait quant à elle, une sous-estimation de l'efficacité et de la rémanence de l'insecticide sur le support. La perméthrine est parmi les pyréthriinoïdes préconisés par le PNLP, le plus utilisé pour l'imprégnation des moustiquaires. Par conséquent, l'évaluation de la résistance des moustiques à cet insecticide devrait nécessairement tenir compte de tous les facteurs inhérents à ce phénomène, notamment, les facteurs génétiques. En effet, plusieurs études ont prouvé l'implication du gène *kdr*, obtenu par mutation dans ce mécanisme de résistance (Guillet, 1995; Chandre et *al.*, 2000).

Cette étude, en plus de ré-évaluer la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides, se propose d'étudier les facteurs génétiques responsables de la résistance des vecteurs aux insecticides préconisés dans l'imprégnation des supports au Mali. En effet, il est nécessaire d'étudier l'aspect de la génétique moléculaire de la résistance afin de mieux orienter le PNLP dans le choix des insecticides contre les vecteurs. Par ailleurs, la problématique de la réutilisation du DDT se faisant de plus en plus pressante (Curtis, 1994 et Lebel, 2002), cette étude nous permettra de déterminer le niveau actuel de sensibilité des vecteurs à cet insecticide, qui a en commun avec les pyréthriinoïdes certains mécanismes de résistance.

GENERALITES

2. GENERALITES

2.1 LE PALUDISME

Le paludisme est une affection grave qui menace plus de 54% de la population du globe et tue en Afrique, un enfant toutes les 30 secondes (Razafimahefa, 2000).

Le paludisme est dû à 4 espèces différentes (*Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*) mais seul *P. falciparum* est responsable des formes encéphaliques potentiellement mortelles. Ces espèces sont transmises par la piqûre de la femelle de l'Anophèle, fortement anthropophile et hématophage.

Les parasites subissent un cycle asexué chez l'homme et un cycle sexué chez le moustique, qui est donc l'hôte définitif.

Au cours de la piqûre, un moustique injecte les formes infestantes (sporozoïtes), qui gagnent rapidement le foie, c'est la phase hépatique ou exo-érythrocytaire. Après une phase de multiplication, les parasites sont libérés dans la circulation sanguine et pénètrent dans les hématies (trophozoïtes et schizontes), c'est la phase érythrocytaire ou endo-érythrocytaire (figure 1).

La succession de cycles érythrocytaires provoque les accès fébriles concomitants à la libération d'antigènes et à une hémolyse.

Le Mali est un pays d'endémie palustre où les quatre formes humaines du *Plasmodium* ont été retrouvées (Koïta, 1989). Il existe cinq faciès épidémiologiques de transmission (Doumbo, 1992) :

- une zone de savane à transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois ;
- une zone de transmission saisonnière courte inférieure à 4 mois, correspondant à la zone du sahel;
- une zone de transmission sporadique, voire épidémique correspondant au Sahara;

- des zones de transmission bi ou plurimodale (c'est à dire deux ou plusieurs pics de transmission par an), comprenant le Delta Intérieur du fleuve Niger et les zones de barrages : Sélingué, Manantali et Markala;
- des zones peu propices à l'impaludation : les milieux urbains (Bamako).

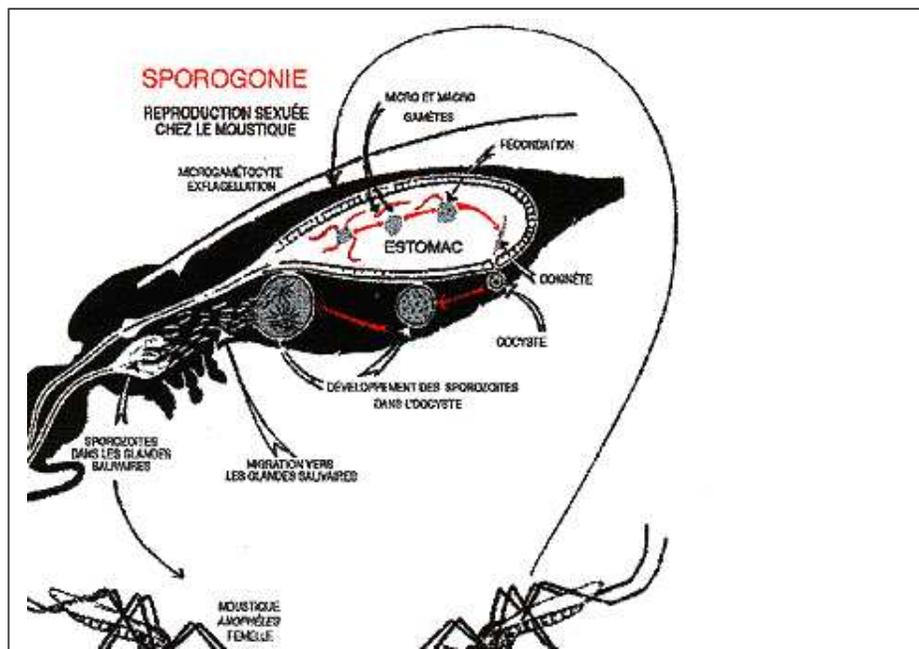


Figure 1 : Cycle du *Plasmodium falciparum*

<http://www.bondy.ird.fr/~fgaillar/fichiers/cycle.html>

2.2 LES ANOPHELES

2.2.1 Systématique

Les Anophèles sont des Diptères Nématocères appartenant à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles* (De Meillon, 1934).

2.2.2 Morphologie des Anophèles

Les imagos se posent obliquement au support, la trompe, dans l'axe du corps. Ils sont divisés en trois parties (figure 2) :

- la tête : qui porte deux yeux et deux palpes de même longueur que la trompe qui est aussi appelée proboscis.

- le thorax : comportant également trois parties, le prothorax, le mésothorax portant la paire d'ailes fonctionnelles et le métathorax qui porte les pattes postérieures.
- l'abdomen : constitué de dix segments, dont les 9^{ème} et 10^{ème} , peu visibles, représentent les segments génitaux.

An. funestus se distingue morphologiquement de *An. gambiae* par sa taille plus petite, sa couleur plus sombre.

2.2.3 Biologie

Les Anophèles pondent leurs œufs à la surface de l'eau. Ces œufs, munis de flotteurs remplis d'air éclosent généralement 24 à 36 heures après la ponte (Holstein, 1949).

La larve subit trois mues consécutives qui, par les modifications morphologiques qu'elles engendrent, la conduisent au 4^{ème} stade de larve adulte ou exovue larvo-nymphale.

La nymphe a l'aspect d'une virgule. Au bout de 24 à 48 heures, elle se transforme en moustique adulte ou imago qui émerge de l'eau.

Seules les femelles des moustiques sont hématophages, les mâles, quant à eux, sucent le suc des plantes.

L'accouplement a lieu juste après l'éclosion et les mâles fécondent les femelles qui prennent un ou plusieurs repas de sang (selon les espèces) et vont pondre dans les plus proches gîtes.

Après l'éclosion, il faut environ une semaine à 12 jours pour *An. gambiae* et 3 semaines pour *An. funestus*, pour effectuer la totalité du cycle : de l'œuf à l'imago.

Les Anophèles, moustiques sauvages à l'origine (Holstein, 1949), sont à l'heure actuelle, hautement anthropophiles. Ils peuvent demeurer dans les habitations où ils s'alimentent, jusqu'à la maturation de leurs œufs. Cependant, il arrive plus fréquemment que le moustique pénètre dans les

habitations au petit soir (18–20 heures), quittant ainsi son abri diurne (cases abandonnées, puits désaffectés, anfractuosités diverses, etc.).

Le pic de l'activité des Anophèles se situe après minuit (Holstein, 1949).



Figure 2 : La femelle de l'anophèle : *Anopheles gambiae s.l.*

Source : <http://www.cybersciences.com/cyber/3.0/N2963.asp>

2.3 LA LUTTE ANTI-VECTORIELLE

2.3.1 Les méthodes de lutte non chimiques

2.3.1.1 Lutte mécanique et modification de l'environnement :

Parmi les procédés les plus anciens, il y a l'assèchement des marais, la rectification de la salinité par ouverture des canaux ou, au contraire, construction des digues. Ces méthodes ont toutes pour but d'éviter la pullulation des moustiques. Cependant, si elles ne sont pas, au préalable, précédées d'études écologiques approfondies, elles risquent d'amener le remplacement d'une espèce par une autre tout aussi nocive. C'est par exemple, le cas de la suppression des gîtes des simuliés en amont des barrages qui favorise l'émergence des vecteurs comme ceux du paludisme, de la filariose de Bancroft et de la bilharziose.

Par contre, la destruction des récipients abandonnés, des vieux pneus, des plantes à feuilles engainantes, le renouvellement des eaux domestiques, l'obturation des creux d'arbres, se sont révélées très efficaces et furent longtemps employées avec succès, contre les *Aedes* domestiques et péridomestiques, en particulier *Aedes aegypti*.

2.3.1.2 Lutte biologique :

2.3.1.2.1 Lutte biologique par les insecticides d'origine bactérienne :

Certaines bactéries du genre *Bacillus* présentent une toxicité spécifique vis à vis de certains groupes d'insectes et notamment des larves de diptères nématocères. Ces bactéries sont des poisons d'ingestion. L'action est rapide et le produit se comporte comme un insecticide biochimique. Plusieurs toxines ont été isolées ; la principale est localisée dans une inclusion cristalline parasporale protéique qui se forme lors de la sporulation. Ce cristal renferme en fait une protoxine qui, une fois ingérée, est détruite par les protéases digestives de la larve de moustique en pH alcalin. L'endotoxine libérée provoque une hypertrophie rapide, puis une dégénérescence de l'épithélium du mésenteron, entraînant la mort de la larve.

Deux espèces bactériennes présentent cette propriété :

- *Bacillus thuringiensis* sérotype H14 (Tecknar®), anciennement dénommé *B. thuringiensis israelensis*. Elle est très active contre les

larves de simulies et d'*Aedes*, un peu moins active sur les larves d'*Anopheles*.

- *Bacillus sphaericus* souche 2297 (ou R4), synthétisé en cristal parasporal comparable à celui de *B. thuringiensis*. La souche 1593-4, plus anciennement connue est acristallogène. Ces souches sont particulièrement actives sur les larves de *Culex* et d'*Anopheles* et dans une moindre mesure, sur celles d'*Aedes*.

Ces bactéries ne semblent pas se reproduire dans le milieu naturel, toutefois, le recyclage n'est pas exclu pour *B. sphaericus*.

Elles sont dépourvues de toxicité pour les mammifères et la faune non-cible.

2.3.1.2.2 Lutte biologique par des parasites ou des agents pathogènes :

Des études sont en cours, mais elles n'ont pas encore dépassé le stade expérimental. En effet, l'OMS étant très stricte sur ce domaine, envisage un programme de développement par étapes des agents pathogènes en perfectionnant les formulations, en sélectionnant les souches les plus actives et en s'assurant de leur innocuité pour la faune aquatique avant que ces agents ne puissent être utilisés.

Cependant, les virus iridescents qui attaquent les larves de moustiques, les champignons *Metarhizium anisopliae* et les nématodes de la famille des Mermithides, parasites des insectes, présentent certaines bonnes perspectives. Leur handicap majeur reste le manque d'une méthode de production massive.

2.3.1.2.3 Lutte biologique par des prédateurs :

Plusieurs types de prédateurs ont déjà été utilisés. Le poisson larvivoire *Gambusia affinis* a été introduit en Europe, au Moyen orient, aux Etats-Unis pour lutter contre les moustiques. Son action est cependant limitée aux eaux permanentes.

En Afghanistan, il est très largement utilisé pour lutter contre les Anophèles dans les rizières. L'inconvénient majeur est qu'il est omnivore. En l'absence de larves de moustiques, il se nourrit des organismes non cibles.

Le guppy, *Lebistes reticulatus* supporte des eaux très polluées et a été recommandé pour contrôler *Culex fatigans* dans les drains en Extrême Orient et en Nouvelle Calédonie.

L'utilisation des prédateurs qui, à priori semble très séduisante, présente souvent de sérieuses difficultés. L'efficacité des poissons, par exemple, varie considérablement d'un milieu à l'autre et son évaluation réelle en terme épidémiologique n'a jamais été faite. Les effets adverses que peut provoquer l'introduction de nouvelles espèces sont difficiles à prévoir. C'est le cas des mollusques qui ne se limitent pas seulement à la destruction des hôtes intermédiaires de la bilharziose, mais qui s'attaquent également à nombre d'autres invertébrés et leur dissémination pourrait être suivie de désastres écologiques.

De même, bien que l'utilisation des poissons soit fortement encouragée comme un élément de la lutte intégrée contre les moustiques, elle ne reste pas sans limites. En effet, ils seraient de peu d'efficacité contre un vecteur comme *Anopheles gambiae* dont la plupart des gîtes sont très temporaires.

2.3.1.2.4 La lutte génétique :

Elle a pour but, de lutter contre les vecteurs par modification de leur patrimoine génétique ou par leur auto-destruction.

La stérilisation des mâles peut s'obtenir par plusieurs procédés. Il y a la méthode des radiations et aussi les composés chimiques : antimétaboliques (agents alkylants qui cassent les chromosomes), antimétaboliques.

L'introduction de translocations chromosomiques abaissant la fertilité a été tentée, mais malheureusement, sans beaucoup de succès, car les individus porteurs de translocation sont éliminés par la population normale, suite à la compétition naturelle.

Il a été envisagé de remplacer les souches locales de vecteurs par des souches inaptes à transmettre; cette manipulation génétique pose les mêmes problèmes que la substitution d'une espèce à une autre. Elle exige nécessairement des connaissances extrêmement poussées, non seulement dans le domaine de la génétique, mais aussi dans celui de l'écologie et de l'éthologie.

Vu ces difficultés entravant l'évolution de la lutte non chimique, il faudrait envisager et améliorer d'autres moyens existants, comme par exemple, la lutte chimique.

2.3.2 Les méthodes de lutte chimique :

2.3.2.1 Composés minéraux, dérivés du pétrole, lécithines :

Une gamme variée de produits existe :

- Le **vert de Paris** (acétoarséniate de cuivre, $\text{Cu} (\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Cu}_3 (\text{AsO}_2)_2$), très toxique, avec une DL_{50} per os (par voie orale) de 22 mg /kg de rat.
- Les **huiles minérales** : elles sont dérivées du pétrole et sont déversées sur les gîtes larvaires des moustiques, agissant à la fois mécaniquement, en empêchant la respiration des larves et chimiquement, en les intoxiquant. Un produit purifié et de même origine, le **Flit MLO®**, susceptible de contrôler les populations multirésistantes de moustiques fut récemment proposé aux Etats- Unis.
- Les **gels de Silice** : agissent comme abrasifs de l'épicuticule des insectes qui, privés de leur revêtement protecteur, se déshydratent et meurent.

- Les **lécithines liquides** : provoquent une forte mortalité des nymphes de moustiques, lorsqu'elles sont répandues à la surface des gîtes larvaires.

2.3.2.2 Les composés organochlorés :

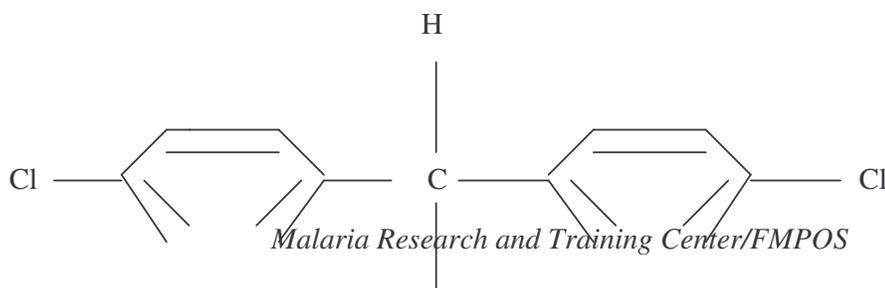
Plusieurs molécules de ce grand groupe existent déjà. Cependant, pour notre étude, nous nous sommes intéressés uniquement au DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane). Encore appelé Zeidane®, les propriétés insecticides du DDT ont été découvertes en 1939. Il est peu toxique (150 à 300 mg/kg de rat) et très stable. C'est un poison du nerf qui intervient dans la répartition des ions K^+ . Sous forme de concentré émulsifiable, il agit en milieu aquatique, en particulier sur les larves de diptères. Il a été le principal outil de la lutte antipaludique, en utilisation intradomiciliaire, sous forme de poudre mouillable. En poudre, il est utilisé contre les ectoparasites, poux et puces. C'est un bon insecticide du sol, en agriculture.

Toutefois, de nombreux arthropodes ont développé des résistances à son encontre, ce qui limite son emploi. De plus, sa remarquable stabilité lui a permis de s'accumuler et de se concentrer au sommet des chaînes alimentaires, provoquant ainsi, des accidents écologiques qui ont amené la limitation de son emploi, notamment, aux Etats-Unis et en Ex-U.R.S.S.. Cependant, pour beaucoup de pays en Afrique Australe, il reste un produit indispensable, surtout en agriculture . Sa formule chimique est représentée ci-dessous :

Formule du Dichloro Diphényle Trichloroéthane (Zeidane^R) :

(DI₅₀ = 150 – 300 mg

/ kg par voie orale chez le rat)





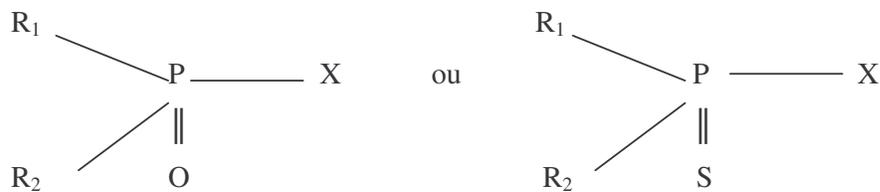
2.3.2.3 Les composés organophosphorés :

Ce sont des dérivés organiques de l'acide phosphorique ou l'acide thiophosphorique (où le S= remplace le O=). Ils furent synthétisés dès les années 1940 par des chimistes travaillant sur les gaz de combat et les premiers composés étaient très toxiques. Ce sont des inhibiteurs de la cholinestérase.

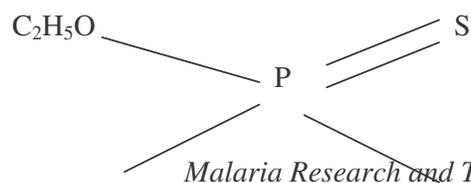
Le parathion : commercialisé dès 1945, il a une DL_{50} de 4 à 15 mg/kg de rat. Largement utilisé en agriculture, il est également employé, de même que son dérivé méthylé, comme larvicide, en particulier, aux Etats-Unis.

L'industrie a ensuite développé de très nombreuses molécules de haute qualité insecticide, certaines, de toxicité très faible, aussi bien pour les vertébrés homéothermes que pour les poissons. Le préjugé de forte toxicité, qui était associé aux premiers organophosphorés n'est plus justifié, avec les produits actuellement utilisés en Santé Publique, dont :

- Bromophos : $DL_{50} = 3000$ à 6000 mg/kg de rat
- Le Fenthion (Baytex®) = $DL_{50} = 200$ à 300 mg/kg de rat
- Le Temephos (Abate®) = $DL_{50} = 2000$ mg/kg de rat



Formules générales des Organophosphorés :





Formule du parathion

2.3.2.4 Les Carbamates :

Il existe une gamme très variée d'insecticides dérivés de ce groupe parmi lesquels, le Propoxur (Baygon®). Il est très efficace contre les insectes domestiques, en particulier les blattes, a également quelques fois remplacé le DDT dans la lutte antipaludique, notamment en Amérique centrale. Sa toxicité est faible (800 à 1000 mg/kg de rat). Il a le même mode d'action que les organophosphorés.

2.3.2.5 Les Synergistes :

Ce sont des produits qui n'ont pas d'activité létale par eux-même, mais qui, ajoutés à certains insecticides, augmentent leur activité, en bloquant les mécanismes de détoxification de l'arthropode.

Le **Butoxide de Pipéronyle** est le plus connu des composés de ce groupe, il est utilisé pour synergiser les Pyréthrines naturelles, les Allethrine et quelquefois, certains carbamates et organophosphorés.

2.3.2.6 Les analogues d'Hormones :

Ce sont les derniers-nés de la lutte chimique. Ce sont des analogues d'hormones d'insectes.

➤ Un **juvénoïde**, le **Méthoprène** (Altosid®), analogue de l'hormone juvénile, inhibe la nymphose. La larve meurt sans se nymphoser ou la nymphe meurt. Dans les cas les plus rares, l'adulte meurt au moment de l'émergence. Ce composé agit seulement pendant la période qui précède immédiatement la nymphose. Etant donné sa durée d'activité courte, son application pose des problèmes de périodicité.

➤ Le **Diflubenzuron** (Dimilin®) [(4 Fluorochlorophenyl) 3 (2,6 difluorobenzourée)] : c'est un ecdysoïde. Il inhibe la sclérification après les

mues et entraîne donc la mort de la larve. Il peut être appliqué à tous les stades de la vie larvaire.

2.3.2.7 Insecticides végétaux : Pyrèthre et Pyréthriinoïdes :

Les propriétés insecticides du Pyrèthre, extrait de la fleur de *Chrysanthemum cineræfolium*, sont connues depuis 2000 ans en Chine. Il est actuellement cultivé sur les hautes terres d'Afrique orientale, des Andes, de Nouvelle Guinée et au Japon. La poudre était jadis utilisée comme antiparasitaire, mais le produit commercialisé est l'extrait de pyrèthre ou mieux, ses composants actifs, les Pyréthrines. Ce sont des esters des acides chrysanthémiques et pyréthriques et des alcools, pyréthrolone et cinérolone.

➤ Les **Pyréthrines** ($DL_{50} = 420$ mg/kg de rat). Ils provoquent une modification de la perméabilité de la gaine nerveuse aux ions K^+ et Na^+ et perturbent l'équilibre entre ces deux ions. Ils sont peu stables, mais agissent très rapidement, produisant une immobilisation quasi immédiate de l'insecte connu sous le nom d'effet « knock down ». C'est la raison de leur emploi dans les bombes insecticides à usage domestique.

Cependant, ces produits naturels étant onéreux et de production limitée, ont été progressivement remplacés par des molécules synthétiques extrêmement actives, les **Pyréthriinoïdes**.

➤ **Les Pyréthriinoïdes** : les premières productions industrielles eurent lieu en 1950. Ces pyréthriinoïdes contenaient tous de l'acide chrysanthénique estérifié par des alcools.

Les composés de deuxième génération comportent tous le même alcool :

5 Benzyl 3 Furylméthylque, mais l'acide varie. La **Bioresméthrine** en est le représentant le plus connu.

Ces deux premières pyréthriinoïdes étaient très actives, mais peu stables à la lumière, donc dépourvues de rémanence. Tout comme les Pyréthrines, il était recommandé de synergiser leur action par adjonction de Butoxide de Pipéronyle.

En 1973, toute une série de molécules photostables a été synthétisée. Parmi celles-ci, la **Perméthrine** et surtout un composé bromé, la **Décaméthrine** (Decis®, K-Othrine®) sont très efficaces. Cette dernière, appelée **Deltaméthrine** depuis 1980, est le plus puissant insecticide actuellement connu et elle est dotée d'une grande rémanence.

La toxicité pour les mammifères, très faible pour la Bioalléthrine ($DL_{50} = 1030$ mg/kg de rat) et la Bioresméthrine ($DL_{50} = 8000$ mg/kg de rat), est moyenne pour la Deltaméthrine ($DL_{50} = 70$ à 140 mg/kg de rat).

Leur activité insecticide se caractérise alors par le ralentissement ou le blocage des canaux sodiques voltage-dépendants en induisant des décharges répétitives de potentiel d'action et perturbant ainsi, la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses (Guillet, 1999). Tous ces composés sont très toxiques pour les poissons, ce qui limite leur emploi en milieu aquatique.

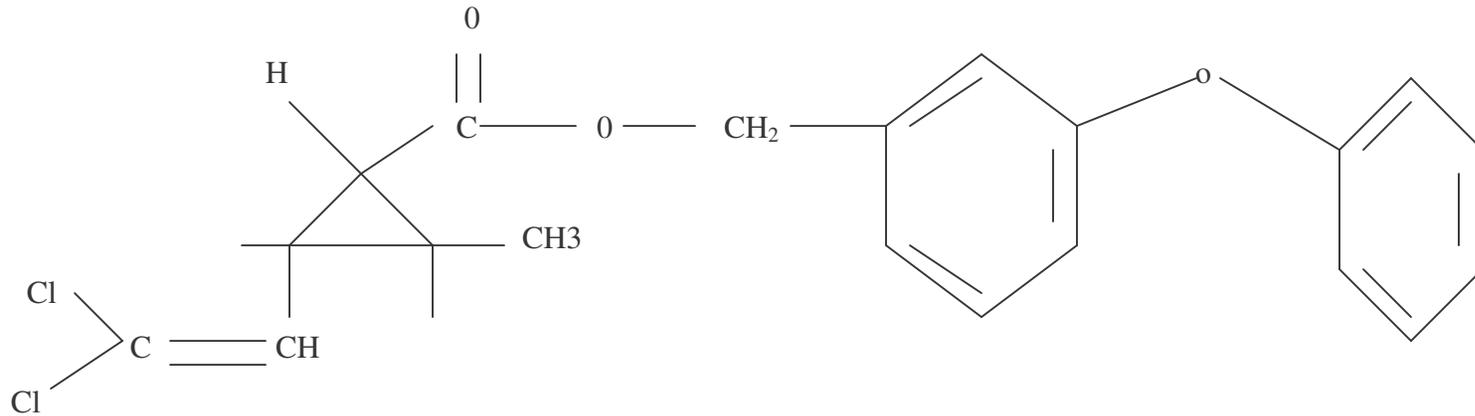
L'insecticide recommandé par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) est la Perméthrine dont la composition chimique est : *(3-phenoxyphenyl) methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-carboxylate*. C'est un Pyréthriinoïde de synthèse commercialisé sous des noms différents tels que Talcord, Permanone, Permettine, Atroban etc.. Contrairement aux deux autres, il est inodore, indélébile. C'est un insecticide répulsif et à action immédiate, il agit par contact et par ingestion. L'immersion, la pluie, la chaleur, le contact avec la peau humaine n'altèrent pas ses propriétés insecticides de façon immédiate.

La deltaméthrine est aussi un pyréthriinoïde de synthèse, commercialisé sous le nom de K-othrine. Elle agit par contact et par ingestion, c'est un insecticide répulsif et à action immédiate. La deltaméthrine est un insecticide puissant, elle est 20 fois plus puissante et environ 70 fois plus toxique pour les mammifères que la perméthrine. Son effet irritant pourrait limiter son emploi pour les traitements intradomiciliaires. Sa rémanence sur tulle synthétique est médiocre par rapport à la perméthrine (Harvay et

al.,1980). Sa rémanence sur les autres supports est plus élevée que celle de la perméthrine.

La lamdacyhalothrine, quant à elle, plus toxique que la perméthrine et la deltaméthrine, est le troisième choix du PNLP. Contrairement aux deux premiers, cet insecticide n'imprègne pas toutes les tulles synthétiques ; en plus, il possède une plus forte odeur et est plus toxique que la deltaméthrine.

La formule de la perméthrine : (Dl₅₀ = 4000 mg/kg par voie orale chez le rat)



(3-phenoxyphenyl) méthyle 3-(2,2-dichloroéthényl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylate

2.4 LA RESISTANCE DES VECTEURS AUX INSECTICIDES

2.4.1 Définition de la résistance :

La résistance peut être définie comme étant la capacité pour un organisme donné de survivre à des doses de produit toxique qui auraient dû normalement le tuer. Il s'agit d'un caractère héréditaire donc, sous la dépendance de gènes (Guillet, 1995).

2.4.2 Différents mécanismes de résistance :

Le mécanisme de résistance peut être basé soit sur des mutations du site cible ou soit sur un changement qualitatif et/ou quantitatif des enzymes de détoxification de l'insecticide. Il existe également une résistance due à un changement dans le comportement de l'insecte qui évite tout contact avec l'insecticide. Mais cette résistance comportementale est moins fréquente que les deux autres types de résistance cités précédemment.

La modification du site d'action concerne essentiellement trois cibles : les canaux sodium (pyréthrinoïdes et organochlorés), la cholinestérase (les organophosphorés et les carbamates), les récepteurs (GABA) de l'acide gamma-amino buturique (les cyclodiènes). Quant aux enzymes, il s'agit d'une augmentation soit du nombre soit de l'activité des transférases, principalement le glutathion-S-transférase (pyréthrinoïdes ,organochlorés et carbamates), des oxydases (pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamates) ou des estérases (Pyréthrinoïdes et organophosphorés).

Le mécanisme de résistance des moustiques aux pyréthrinoïdes est dû à une mutation au niveau des canaux sodiques voltage-dépendants en provenance des membranes nerveuses (Chandre, 2000). Cette mutation correspond à la substitution leucine-phénylalanine (chez les moustiques de l'Afrique de l'Ouest) ou leucine-sérine (chez ceux de l'Afrique Orientale). Ce mécanisme

est également responsable de l'allongement du temps de "knock down" ou temps nécessaire pour que l'effet de l'insecticide assomme le moustique. Il est par ailleurs, l'un de ceux, responsables de la résistance croisée des anophèles au DDT et aux pyréthriinoïdes et se caractérise par une diminution de l'affinité entre les canaux sodiques et les insecticides.

2.4.3 Résistance croisée DDT-Pyréthriinoïdes :

Chez de nombreux insectes, un seul mécanisme de résistance peut conférer une résistance envers plus d'un insecticide. Il s'agit de la résistance croisée. Le DDT et les pyréthriinoïdes ont le même mode d'action sur les canaux sodium des membranes nerveuses. De ce fait, un moustique qui développe une résistance aux pyréthriinoïdes par mutation au niveau des canaux sodium, sera par conséquent résistant au DDT et vis versa.

2.4.4 Définition de la rémanence :

La rémanence d'un produit est la période pendant laquelle ce produit reste actif. En ce qui nous concerne, la rémanence des insecticides sur les supports est la période durant laquelle l'insecticide reste efficace contre les moustiques.

OBJECTIVES

3. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE

1. OBJECTIF GENERAL :

Evaluer le niveau de sensibilité des vecteurs du paludisme au DDT et aux pyréthriinoïdes en étudiant la présence du gène mutant *kdr* au niveau de la population vectrice du Mali.

2. OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- Déterminer la sensibilité des moustiques au DDT et aux pyréthriinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires.
- Déterminer la rémanence de la perméthrine sur les moustiquaires imprégnées de perméthrine
- Comparer la fréquence du gène *kdr* chez les moustiques testés aux pyréthriinoïdes et au DDT.
- Déterminer qualitativement les séquences nucléotidiques impliquées dans la résistance ou la sensibilité des membres du complexe *Anophèles* chez les gènes conflictuels

METHODOLOGIE

4. MATERIELS ET METHODES

4.1 ZONES D'ETUDE

Le Mali est frontalier avec sept pays: l'Algérie au nord, la Côte d'Ivoire et la Guinée au sud, le Burkina Faso au sud-est, la Mauritanie et le Sénégal à l'ouest, enfin le Niger l'est. Le Mali est subdivisé en 7 régions (Kayes, Sikasso, Koulikoro, Ségou, Mopti, Tombouctou, et Kidal) et un District, celui de Bamako.

Le Mali a 1.241.248 km² de superficie pour une population de 10.472.782 habitants en 2001 (EDSM-III/DNSI, 2002). Pour cette étude, nous nous sommes intéressés à 4 localités (figure 3), où les populations utilisent des pesticides, surtout pour les cultures.

- Deux localités (Niono et Sélingué), où la riziculture est intense et les pesticides, utilisés de manière modérée (zone inondée).
- Une zone cotonnière (Pimpéréna), à forte utilisation de pesticides et une localité de culture de légumes et de tubercules (Banambani) où les pesticides sont faiblement utilisés (zone exondée).

4.1.1 ZONE INONDEE

4.1.1.1 Sélingué

L'étude a été menée dans la zone de riziculture intense de l'Office du Développement Rural de Sélingué, principalement à Sélinkényi et hameaux environnants. Ce site appartient à l'aire de santé de Binko, dans la zone

sanitaire de Sélingué qui en compte quatre parmi lesquelles Karangué, Siékorolé et Tagan.

Située à 140 Km au Sud Est de Bamako (figure 3), la zone sanitaire de Sélingué couvre une superficie de 4500 km² pour une population de 72 380 habitants, soit une densité de 16,08 habitants au km². Elle fait partie du cercle de Yanfolila (région de Sikasso), mais demeure toujours une structure autonome au plan sanitaire.

Du point de vue épidémiologique, la zone sanitaire de Sélingué se situe dans la savane nord-soudanienne avec une pluviométrie de 1300 à 1500 mm d'eau par an (EDS-III /DNSI, 2002).

Du fait de la riziculture irriguée, elle se caractérise par une transmission pluri-modale, avec un paludisme de type stable (Analyse de situation, zone sanitaire de Sélingué, Avril 1996).

La majorité de la population de la zone sanitaire de Sélingué est constituée par les Malinké et les Peuhl, aux côtés desquels, on rencontre les Bambara, les Bozo et les Dogon venant de la 5^{ème} région (Mopti) du pays.

L'Islam est la religion la plus répandue, pratiquée par près de 90 % de la population de la zone. On note cependant la subsistance de certaines croyances ancestrales.

4.1.1.2 Niono

La ville de Niono est située à 114 Km au Nord-est de la ville de Ségou et à 349 Km de la ville de Bamako (figure 3). C'est la capitale de l'un des sept cercles composant la région de Ségou, la quatrième région économique du

Mali. Le cercle couvre une superficie de 23.400 km². La population d'environ 263762 habitants a un taux d'accroissement moyen de 3,2% (DNSI, 2002).

Le cercle de Niono est limité au sud par le cercle de Macina, au Nord-Ouest par les cercles de Banamba et Nara et au sud-Est par le cercle de Niafouké et la République Islamique de Mauritanie.

Les points d'eau sont représentés par les canaux d'irrigation subdivisés en primaires « Sahel » et « Coste Ongoïba », secondaires, les vidanges, les mares temporaires, des lacs (Fala de Molodo) et les parcelles irriguées.

Ces points d'eau constituent de nombreux gîtes larvaires de moustiques pendant la saison des pluies et aux périodes de mise en eau des rizières.

Le climat est sahélien et les vents qui soufflent sont l'harmattan et la mousson. Il existe trois (3) saisons: une saison sèche chaude (mars-mai), une saison pluvieuse (juin-septembre) et une saison sèche froide (octobre-février). Les précipitations annuelles moyennes varient de 350 mm à 500 mm de pluie pour les 3 dernières années.

La végétation est fortement influencée par la présence permanente de l'eau dans la zone. Elle est réduite à une strate herbacée représentée par les plants de riz en période de culture et les Cypéracées (*Pycréus lancéolatus*) qui poussent le long des canaux d'irrigation.

La population est en majorité composée de groupes ethniques suivants : Minianka, Bambara, Maure, Sarakolé, Mossi, Peulh, Béla, Bozo et Sonrhäï. Il existe quelques Chrétiens et des Animistes, mais, l'Islam est la religion prédominante.

Pour notre étude, nous avons sélectionné le village de Nionokoroni, dans le secteur de Molodo, à 7 km de Niono, avec 599 habitants (DNSI, 2002). Ce village est inondé, c'est à dire, strié de canaux d'irrigation, ravitaillant en eau les rizicultures.

4.1.2 ZONE EXONDEE

4.1.2.1 Pimpéréna

Le cercle de Sikasso, situé au sud-est du Mali, couvre une superficie de 19 340 km², pour une population estimée à 524 947 habitants en 2000. Il comprend 42 communes rurales et une commune urbaine.

Le village de Pimpéréna fait partie de l'arrondissement central du cercle de Sikasso. Il est situé à 15 km, au nord de la ville de Sikasso, sur la route nationale N°11 (RN11) reliant Sikasso-Koutiala, dans la zone cotonnière de la CMDT (figure 3).

C'est un climat de type soudanien humide. Le climat est caractérisé par une pluviométrie abondante avec une précipitation annuelle de 1220 à 1312,4 mm d'eau. Il existe deux saisons :

- une saison sèche: de novembre à avril, composée elle aussi d'une saison sèche fraîche (novembre-fevrier) et d'une saison sèche chaude (mars-avril).
- une saison pluvieuse (avril-octobre)

Le village était peuplé d'environ 667 habitants (recensement 1993). Il comprend principalement des Sénoufo, des Bambara, des Peuhl, et des Dogon.

Les principales activités économiques sont l'agriculture et l'élevage. La culture du coton et du maïs constitue 60% des activités agricoles, le mil et le sorgho, 20%. Les populations utilisent les insecticides de manière très importante et ce faisant, créent une forte pression de sélection du gène *kdr*. En effet, depuis 1992, il semblerait que la fréquence de ce gène ait augmenté de façon exponentielle dans cette zone (*Unpublished*).

La transmission du paludisme y est essentiellement due aux membres du complexe *An. gambiae* : *An. gambiae s.s* (94.7%), dominé par la forme savane (89.16%) et *An. arabiensis* (5.3%). 83.8% des fièvres sont d'origine palustre (Traoré, 1993).

4.1.2.2 Banambani

Situé à 9 Km de Kati, Banambani est une zone rurale possédant un climat soudano-sahélien (figure 3). Ses coordonnées sont les suivantes : 12°48' latitude nord et 8°2' longitude ouest. La population était évaluée à environ 700 habitants en 1996 (Dolo, 1996).

Dans le lit des cours d'eau, la cuirasse latéritique est entaillée de marmites de géants qui constituent d'excellents gîtes larvaires pour *An. gambiae*.

Sa particularité réside dans le fait qu'en plus d'*An. funestus*, on y trouve *An. arabiensis* et toutes les formes chromosomiques de *An. gambiae s.s.* (Savane, Bamako et Mopti) vivant en condition de sympatrie.

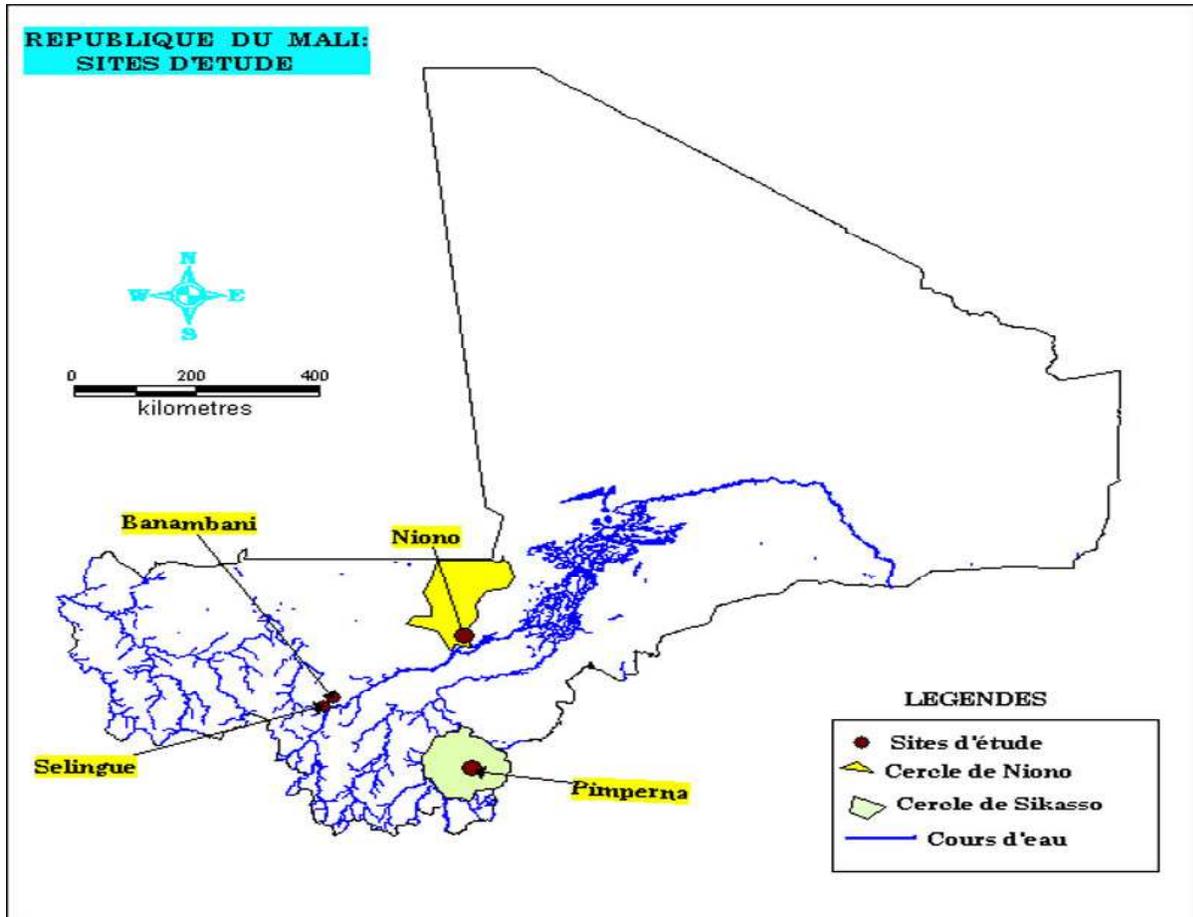


Figure 3: Carte du Mali avec les sites d'étude.

Source : GIS/RS du MRTC/FMPOS.

4.2 TEST STANDARD DE SENSIBILITE DE L'OMS (WHO/VBC/81.806)

4.2.1 Matériels

4.2.1.1 kit de bio-essais de l'OMS :

Les kits utilisés pour les tests de sensibilité comportaient chacun :

- ▶ des éprouvettes en plastique de 125 mm de longueur sur 44 mm de diamètre. Certaines de ces éprouvettes (marquées d'un point rouge) servent à exposer les moustiques à l'insecticide et d'autres, marquées d'un point vert servent d'éprouvettes d'attente pour le tri avant test et l'observation après test. Chaque éprouvette est fermée par un écran de maille 16.
- ▶ des plaques coulissantes, chacune munie d'un bouchon à vis sur les côtés et d'un trou de remplissage de 20 mm .
- ▶ des feuilles de papier propre (12 x 15 cm) pour tapisser les éprouvettes d'attente.
- ▶ des pinces à ressort (bracelets) en fil de fer pour maintenir les papiers sur les parois des éprouvettes.
- ▶ des pinces en acier pour les éprouvettes d'attente et de contrôle ; les pinces de cuivre doivent être utilisées pour les éprouvettes d'exposition aux insecticides.
- ▶ des éprouvettes d'aspiration en verre de 12 mm de diamètre interne, de 60 centimètres de longueur et munies d'un embout.
- ▶ un rouleau de bande plastique auto – adhésive.

Les moustiques qui ont servi pour les tests provenaient de la faune résiduelle du matin, capturés à l'intérieur des habitations à l'aide d'aspirateur à bouche.

Les tests sont réalisés avec les membres du complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*, principales espèces vectrices au Mali. Nous avons utilisé les femelles à tous les stades de réplétion (jeûn, gorgé, semi-gravides et gravides). Cependant, il faut noter que la majorité de nos moustiques étaient semi-gravides car les tests étaient réalisés dans l'après-midi, entre 16 et 18 heures.

4.2.1.2 Echantillonnage des moustiques adultes (*An. gambiae s.l.* et *An. funestus*) :

Ils sont issus de la faune résiduelle matinale à l'intérieur des habitations humaines. Ils ont été capturés à l'aide d'aspirateurs à bouche, de 8 heures à 11 heures du matin, afin de les laisser au repos le maximum de temps avant les tests. Par ailleurs, c'est à ce moment là que les maisons sont disponibles pour la capture des moustiques, leurs occupants les ayant libérées.

4.2.2 Conditions du test :

Les tests se sont déroulés à la température de 25⁰C à 32⁰C et à 70 - 80% d'Humidité Relative (HR). Après exposition, les moustiques femelles ont reçu une solution à 5% de sucre et ont été conservés pendant 24 heures à l'ombre dans des conditions ambiantes de température et d'humidité. 15 à 25 moustiques étaient utilisés par éprouvette, selon la densité anophelienne.

Les moustiques étaient retirés de leur cage à l'aide d'un aspirateur à bouche fourni avec le kit.

Une période d'observation d'environ une heure a été adoptée afin d'éliminer les moustiques traumatisés avant d'effectuer le test.

4.2.3 Manipulation des éprouvettes :

Les éprouvettes ont été maintenues en position verticale durant tout le test.

Après 5 minutes d'exposition, le nombre d'individus assommés au fond de l'éprouvette (vus à travers l'éprouvette) a été compté, puis le décompte de « knock down » initial a été effectué. Ensuite, systématiquement après 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minutes (juste avant le transfert dans l'éprouvette d'observation) avait lieu le décompte du knock down.

4.2.4 Procédure :

- Les moustiques femelles étaient retirées à l'aide de l'aspirateur pour les transférer doucement dans l'éprouvette d'attente (avec un point vert) par le côté de la plaque à travers l'ouverture prévue à cet effet.
- Au moins une heure de repos a été observée avant le test afin d'éliminer les spécimens traumatisés à la fin de la période d'attente.
- Une feuille de papier imprégnée a été enroulée en cylindre puis introduite dans l'éprouvette d'exposition (avec un point rouge), pour bien tapisser la paroi, nous l'avons maintenue en place avec une pince (en cuivre pour l'éprouvette qui contient le papier imprégné et en acier pour celle contenant le papier de contrôle). Pour les témoins, nous avons utilisé une feuille de papier blanc non imprégnée.
- L'éprouvette d'exposition a été insérée dans le bout à vis de la plaque. Puis nous avons aligné l'ouverture de la plaque avec celles de

l'éprouvette d'exposition et de l'éprouvette d'attente afin de faire passer les moustiques dans l'éprouvette d'exposition. Nous avons ensuite doucement soufflé les moustiques de l'éprouvette d'attente vers l'éprouvette d'exposition et enfin repoussé le levier de la plaque pour la refermer. Nous avons pour finir, détaché l'éprouvette d'attente pour la déposer de côté.

- A la fin de l'heure d'exposition, nous avons transféré les moustiques dans l'éprouvette d'attente en inversant la procédure précédente.
- Le décompte de la mortalité a été effectué après 24 heures. Les spécimens affectés, incapables de se mouvoir ont été considérés comme morts. Les résultats ont été enregistrés sur les formulaires fournis par l'OMS (annexe 1 et 2).
- Après 24 heures, les moustiques morts ont été individuellement conservés dans l'éthanol à 70%, au frais, séparément de ceux qui ont survécu. Plus tard, au laboratoire, pour arrêter l'effet de l'éthanol, ils ont été (vivants et morts) placés dans de l'eau stérile pendant 24 heures à 4°C avant d'entamer l'extraction de leur ADN. Les témoins ont été conservés dans les mêmes conditions que les moustiques testés, mais n'ont pas été traités au laboratoire. Ils ont été conservés pour des travaux ultérieurs.

4.3 TEST DE REMANENCE DE LA PERMETHRINE SUR LES MOUSTIQUAIRES IMPREGNEES

La résistance grandissante du *Plasmodium* aux antipaludéens semble saper tous les espoirs de vaincre le paludisme (Sinou, 1998). La situation est d'autant plus alarmante que la propagation de la résistance des moustiques

aux insecticides menace dangereusement l'alternative efficace de lutte contre le paludisme qu'est la moustiquaire imprégnée d'insecticide.

Vu cette situation dramatique, il nous a paru nécessaire d'observer dans quelle mesure cet état des moustiques (résistance probable) nuit à l'efficacité des moustiquaires imprégnées.

Le test de rémanence, qui estime l'efficacité du produit dans le temps, devrait nous permettre d'apporter une tentative de réponse à cette question. Deux tests ont été effectués dans la localité de Sélingué. Le premier test, appelé test d'efficacité a été réalisé en août 2001 puis le second, six mois plus tard, en février 2002.

4.3.1 Collecte des moustiquaires imprégnées de perméthrine

Nous avons effectué un choix aléatoire sur les moustiquaires imprégnées et distribuées à la population. Ces moustiquaires provenant d'un centre d'imprégnation de référence, ont été fournies par l'OMS. En pratique, nous avons choisi au hasard une moustiquaire dans chaque emballage pour constituer un échantillon qui nous a permis d'effectuer le test de contrôle d'efficacité. Pour le test de rémanence, nous avons utilisé les moustiquaires qui ont été testées pour le contrôle de l'efficacité 6 mois plus tôt. Elles ont été utilisées par une population mixte des milieux rural et urbain avec des comportements différents. Ce mixage d'utilisateurs pourrait être un facteur déterminant sur les résultats concernant la rémanence six mois après utilisation.

4.3.2 Echantillonnage des moustiques adultes

Les anophèles ont été capturés dans différents endroits sur le périmètre irrigué de Sélingué. Les moustiques de la faune résiduelle matinale des habitations humaines ont été collectés par la technique de l'aspirateur à bouche du type Mario Coluzzi.

4.3.3 Conditions du test

L'échantillon collecté le matin, était trié et gardé dans des pots de capture recouverts d'une serpillière humide, à l'ombre pendant environ 2 à 3 heures, afin que les moustiques se reposent avant le test d'efficacité/rémanence.

4.3.4 Procédure

Le test d'efficacité a été effectué en suivant exactement la même procédure que le test de rémanence. La seule différence entre les deux tests est que dans le cas du test d'efficacité, les moustiquaires sont neuves et non encore utilisées par la population.

Pour le test de rémanence nous avons suivi les étapes suivantes :

- Un nœud a été d'abord formé sur les moustiquaires imprégnées sélectionnées, de manière à avoir une poche dans laquelle nous avons introduit, à l'aide d'un aspirateur à bouche, 25 anophèles femelles et cinquante par lot.
- Les moustiques ont été maintenus dans la moustiquaire imprégnée de perméthrine pendant 3 minutes. Ils ont été ensuite retirés pour les replacer

dans des pots de capture afin d'observer l'effet « knock down ». Celui-ci a été relevé et compté à 10, 30, 60 minutes puis à 24 heures après le retrait.

- Les moustiques ont enfin été gardés dans un pot de capture et nourris avec du coton imbibé de jus sucré à 5 % pendant 24 heures et à la température ambiante.

Une moustiquaire non imprégnée et neuve a été choisie comme moustiquaire témoin.

4.4. ETUDE MOLECULAIRE DE LA POPULATION VECTRICE

4.4.1 Identification moléculaire des membres du complexe *An. gambiae* :

4.4.1.1 Identification des espèces *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* (Scott et al., 1993) :

4.4.1.1.1 Extraction de l'ADN :

Chaque moustique a été placé dans un tube eppendorf type 1,5ml contenant 25µl de la solution tampon (flygrinding buffer). Le stock de 500 ml de ce produit contenait :

- 0.08 M NaCl
- 0.16 M Sucrose
- 0.06 M EDTA
- 25 ml de 0.5 X SDS
- Eau déionisée.

A l'aide d'un pilon stérilisé, le moustique a été écrasé et ensuite rincé avec 25 autres microlitres de la solution tampon, puis le schéma suivant a été suivi :

- Le tube a été placé au bain-marie à 65 °C pendant 30 mn pour inhiber l'activité des enzymes pouvant détruire l'ADN.
- Nous y avons ensuite ajouté 7 µl d'acétate de potassium (pH 7.4). Le tube a été mis au frais (4°C) au réfrigérateur pendant 30 mn. Cette étape permet de précipiter les protéines.
- Après les 30 mn au frais, nous avons centrifugé le mélange à 14000t/mn pendant 15 mn pour obtenir uniquement l'ADN surnageant.
- Le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube eppendorf contenant déjà 100 µl d'éthanol à 100%. Après avoir bien mélangé, nous avons laissé agir l'éthanol, à la température ambiante pendant 5 mn. L'ajout de l'alcool a pour but de précipiter l'ADN au fond du tube.
- Pour obtenir un culot d'ADN, nous avons centrifugé la suspension à 14000t/mn pendant 15 mn pour ensuite verser l'éthanol à 100% et ajouter à nouveau 100 µl d'éthanol à 70% frais pour laver l'ADN.
- Le tube a été de nouveau placé dans la centrifugeuse, à 14000t/mn, mais cette fois-ci pendant 5 mn, puis l'éthanol 70% a été versé et enfin le culot d'ADN a été séché à la température ambiante.
- L'ADN a été suspendu avec 50 µl d'eau stérile et gardé à -20 °C jusqu'à utilisation.

4.4.1.1.2 Paramètres d'amplification de l'ADN :

Nous avons amplifié nos échantillons par la PCR en prenant 12 µl du volume réactionnel (13.013 µl) selon les concentrations des réactifs comme indiqué ci-dessous :

Tableau I: Concentration des réactifs nécessaires à l'identification des espèces *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*

REACTIFS	Concentration initiale	Concentration finale
PCR Buffer (tampon)	10 X	1 X
DNTP	10 mM	0,2 mM
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
Amorce GA	20 ng/µl	0,4 ng/µl
amorce AR	20 ng/µl	0,4 ng/µl
amorce UN	20 ng/µl	0,4 ng/µl
Taq polymerase	5 U/µl	1 U/µl

Cycle d'amplification :

- Dénaturation : 94 °C pendant 30 secondes
 - Appariement : 50 °C pendant 30 secondes
 - Extension : 72 °C pendant 30 secondes
- } Ce cycle est répété 30 fois.

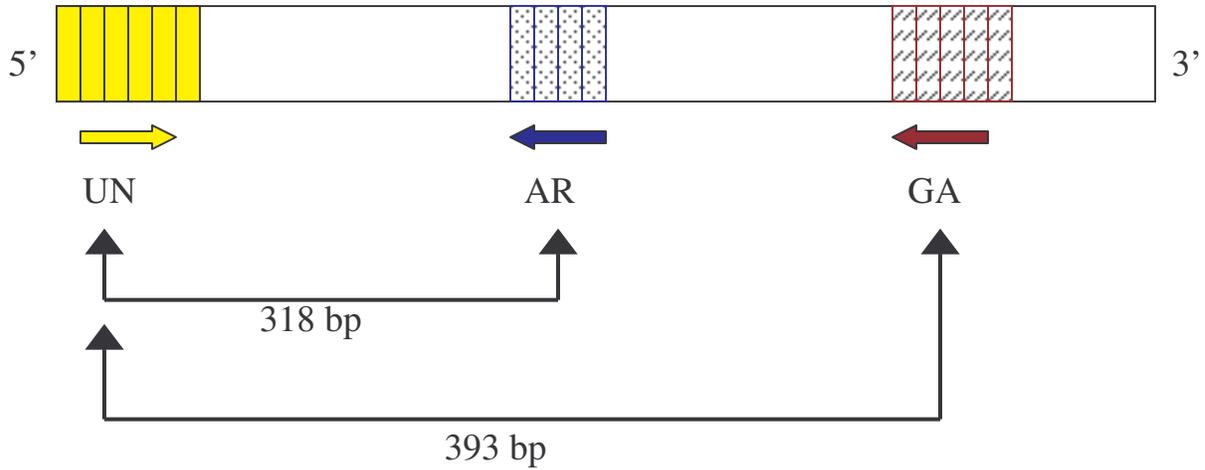


Figure 4 : Place des amorces sur le gène Intergenic Spacer (IGS) de l'ADN ribosomal (ADNr)

Légende :

➡ **UN :** amorce universelle pouvant amplifier la partie IGS du complexe

➡ **AR :** amorce spécifique à *Anopheles arabiensis* (318 bp)

➡ **GA :** amorce spécifique à *Anopheles gambiae s.l.* (393 bp)

Tableau II : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées dans l'identification des espèces d'*An. gambiae s.l.*

Amorces	Séquences des amorces
UN	5-GTGTGCCCTTCCTCGATGTG-3'
AR	5'-GTGTGCCCTTCCTCGATGTG-3'
	5'-TGGTATGGAGCGGGACACGTA- 3'

GA	5'-GTGTGCCCCTTCCTCGATGTG- 3' 5'-GACCGTGCGGACCACACCAG- 3'
----	---

4.4.1.1.3 Electrophorèse de l'ADN :

➤ Préparation du gel :

- Pour avoir un gel à 2% d'agarose, nous avons dilué 2 g d'agarose dans 100 ml de TBE 0,5 X que nous avons placé au four à micro-ondes pendant 2 mn;
- Nous y avons ajouté 5µl de bromure d'éthidium 10 mg/ml pour obtenir une concentration de 0.5 mg/ml dans le gel d'agarose.
- Puis nous avons coulé le gel dans le moule portant les peignes en prenant soin de bien dégager les bulles d'air.
- Nous avons ensuite attendu que le gel se polymérise avant de le transférer dans le bac contenant le tampon TBE à 0,5 X comme électrolyte.
- Afin d'apercevoir les traces d'ADN, nous avons mélangé les 12 µl de l'ADN amplifié à une goutte de colorant, le Bleu de Bromotymol, avant de loger dans les puits du gel;
- La migration a été conduite sous un courant de 150 volts pendant 1 heure, à l'aide d'un générateur "Electrophoresis Power Supply – EPS 301" (Amersham Pharmacia Biotech).
- Après la migration, les bandes ont été visualisées à l'aide d'une boîte à UV et ensuite photographiées par une camera Quick Shooter (IBI, Model QSP/ HOOD #14, Catalog No. 46420).

- La taille des produits amplifiés a été estimée grâce à la présence des standards ayant des bandes de poids moléculaires connus (100 bp DNA Ladder, Invitrogen Ready-Load™, Cat. No. 10380-012).

L'interprétation consiste à identifier les espèces en fonction des niveaux de migration des bandes : 393 pb pour *An. gambiae s.s.* et 318 pb pour *An. arabiensis*.

4.4.1.2 Identification des formes moléculaires de *An. gambiae s.s.* (Favia et al., 2001) :

Les extraits d'ADN sont ceux obtenus depuis la réaction d'identification des espèces de *An. gambiae s.s.*

4.4.1.2.1 Paramètres d'amplification de l'ADN :

Nous avons amplifié nos échantillons par la PCR en prenant 24 µl du volume réactionnel (24 µl) selon les concentrations des réactifs comme indiqué ci-dessous :

Tableau III : Concentration des différents réactifs nécessaires à l'identification des formes moléculaires de l'espèce *An. gambiae s.s.*

REACTIFS	Concentration initiale	Concentration finale
PCR Buffer	10 X	1 X
DNTP	50 mM	2 mM
MgCl ₂	10 mM	1.5 mM
For	100 µM/µl	2 µM/µl
Rev	100 µM/µl	2 µM/µl
Amorce Mopti	100 µM/µl	1.6 µM/µl
amorce Bamako/Savane	100 µM/µl	1 µM/µl
Taq polymerase	5 U/µl	0.05 U/µl

Cycle d'amplification :

- 94 °C pendant 10 minutes
 - Dénaturation : 94 °C pendant 30 secondes
 - Appariement : 65 °C pendant 30 secondes
 - Extension : 72 °C pendant 30 secondes
- } 24 cycles (à partir de l'étape 2)
- 72 °C pendant 7 minutes
 - Conservation à 4 °C

Tableau IV : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'identification des formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.*

Amorces	Séquences des amorces
For (allée)	5'-GCCAATCCGAGCTGATAGCGC-3'
Rev (retour)	5'-CGAATTCTAGGGAGCTCCAG- 3'
Mopti	5'-GCCCCTTCCTCGATGGCAT-3'
B/S	5'-ACCAAGATGGTTCGTTGC- 3'

4.4.1.2.2 Electrophorèse de l'ADN :

La même technique a été appliquée au chapitre 4.4.1.1.3.

4.4.2 Caractérisation moléculaire du gène *kdr* (Martinez-Torres et al., 1998)

4.4.2.1 Paramètres d'amplification de l'ADN :

Nous avons amplifié nos échantillons par la PCR en prenant 12 μ l du volume réactionnel (49 μ l) selon les concentrations des réactifs comme indiqué ci-dessous

Tableau V : Concentration des réactifs nécessaires à la caractérisation du gène *kdr*

REACTIFS	Concentration initiale	Concentration finale
PCR Buffer	10 X	1 X
DNTP	10 mM	0,2 mM
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
amorce Ag D1	100 μ M/ μ l	0,4 μ M/ μ l
amorce Ag D2	100 μ M/ μ l	0,4 μ M/ μ l
amorce Ag D3	100 μ M/ μ l	0,5 μ M/ μ l
amorce Ag D4	100 μ M/ μ l	0,5 μ M/ μ l
Taq polymerase	5 U/ μ l	0.02 U/ μ l

Cycle d'amplification :

- 95°C pendant 5 minutes
 - 94°C pendant 1 minute
 - 48°C pendant 1 minutes
 - 72°C pendant 2 minutes
 - 72°C pendant 10 minutes
- } 39 cycles (à partir de l'étape 2).

- 4°C température de conservation des amplifiats.

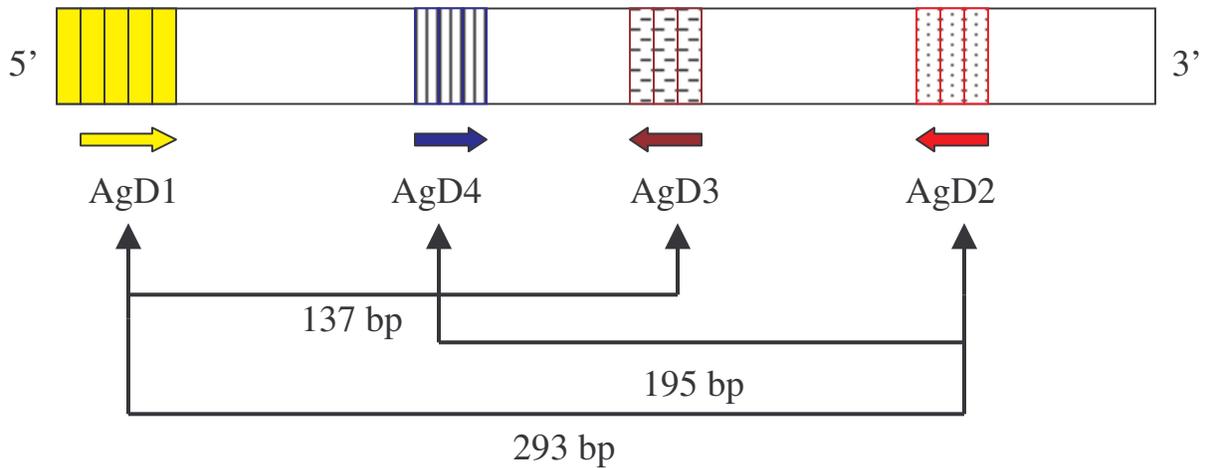


Figure 5 : Place des amorces sur le gène Intergenic Spacer (IGS) de l'ADN ribosomal (ADNr)

Légende :

-  AgD1 : amorce d'*An. gambiae* diagnostic 1
-  AgD2 : amorce d'*An. gambiae* diagnostic 2
-  AgD3 : amorce d'*An. gambiae* diagnostic 3
-  AgD4 : amorce d'*An. gambiae* diagnostic 4

Le diagnostic par PCR de la résistance *kdr*, se fait avec quatre amorces AgD1, AgD2, AgD3 et AgD4.

Les amorces AgD1 et AgD2 flanquent le gène de mutation *kdr*, en amplifiant un produit de 293 bp comme contrôle. AgD3 s'apparie seulement avec l'allèle de résistance du gène *kdr*, en association avec Agd1 pour amplifier à un fragment de 195 bp.

L'amorce AgD4 s'associe uniquement avec l'allèle *kdr* susceptible, avec le concours de AgD2, en amplifiant ce fragment 137 bp.

Tableau VI : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'identification de l'allèle résistant *kdr*

Amorces	Séquences des amorces
AgD1	5'-ATAGATTCCCCGACCATG-3'
	5'-AGACAAGGATGATGAACC-3'
AgD3	5'-AATTTGCATTACTTACGACA-3'
AgD4	5'-CTGTAGTGATAGGAAATTTA-3'

4.4.2.2 Electrophorèse de l'ADN :

La même technique a été appliquée au chapitre 4.4.1.1.3.

Après la migration, les allèles sont déterminés par la taille de leurs bandes et en fonction de celle du marqueur (100 bp DNA Ladder, Invitrogen Ready-Load™, Cat. No. 10380-012).

Interprétation :

Elle se fait en fonction de la présence du contrôle 293 bp et de l'un des deux allèles qui sont : résistant (*kdr*) avec 195 bp ou sensible (*kds*) 137 bp.

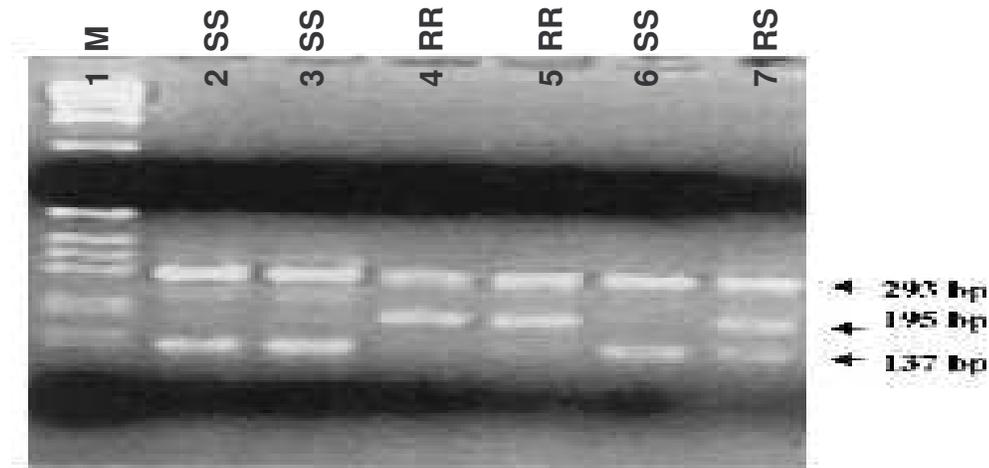


Figure 6 : Gel de diagnostic du gène *kdr* [Martinez-Torres et al. (1998)]

Légende : - Puits 1 : Marqueur de taille 1 kb ladder (M)

- Puits 2 et 3 : Individus sensibles à la perméthrine (SS)
- Puits 4 et 5 : Individus résistants à la perméthrine (RR)
- Puits 6 et 7 : Génération F2 issue de croisement entre SS et RR
- Puits 6 : Individu homozygote sensible (SS)
- Puits 7 : Individu hétérozygote sensible (SR)

4.5 DETERMINATION QUALITATIVE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DE GENE CONFLICTUELS IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE DES VECTEURS

4.5.1 Définition du terme « gènes conflictuels » :

Les gènes litigieux sont ceux des moustiques qui se révéleront phénotypiquement résistants mais qui seront génotypiquement sensibles lors du test de diagnostic du *kdr*.

4.5.2 Séquençage de l'ADN des gènes conflictuels

4.5.2.1 Purification de l'ADN

Nous avons utilisé le kit QIAREX II (QIAGEN) pour purifier les ADN des moustiques résistants et sensibles.

La procédure de purification que nous avons suivie est la suivante :

- Après migration de l'ADN sur gel d'agarose et sous U.V., nous avons finement découpé la bande contenant l'ADN.
- Le fragment d'agarose contenant l'ADN a été pesé puis placé dans un tube eppendorf incolore.
- Nous avons dilué le gel d'agarose à l'aide du réactif Buffer QX1 (1 volume de gel, soit 100mg pour 3 volumes de réactif). Cette étape a pour but de libérer l'ADN de l'agarose.
- Nous avons ajouté à la solution précédente, 30 μ du réactif QIAEX II après l'avoir vortexé pour resuspendre les particules de silice. Le nouveau mélange a été incubé à 50 °C pendant 10mn tout en l'agitant toutes les 2mn. La coloration fut observée afin de déceler tout changement de couleur de la solution, qui doit rester jaune. Cette étape a pour but d'adhérer l'ADN aux particules de silice en suspension dans la solution.
- Après centrifugation à 12000 tr/mn et pendant 1mn, nous avons versé le surnageant et le culot a été lavé avec 500 μ l de Buffer QX1. Ceci permet d'éliminer les restes d'agarose de la solution.
- Le surnageant a été versé et le culot, lavé deux fois de suite avec le réactif Buffer PE puis la solution a été centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment. Ceci a pour but d'éliminer les restes de sels (présents dans le Buffer QX1). Le culot a été ensuite séché à l'air libre.

- Pour avoir l'ADN pur, nous avons ajouté au culot obtenu, 20 µl de la solution de TE (10mM de Tris-Cl, 1mM EDTA, pH=8.0). Après avoir vortexé le mélange pour resuspendre le culot, il a été incubé à 50°C pendant 5mn.
- La solution obtenue a été ensuite centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment et le surnageant, contenant l'ADN pur a été transféré avec précaution dans un nouveau tube stérile.

4.5.2.2 Technique de séquençage de l'ADN

Le séquençage des fragments purifiés a été réalisé grâce à un séquenceur automatique (ABI Prism 377, Perkin Elmer), au Tulane Cancer Center, Tulane University, New Orleans, LA.

Le principe général est celui des di-désoxynucléotides décrit par Sanger et *al.* (1977). La technique dite "dye terminator" a été réalisée sur les échantillons purifiés. La technique "dye primer" a été effectuée sur l'échantillon cloné. Dans cette technique "dye primer", le brin complémentaire de l'ADN a été synthétisé par la Taq polymérase Fluorescent Sequencing (FS). Les oligonucléotides utilisés comme amorce ont été séparés en quatre fractions qui ont été traitées parallèlement. Dans chacune d'elles l'oligonucléotide est marqué à son extrémité 5' par un fluorochrome de couleur différente (fluorescéine, NBD, rouge Texas, et tétraméthylrodhaminutese). A chacune de ces fractions ont été ajoutés des désoxyribonucléosides ainsi qu'un di-désoxynucléoside triphosphate (A, C, T, ou G) en très faible concentration. Ces di-désoxynucléosides ne possèdent pas de 3' hydroxyle, et lorsqu'ils sont incorporés l'élongation s'arrête. Ce

nucléotide étant en très faible concentration, il n'a été incorporé que rarement et l'incorporation s'est faite au hasard. A chaque di-désoxynucléotide incorporé, la synthèse du fragment s'arrête. Les quatre incubations ont été ensuite mélangées et déposées sur un gel de séquence. Chaque bande observée aura la couleur de l'oligonucléotide qui a servi d'amorce à la synthèse du fragment correspondant.

L'électrophorèse a été effectuée en continu, la couleur de chaque bande a été détectée lorsqu'elle passe dans le faisceau d'un photomètre à laser disposé en bas du gel. L'analyse par ordinateur des signaux recueillis par le photomètre permet d'établir la séquence avec une grande précision.

Le séquençage a été réalisé sur les deux brins de chaque échantillon (sens 5'-3' et 3'-5'), ce qui nous a permis de confirmer les séquences et de lever les incertitudes.

4.6. SAISIE ET ANALYSE DES DONNEES

4.6.1 Tests de susceptibilité effectués dans les trois zones étudiées

Des tests de bio-essais ont été réalisés avec le kit de test standard de l’OMS. Les données ont été recueillies sur les formulaires de rapport contenus dans le kit de test standard de l’OMS (annexe 1 et 2).

Chaque fois que la mortalité des témoins était supérieure à 5%, la loi des probabilités indépendantes (formule d’Abbott) a été utilisée pour corriger la mortalité observée:

Formule d’Abbott :

$$\% \text{Mortalité corrigée} = (\% \text{Mortalité observée} - \% \text{Mortalité Témoin}) \div (100 - \% \text{Mortalité Témoin}) \times 100$$

Les recommandations de l’OMS (OMS, 1998) quant à l’interprétation des résultats sont les suivantes :

- 98-100% de Mortalité : **Sensible**
- 80-97% de Mortalité : **Résistance possible à confirmer**
- < 80% de Mortalité : **Résistance probable**

Cependant, nous avons pris 80% comme seuil de résistance : lorsque le taux de mortalité est inférieur à 80%, il y a résistance et la sensibilité est définie quand ce taux est supérieur à 80%.

La comparaison des taux de mortalité entre les différentes localités étudiées et au sein des différentes zones a été faite par le test de Khi-carré (X^2) de Person. Cependant, les normes de l’OMS nous ont permis de préciser le statut de susceptibilité des moustiques aux insecticides lorsque le test de Khi-carré ne prouvait pas de différence statistique entre les taux de mortalité.

Le temps de «knock down» (KDT) ou effet choc est le temps théorique après lequel un moustique exposé à une dose ou concentration déterminée est assommé. Ainsi, le KDT_{50} et le KDT_{90} sont respectivement, les temps théoriques où 50% et 90 % des moustiques exposés à une concentration fixe d'insecticide, sont assommés.

4.6.2 Test de rémanence

Les données ont été saisies sur le logiciel EXCEL 2000 version 9.0. La comparaison entre les taux de mortalité a été faite par le test de Khi-carré (X^2).

L'interprétation des résultats se fait en fonction du taux de mortalité. En effet, si la mortalité des moustiques testés est inférieure à 70%, alors le matériel il n'est plus efficace et devra être réimprégné (Traoré, 1990).

4.6.3 Détermination de la fréquence du gène *kdr* dans la population vectrice

Les données ont été reportées d'abord, sur des fiches (annexe 3) et saisies ensuite, sur le logiciel SPSS version 10.0.

4.6.4 Détermination qualitative des séquences nucléotidiques de gènes conflictuels impliqués dans la résistance des vecteurs

Les moustiques sélectionnés étaient ceux qui se sont révélés phénotypiquement résistants (vivants après 24 heures) et génotypiquement sensibles (sensibles au test de diagnostic du *kdr* à la PCR).

Les séquences ont été alignées grâce au logiciel Fasta Program du Genetic Computer Group (GCG). Les séquences de gène *kdr* provenant des

différentes localités (Sélingué, Pimpéréna et Banambani) ont été comparées entre-elles, puis avec celles obtenues à partir du genbank.

Toutes ces séquences ont été comparées deux à deux au niveau de chaque position. La somme des différences entre deux séquences a été rapportée au nombre total de bases de la séquence et transformée en distance. L'ensemble des données a été regroupé dans une matrice de différences puis restitué sous forme d'une figure arborescente (arbre de distances) à l'aide de la méthode de neighbor-joining. La solidité des branches de l'arbre consensus a été confirmée par une procédure de Bootstrap.

RESULTATS

5. RESULTATS

5.1 TESTS DE SUSCEPTIBILITE D'*Anopheles gambiae s.l.*

5.1.1 ZONE INONDEE

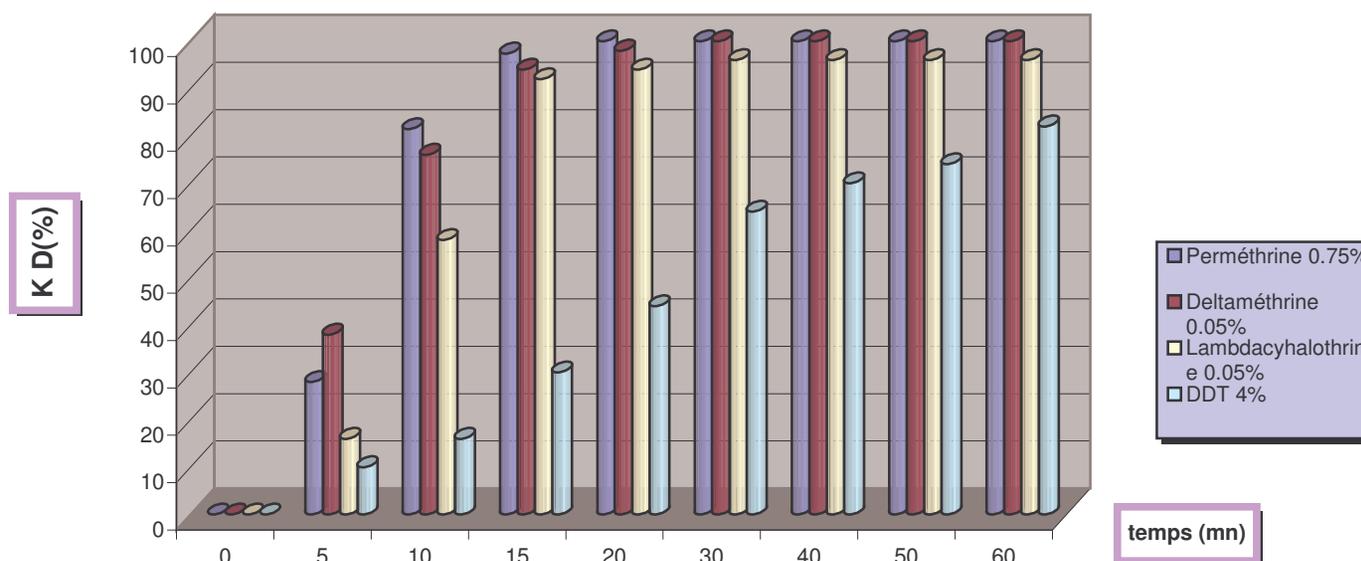


Figure 7 : Susceptibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides à Niono en mai 2002

A Niono, les KD_{50} de toutes les pyréthrinoïdes ont été rapidement obtenus avant la 10^{ème} mn (figure 7). En revanche, celui du DDT a été obtenu plus tardivement, avant la 30^{ème} mn et son KD_{90} n'a pas pu être observé du fait de la faiblesse des taux de mortalité obtenus avec cet insecticide. Avec toutes les pyréthrinoïdes, le KD_{90} a été obtenu avant la 15^{ème} mn.

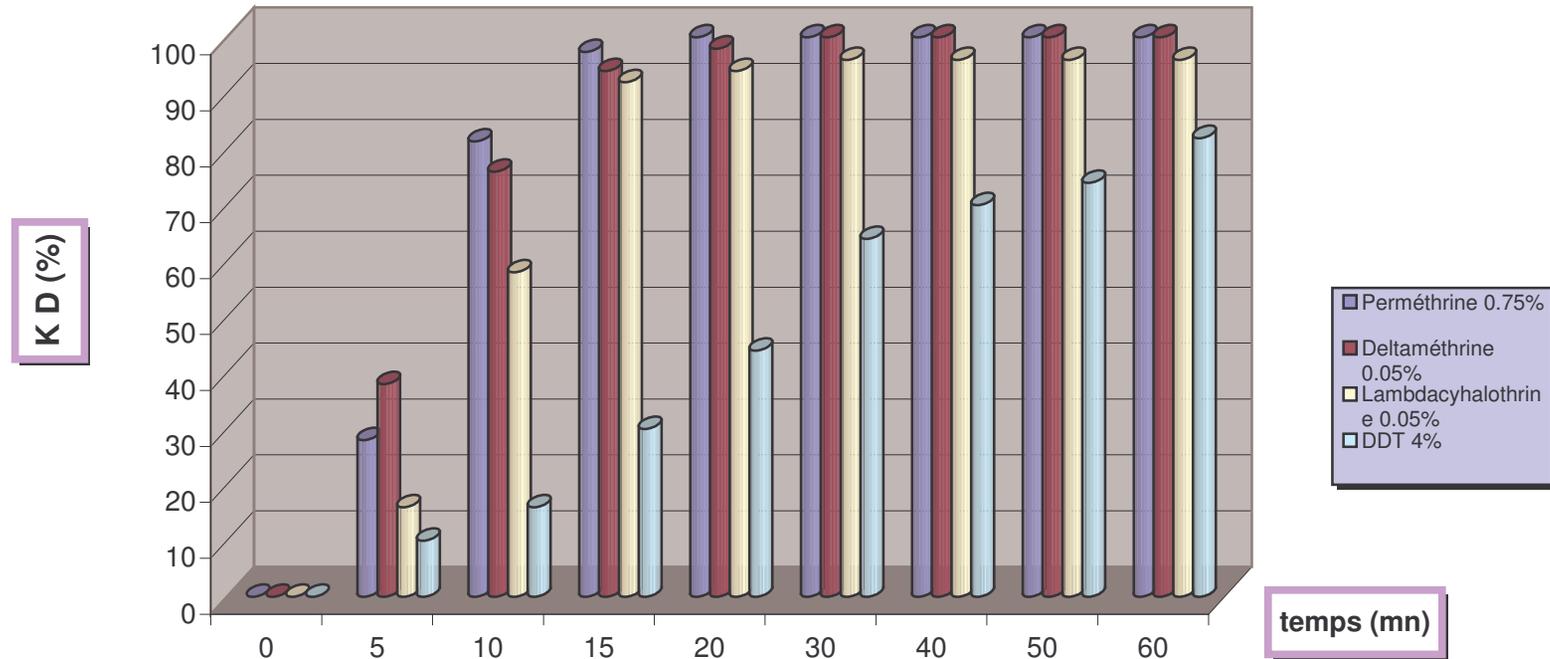


Figure 8 : Susceptibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides à Sélingué en mai et en juin 2002

A Sélingué, les observations des temps de « knock down » sont les mêmes que celles faites dans la localité précédente. Ainsi, nous avons observé un retard du KDT₅₀ avec le DDT et une absence du KDT₉₀. Quant aux pyréthriinoïdes, le KDT₅₀ a été obtenu avant la 10^{ème} mn, pendant que le KDT₉₀ moins de 5mn plus tard, avant la 15^{ème} mn (figure 8).

5.1.2 ZONE EXONDEE

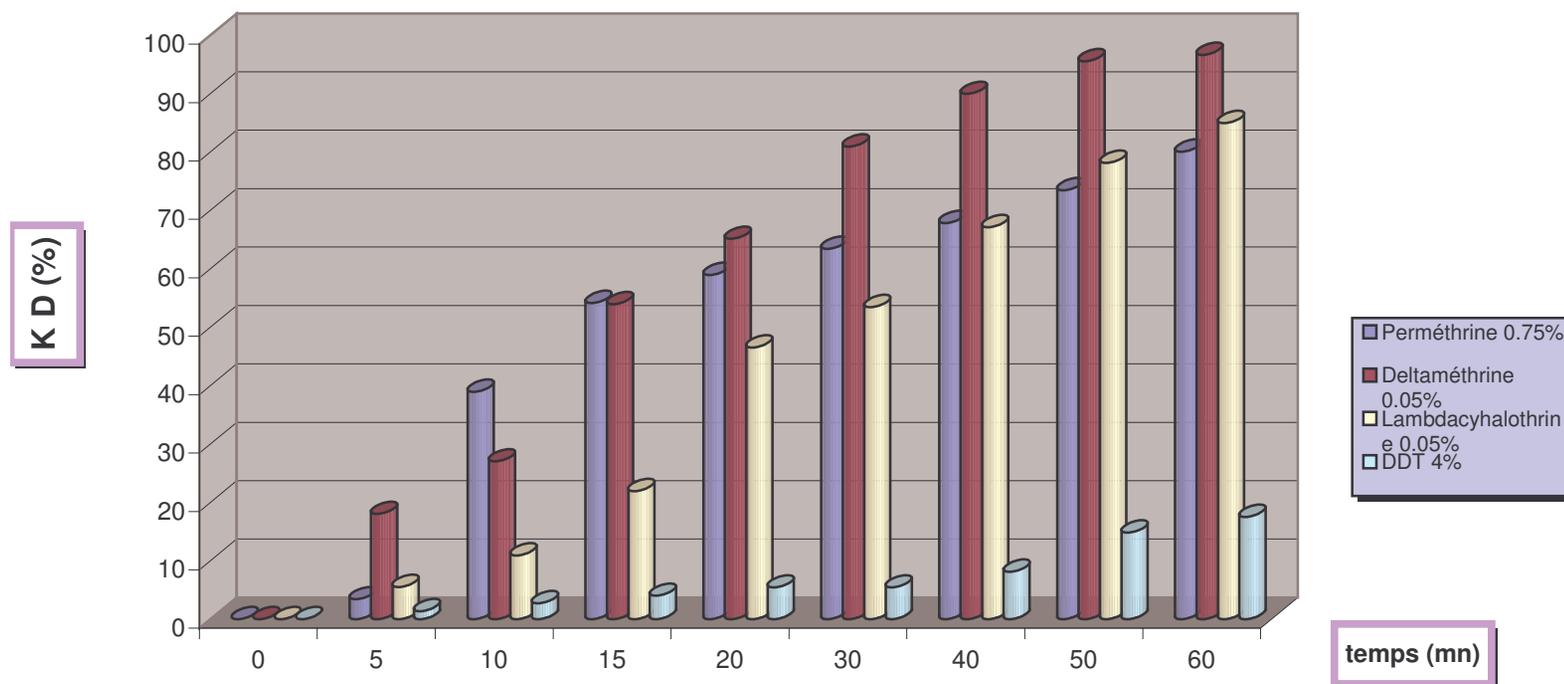


Figure 9 : Susceptibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides à Pimpéréna en juin 2002

En zone exondée, les KDT ont été observés plus tardivement qu'en zone inondée. En effet, à Pimpéréna, le KDT₅₀ de la perméthrine et de la deltaméthrine ont été obtenus juste avant la 15^{ème} mn, pendant que celui de la lambdacyhalothrine n'a été observé que peu de temps avant la 30^{ème} mn (figure 9). Nous n'avons pas pu observer le KDT₅₀ du DDT. Seul le KDT₉₀ de la deltaméthrine a pu être observé avant la 50^{ème} mn. Pour tous les autres insecticides, le KDT₉₀ n'a pas pu être observé.

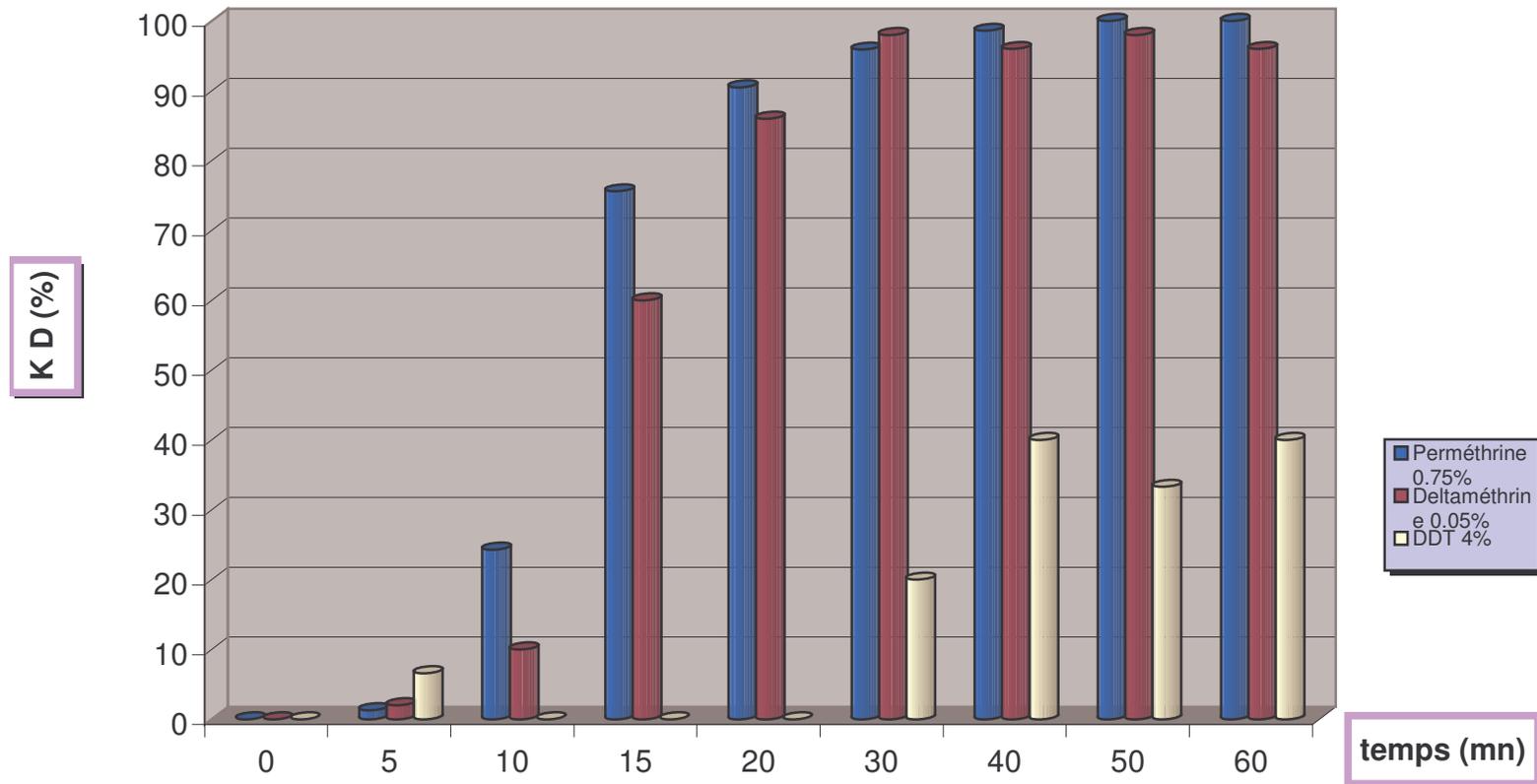


Figure 10 : Susceptibilité d’*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides à Banambani en juin 2002

Sur le figure 10, avant 15 mn d’exposition, nous avons observé les KDT₅₀ de la perméthrine et de la deltaméthrine et leurs KDT₉₀ ont été obtenus avant la 30^{ème} mn d’exposition. Quant au DDT, nous n’avons pas pu observer son KDT₅₀.

5.1.3 Analyse des tests de susceptibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* dans les différents villages des zones étudiées

Tableau VII : Susceptibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides testés dans les différents villages de la zone inondée

Insecticides Localités	Perméthrine 0.75%		Deltaméthrine 0.05%		Lambdacyhalothrine 0.05%		DDT 4%	
	Total testé	% morts	Total testé	% morts	Total testé	% morts	Total testé	% morts
Niono	71	94.7	50	100	50	100	48	96.0
Sélingué	47	98.0	46	100	49	93.4	49	93.4

En zone inondée, 118 moustiques ont été testés à la perméthrine, 96 à la deltaméthrine, 99 à la lambdacyhalothrine et 97 au DDT (Tableau VII).

An. gambiae s.l. est sensible à la deltaméthrine dans les deux localités de la zone inondée. Par contre, il présente une sensibilité plus diminuée à la perméthrine à Niono (94.67%) qu'à Sélingué (97.7%).

Quant à la lambdacyhalothrine et au DDT, les moustiques testés à ces deux insecticides présentent une plus faible sensibilité à Sélingué (93.35%) qu'à Niono (100% de mortalité pour la lambdacyhalothrine et 96% pour le DDT).

Tableau VIII : Tests de susceptibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides testés dans les différents villages de la zone exondée

Insecticides Localités	Perméthrine 0.75%		Deltaméthrine 0.05%		Lambdacyhalothrine 0.05%		DDT 4%	
	Total testé	% morts	Total testé	% morts	Total testé	% morts	Total testé	% morts
Pimpéréna	64	71.1	71	79.8	73	90.4	30	40.5
Banambani	64	86.5	48	96.0	-	-	-	-

En zone exondée, 128 moustiques ont été testés à la perméthrine, 119 à la deltaméthrine, 73 à la lambdacyhalothrine et 30 au DDT (Tableau VIII).

Dans la zone exondée, les taux de mortalité étaient plus faibles à Pimpéréna qu'à Banambani. Ainsi, à Pimpéréna, nous avons 71.12% de mortalité avec la perméthrine, 79.77% avec la deltaméthrine, 90.41% avec la lambdacyhalothrine et 40.54% avec le DDT. Alors qu'à Banambani, nous avons avec la perméthrine 86.49%, avec la deltaméthrine 96.0%. Le DDT et la lambdacyhalothrine n'ont pas pu être testés à cause d'un faible effectif de moustiques collecté. Ces résultats, conformément aux recommandations de l'OMS (OMS, 1998), permettent d'observer que dans la localité de Pimpéréna, il existe une résistance d'*An. gambiae s.l.* à la perméthrine (71.12% < 80%), au DDT (40.54% < 80%) et à la deltaméthrine (79.77% < 80%) et une sensibilité réduite à la lambdacyhalothrine (90.41%).

A Banambani, *An. gambiae s.l.* présente une sensibilité limite à la perméthrine et reste sensible à la deltaméthrine (96.1%).

5.1.4 Temps de « knock down » d'*An. gambiae s.l.* aux différents insecticides testés dans les sites d'étude

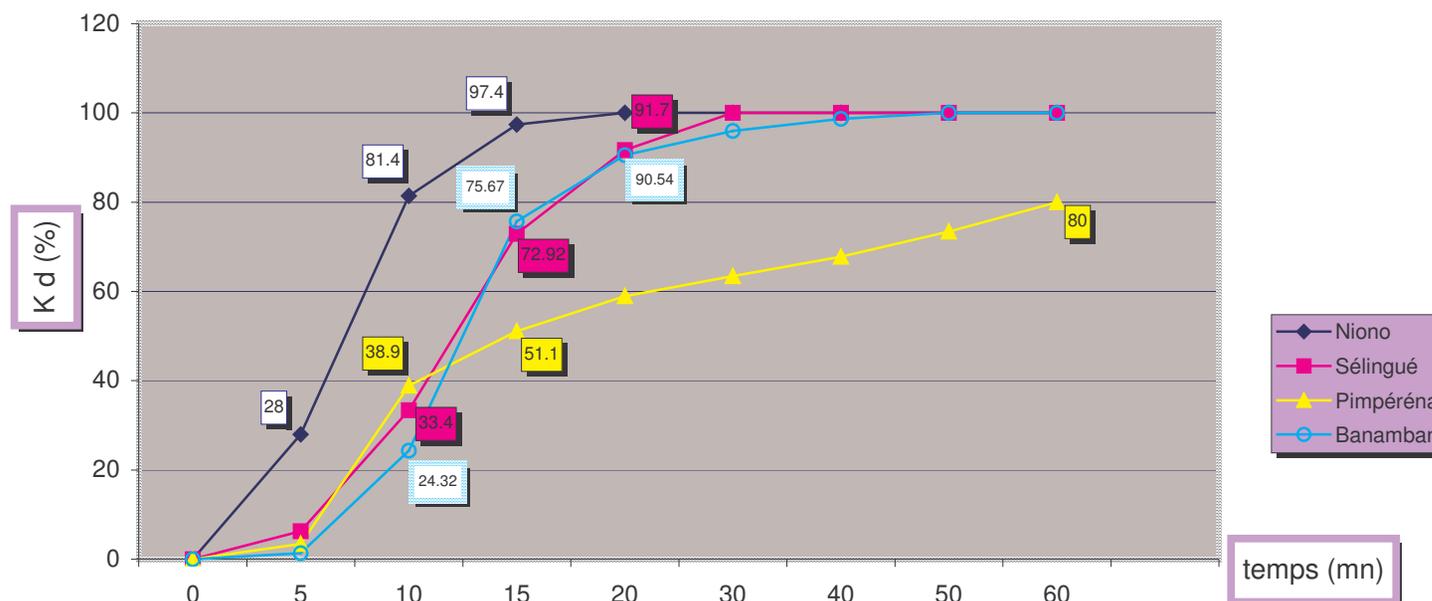


Figure 11 : Temps de «knock down» d'*An. gambiae s.l.* exposé aux papiers imprégnés à la perméthrine 0.75% dans les différentes localités étudiées

En zone inondée, les KDT_{50} se situent entre 5 et 10 mn (figure 11) alors qu'en zone exondée, ils se trouvent entre 10 et 15 mn. Dans le village de Niono le KDT_{50} se situe entre 5 et 10 mn. Par contre à Sélingué, c'est vers la 10^{ème} mn que 50% des moustiques ont été assommés.

En zone exondée, à Pimpéréna, c'est juste avant la 15^{ème} mn que 50% des moustiques ont été assommés. En revanche à Banambani, le KDT_{50} a été obtenu entre 10 et 15 mn.

Quant aux KDT_{90} , ils varient de 10 à 20 mn. A Niono, le KDT_{90} a été obtenu entre 10 et 15 mn pendant qu'à Sélingué et à Banambani, c'est pratiquement à la 20^{ème} mn qu'il a été observé. Nous n'avons pas pu observer le KDT_{90} à Pimpéréna.

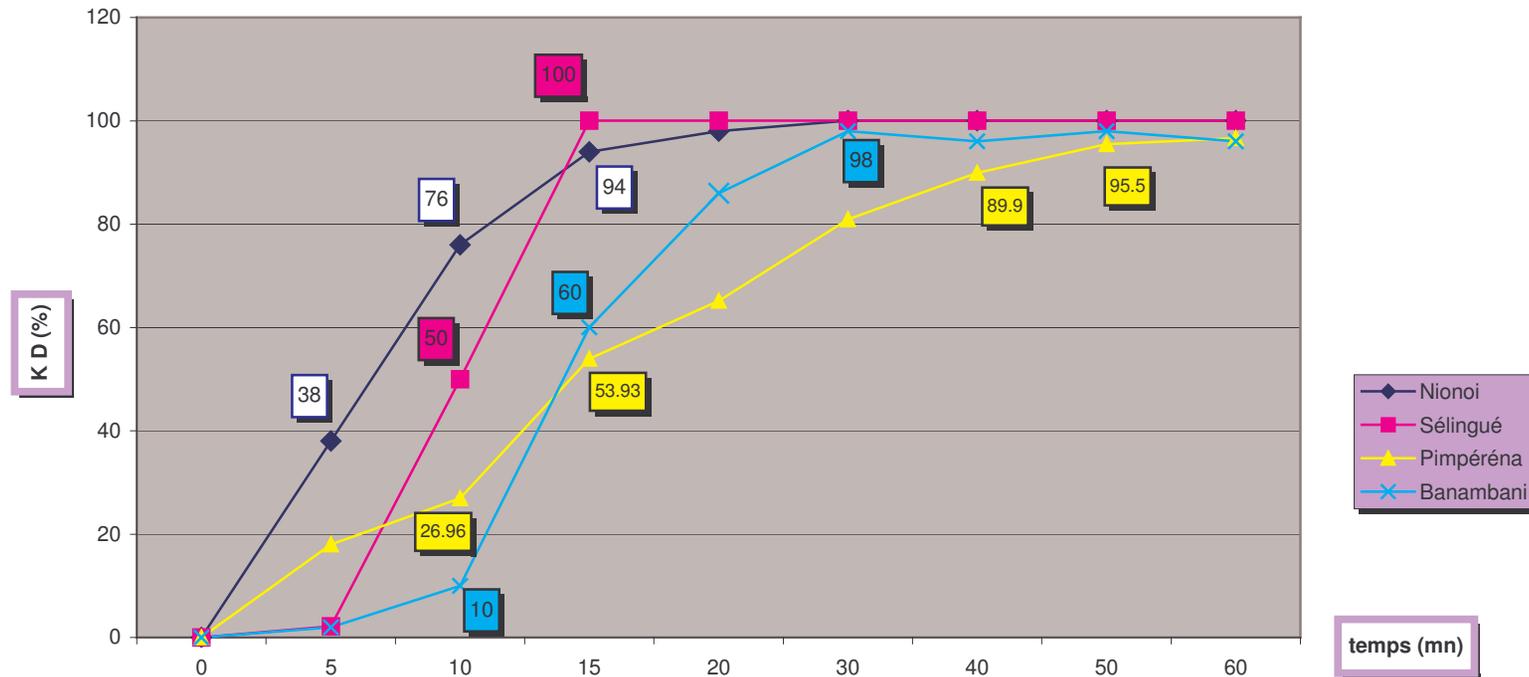


Figure 12 : Temps de «knock down» d’*An. gambiae s.l.* exposé aux papiers imprégnés à la deltaméthrine 0.05 % dans les différentes localités étudiées

Avec la deltaméthrine, les taux de KDT₅₀ varient de 5 à 15 mn, pendant que ceux de KDT₉₀ vont 10 à 40 mn (figure12). A Niono, il a fallu moins de 10 mn pour assommer la moitié de l’effectif d’*An. gambiae s.l.* exposé à l’insecticide et avant 15 mn, plus de 90% étaient déjà «knock down». A Sélingué, le KDT₅₀ a été obtenu à la 10^{ème} mn et avant la 15^{ème}, 100% des moustiques étaient assommés. En zone exondée, en revanche, les KDT₅₀ et KDT₉₀ ont été obtenus plus tardivement. A Pimpéréna, KDT₅₀ a été observé vers la 15^{ème} mn et le KDT₉₀ juste après la 40^{ème} mn. A Banambani, 50% des moustiques étaient assommés avant la 15^{ème} mn et peu après la 20^{ème}, nous avons observé le KDT₉₀.

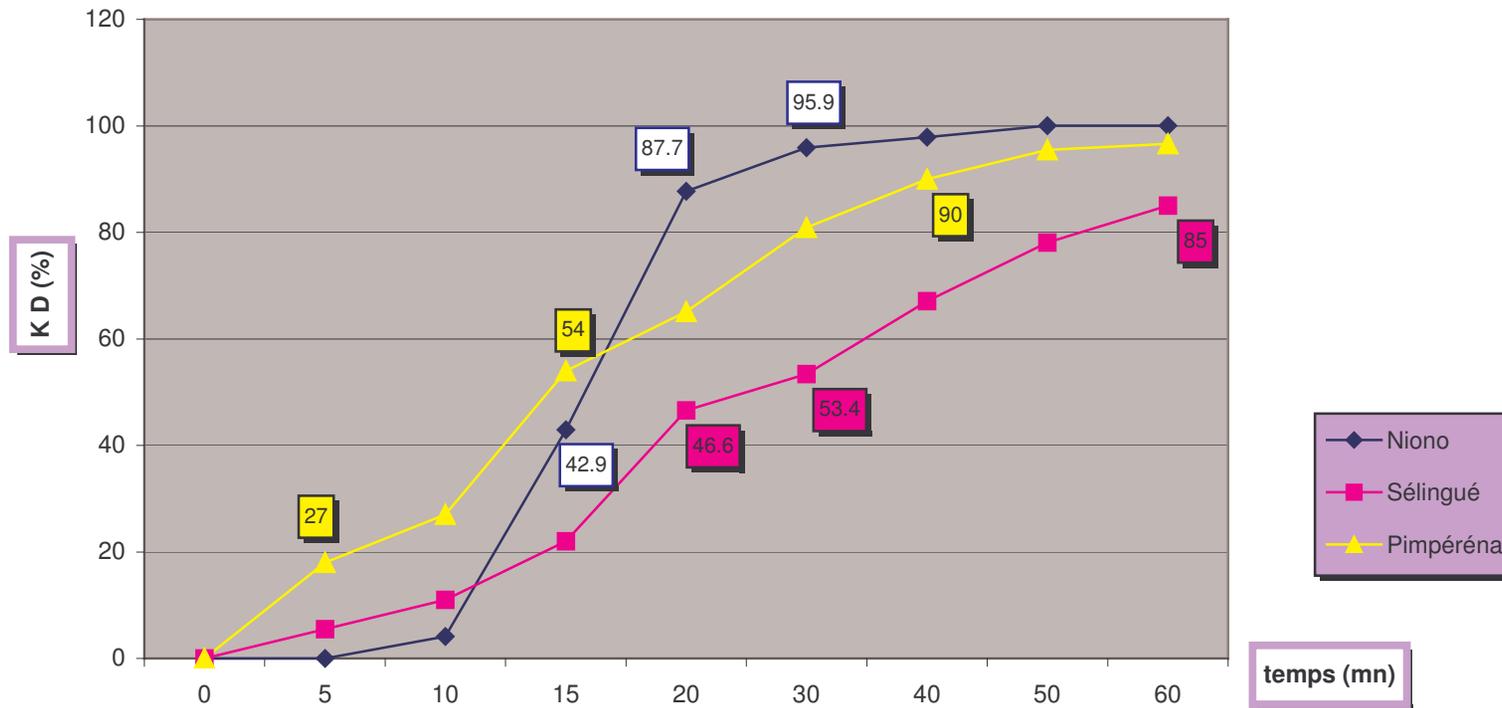


Figure 13 : Temps de «knock down» d’*An. gambiae s.l.* exposé aux papiers imprégnés à la lambdacyhalothrine 0.05% dans les différentes localités étudiées

Les KDT₅₀ varient entre 5 et 30 mn tandis que les KDT₉₀ vont de 10 à 30 mn (figure 13). Nous n’avons pas pu déterminer le KDT₉₀ de la lambdacyhalothrine à Pimpéréna du fait du faible taux de mortalité après l’heure d’exposition. Dans ce village, 50% des moustiques n’ont été assommés qu’entre 20 et 30 mn. Cet intervalle de temps correspond au KDT₉₀ observé à Sélingué. Le KDT₅₀ a quant à lui été obtenu entre 15 et 20 mn. A Niono, l’effet choc a été plus rapidement observé que dans les deux autres villages. En effet, 50% des moustiques ont été assommés entre 5 et 10 mn et le KDT₉₀ a été remarqué peu avant la 15^{ème} mn.

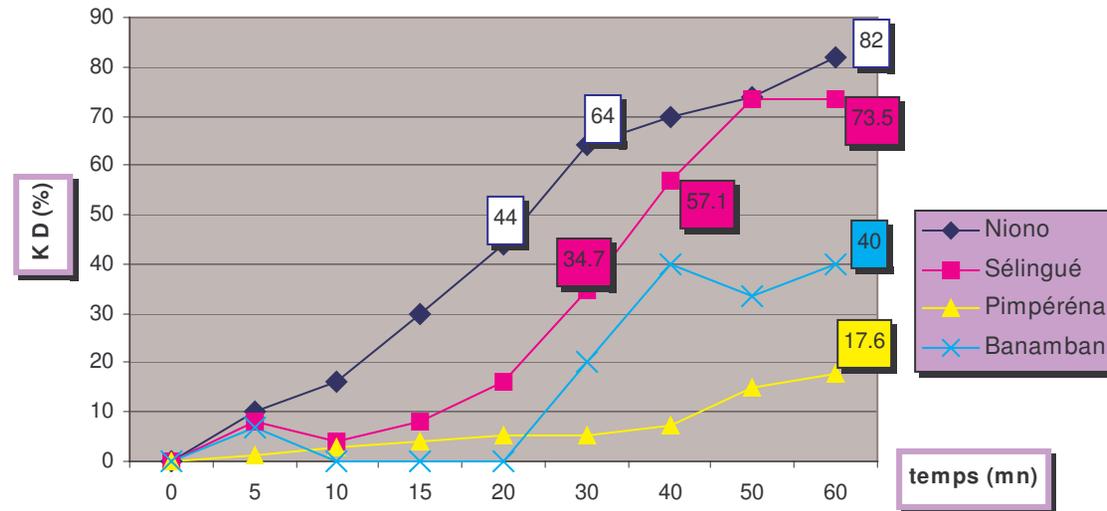


Figure 14 : Temps de «knock down» d’*An. gambiae s.l.* exposé aux papiers imprégnés au DDT 4% dans les différentes localités étudiées

Aucun KDT₉₀ n’a pu être observé, du fait des faibles taux de mortalité des moustiques enregistrés avec le DDT (figure 14). En zone exondée, nous n’avons pas observé non plus les KDT₅₀. Cependant, en zone inondée, 50% des moustiques ont été assommés entre 20 et 40 mn. A Niono, le KDT₅₀ a été observé entre la 20^{ème} et la 30^{ème} mn et à Sélingué, nous n’avons relevé le KDT₉₀ qu’après la 30^{ème} mn.

5.1.5 Mortalité d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides testés dans les différents sites d'études

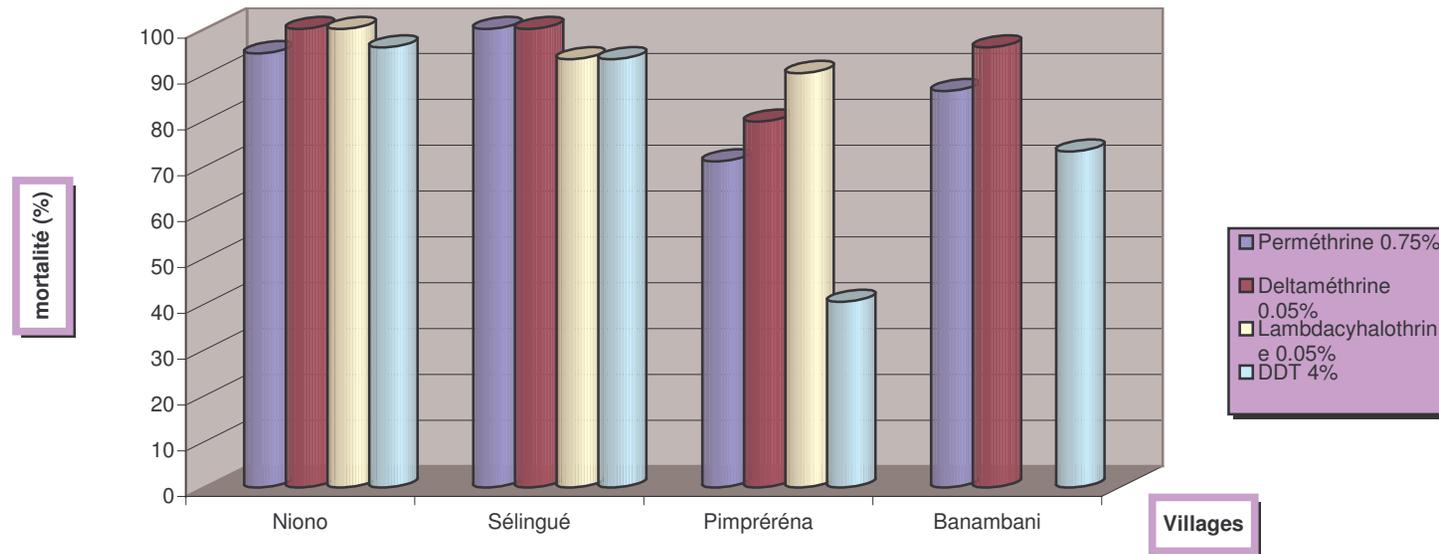


Figure 15 : Mortalité après 24 heures d'*An. gambiae* s.l. exposé aux différents insecticides testés dans les sites d'étude

En zone inondée (Niono et Sélingué), plus de 90% des moustiques testés aux différents insecticides étaient morts après 24 heures (figure 15). Cela n'est pas le cas en zone exondée où les taux de mortalités sont plus faibles qu'en zone inondée. En effet à Pimpréna, les taux de mortalité varient de 40.5% à 90.4% respectivement pour le DDT et pour la lambda-cyhalothrine, alors que la perméthrine et la deltaméthrine ont respectivement 71.1% et 79.8% de mortalité.

Nous avons donc observé une résistance d'*An. gambiae* à la perméthrine, à la deltaméthrine et au DDT à Pimpréna. Cependant, il existe une résistance limitée à la lambda-cyhalothrine qui devra être confirmée.

A Banambani, cependant, les taux sont sensiblement plus élevés qu'à Pimpréna (figure 15). Dans ce village, les taux de mortalité vont de 40.5% pour le DDT à 96.0% pour la deltaméthrine. Selon les recommandations de l'OMS, *An. gambiae* est sensible à la deltaméthrine dans ce village et est résistant au DDT. En revanche, les vecteurs présentent une sensibilité limitée à la perméthrine (86.5%) qui devra être confirmée.

5.1.6 Test de susceptibilité d'*Anopheles funestus*

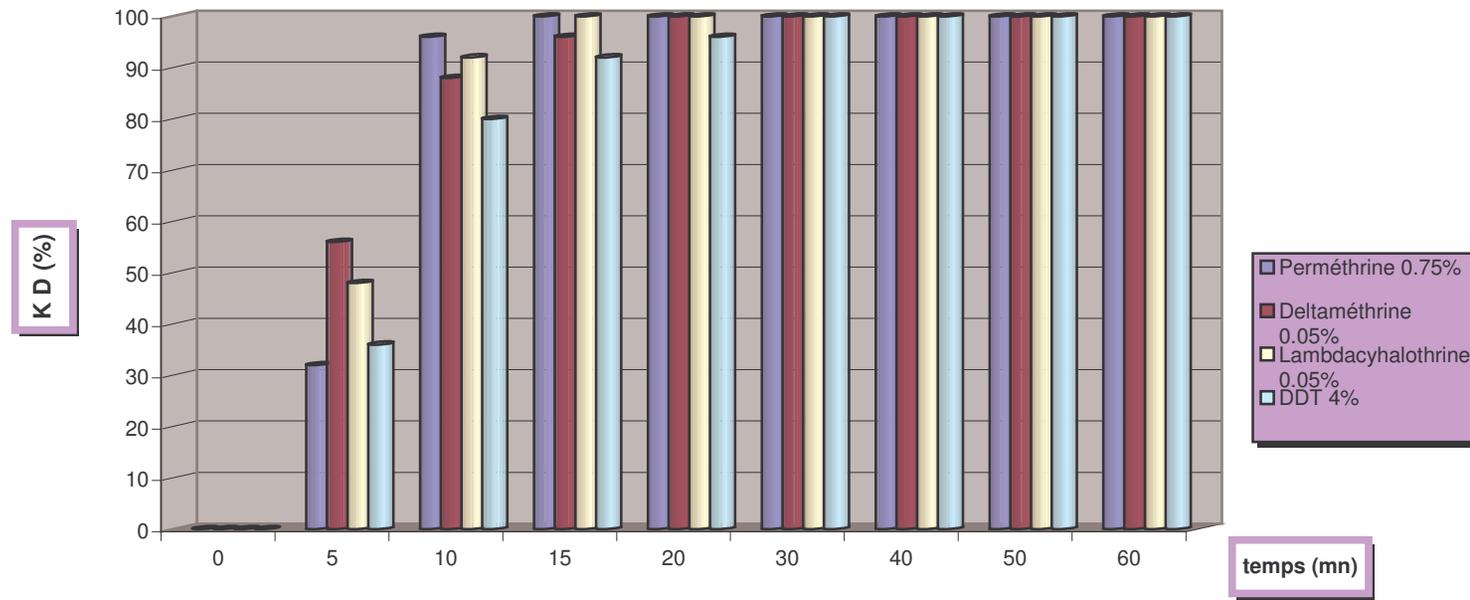


Figure 16 : Susceptibilité d'*Anopheles funestus* aux insecticides à Niono en Mai 2002

Sur l'ensemble des localités, ce vecteur a été collecté uniquement à Niono. Les KDT_{50} et KDT_{90} de toutes les pyréthrinoïdes et du DDT ont été rapidement obtenus avant la 15^{ème} mn. Avant la 5^{ème} mn, le KDT_{50} de la deltaméthrine avait été observé (figure 16).

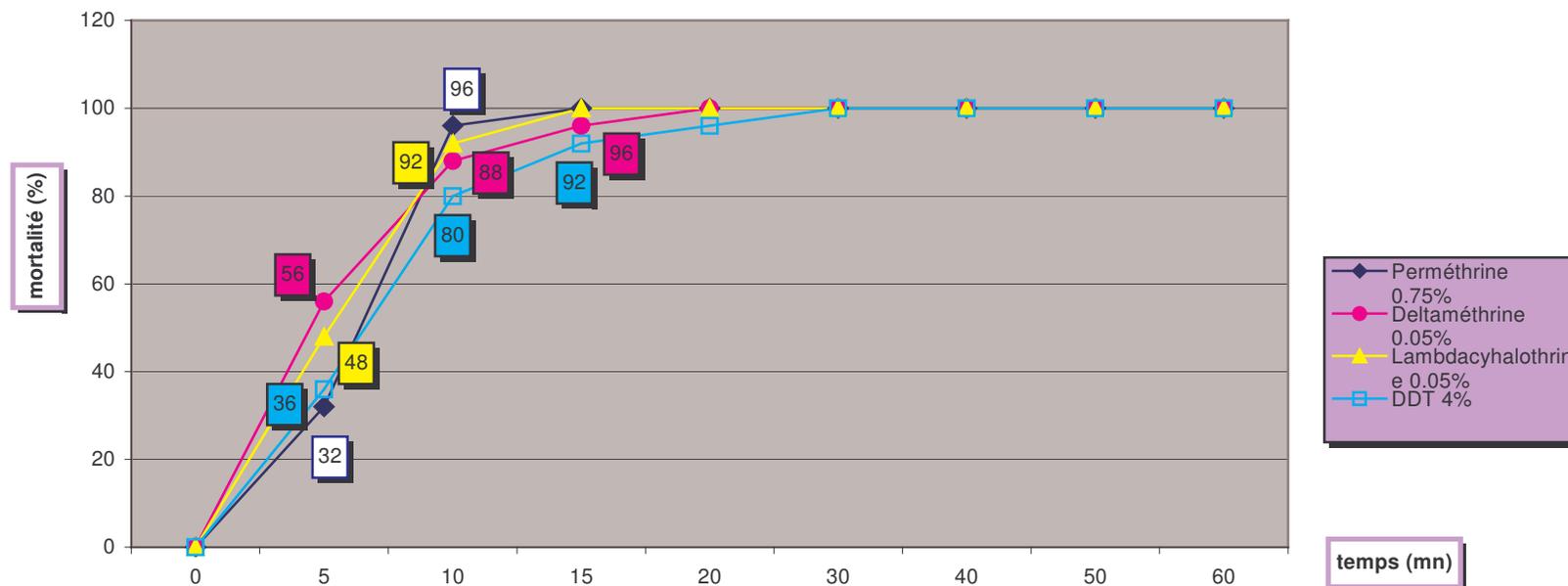


Figure 17 : Temps de «knock down» d’*An. funestus* exposé aux différents insecticides testés

Sur la figure 17, nous remarquons que les KD50 et KD90 sont regroupés entre eux. En effet, 50% des moustiques testés ont été assommés avant la 10^{ème} mn, avec tous les insecticides testés. Pour toutes les pyréthriinoïdes, le KDT90 a été obtenu avant 10 mn d’exposition, sauf pour la deltaméthrine où le KDT90 a été observé avant la 15^{ème} mn. Nous avons également remarqué celui du DDT dans le même intervalle de temps. En revanche, son KDT100 ne fut observé qu’à la 30^{ème} mn, pendant que celui des pyréthriinoïdes était observé avant la 20^{ème} mn.

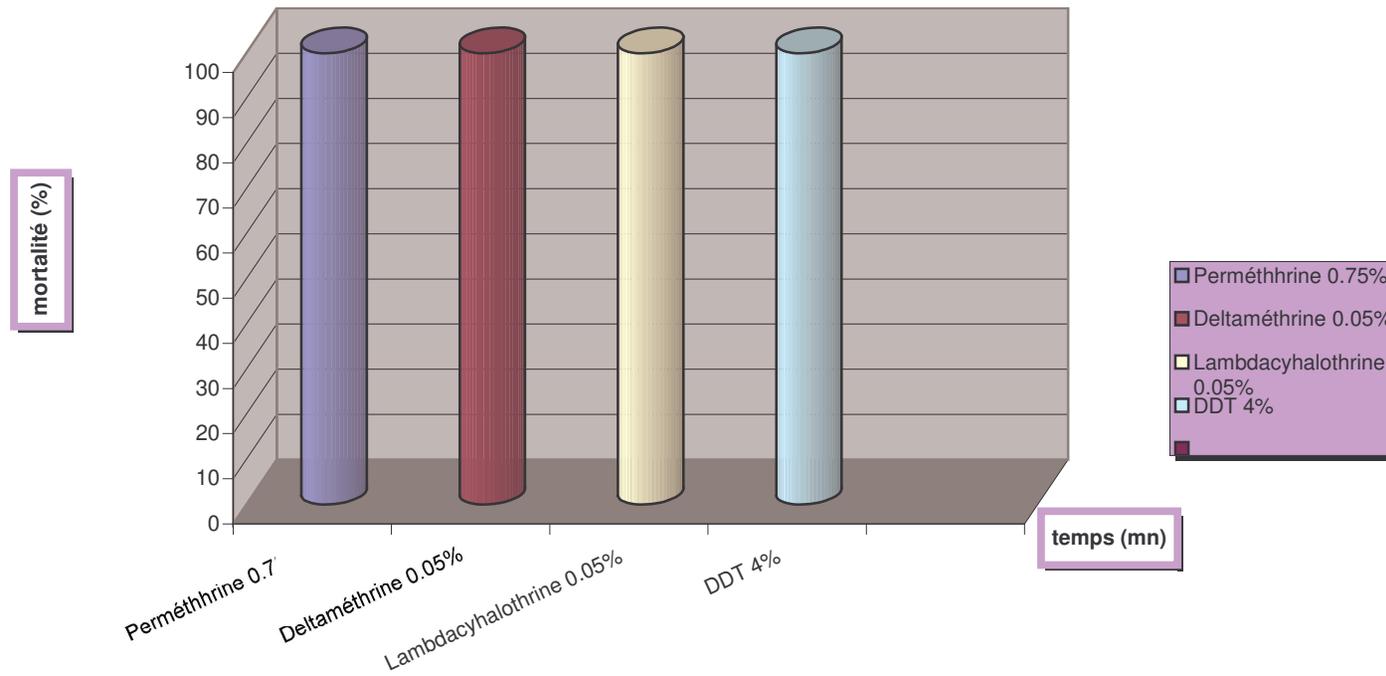


Figure 18 : Mortalité après 24 heures d’*An. funestus* exposé aux différents insecticides à Niono

An. funestus est sensible à toutes les pyréthriinoïdes testées et au DDT (figure 18). Nous n’avons pas jugé nécessaire de poursuivre les investigations moléculaires sur ce vecteur, car selon la littérature, le gène *kdr* ne se retrouve que parmi les individus de la population *An. gambiae s.s* (Diabaté et al., 2000; Koffi et al., 2000; Fanello et Della Torre, 2001) et d’autant plus qu’il est à 100% sensible à tous les insecticides testés.

5.2 TEST DE REMANENCE DE LA PERMETHRINE SUR LES MOUSTIQUAIRES IMPREGNEES

Tableau IX : Tests de rémanence, après 6 mois d'utilisation des MII

Moustiquaires	Nb	Kd au retrait	Kd après 10 mn	Kd après 30 mn	Kd après 60 mn	Mortalité après 24 h	Mortalité (%)
Avant utilisation	250	130	114	3	2	247	98,8
6 mois après utilisation	250	88	144	12	0	241	96.4
Témoins	125	0	0	0	0	0	0

Nb : nombre total de moustique testé $\chi^2 = 3.23$, ddl = 1, p = 0.07

Sur 125 moustiques testés avec la moustiquaire témoin, nous n'avons noté aucun moustique assommé et la mortalité après 24 heures a été de 0 % (tableau IX).

Après 6 mois d'utilisation, le taux de mortalité (96.4%) était significativement plus faible que celui observé avant l'utilisation des moustiquaires imprégnées (98.8%) [$\chi^2=3.23$; ddl= 1 ; p= 0.07].

Cependant, ce taux de mortalité (96.4%) nous indique que les anophèles sont sensibles aux moustiquaires imprégnées de perméthrine dans la zone rurale de Sélingué.

5.2 DETERMINATION DE LA FREQUENCE DU GENE KDR DANS LA POPULATION VECTRICE

5.3.1 Composition de la population d'*An. gambiae s.l.* testée aux différents insecticides

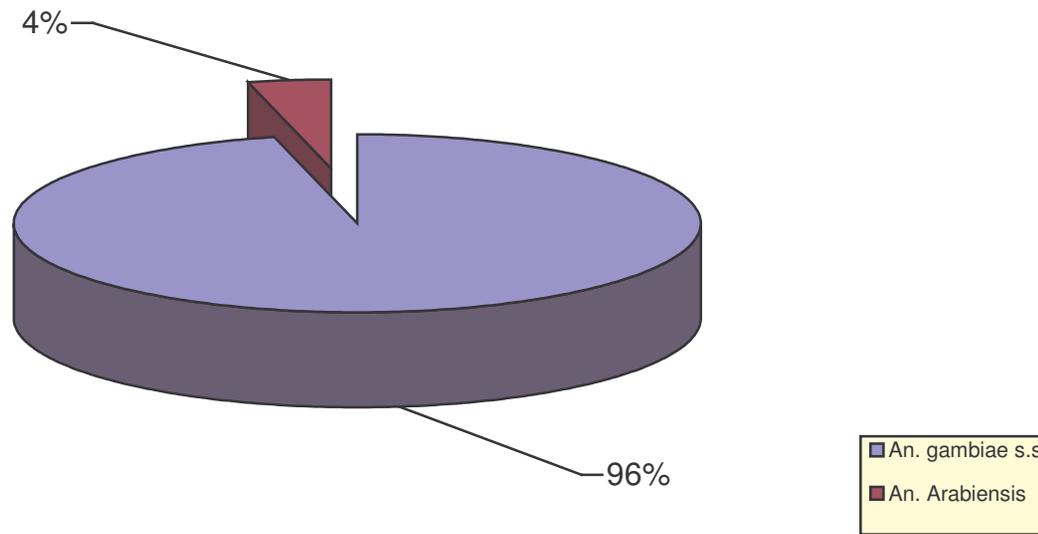


Figure 19: Structure de la population d'*An. gambiae s.l.* testée

Au total, nous avons obtenu 96% d'*An. gambiae s.s.* et 4% d'*An. arabiensis* dans toutes les localités étudiées (figure 19).

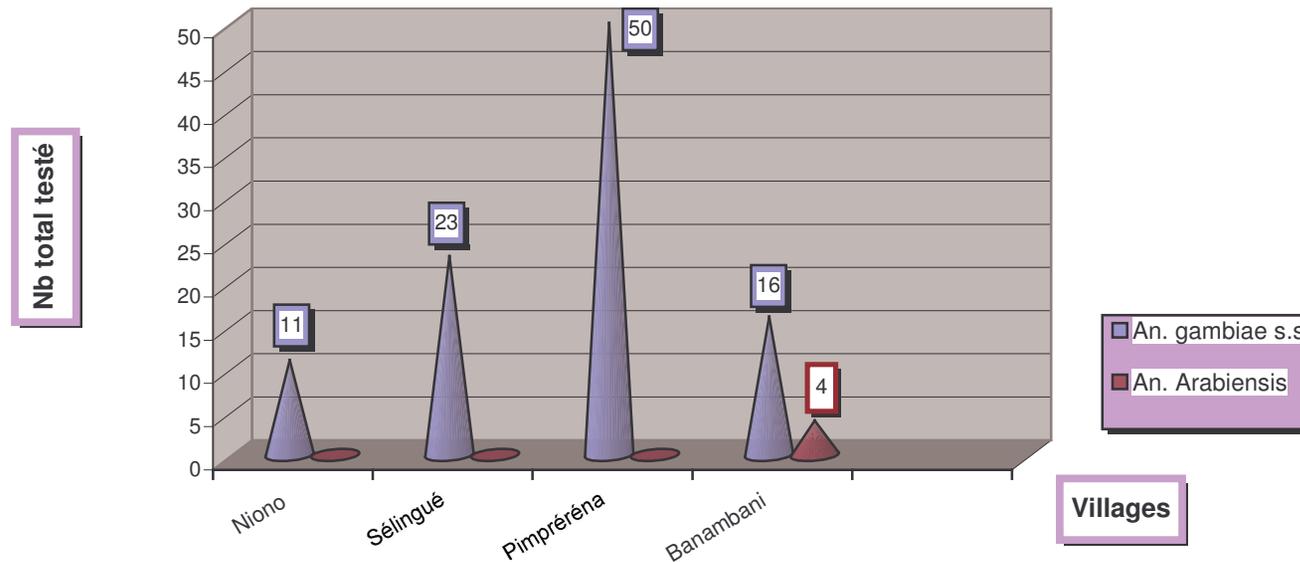


Figure 20 : Fréquence des espèces moléculaires d'*An. gambiae s.l.* exposées aux insecticides dans les différents villages

104 moustiques ont été identifiés dont 70 en zone exondée (Pimpréréna et Banambani) et 34 en zone inondée (Niono et Sélingué).

Cependant sur les 104, les formes moléculaires de 8 moustiques n'ont pas pu être déterminées. En zone inondée, tous les moustiques testés appartenaient à la l'espèce *An. gambiae s.s.* (figure 20). En zone exondée, nous avons observé la présence de moustiques appartenant à l'espèce *An. arabiensis*, mais uniquement à Banambani et en nombre très réduit (4 moustiques, soit 4.85% du total identifié).

5.3.2 Proportion de moustiques ayant survécu aux tests de sensibilité après 24 heures dans les différentes localités étudiées

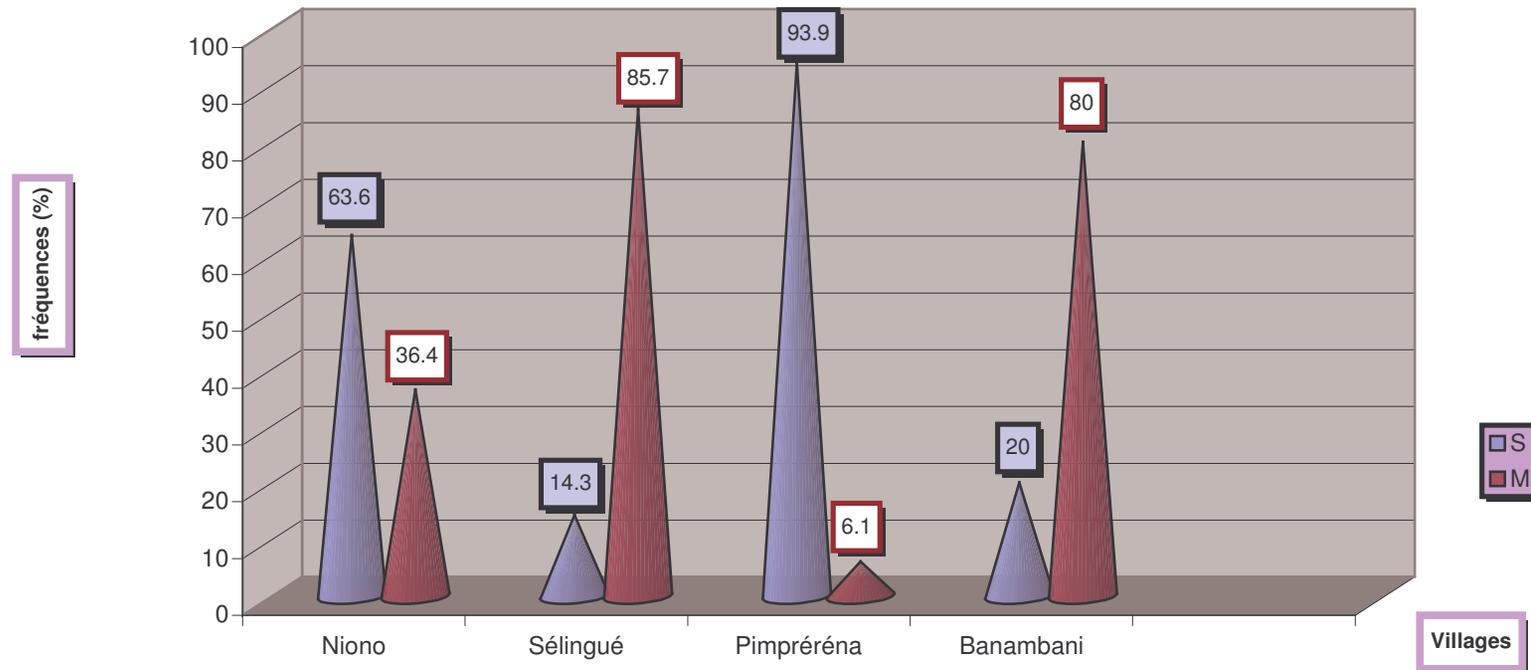


Figure 21 : Fréquence des formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.* dans les différents villages étudiés

En zone inondée, le taux de forme Mopti est plus élevé à Sélingué (85.7%) qu'à Niono (36.4%). Par contre, le taux de forme Savane était plus élevé à Niono (63.6%) qu'à Sélingué (14.3%) (figure21).

Sur les 66 moustiques appartenant à l'espèce *An. gambiae s.s.*, la forme Mopti était en nombre plus élevé à Banambani (80%) qu'à Pimpréréna (6.1%) ; alors que le taux de la forme Savane était plus élevé à Pimpréréna (93.9%) qu'à Banambani (20%).

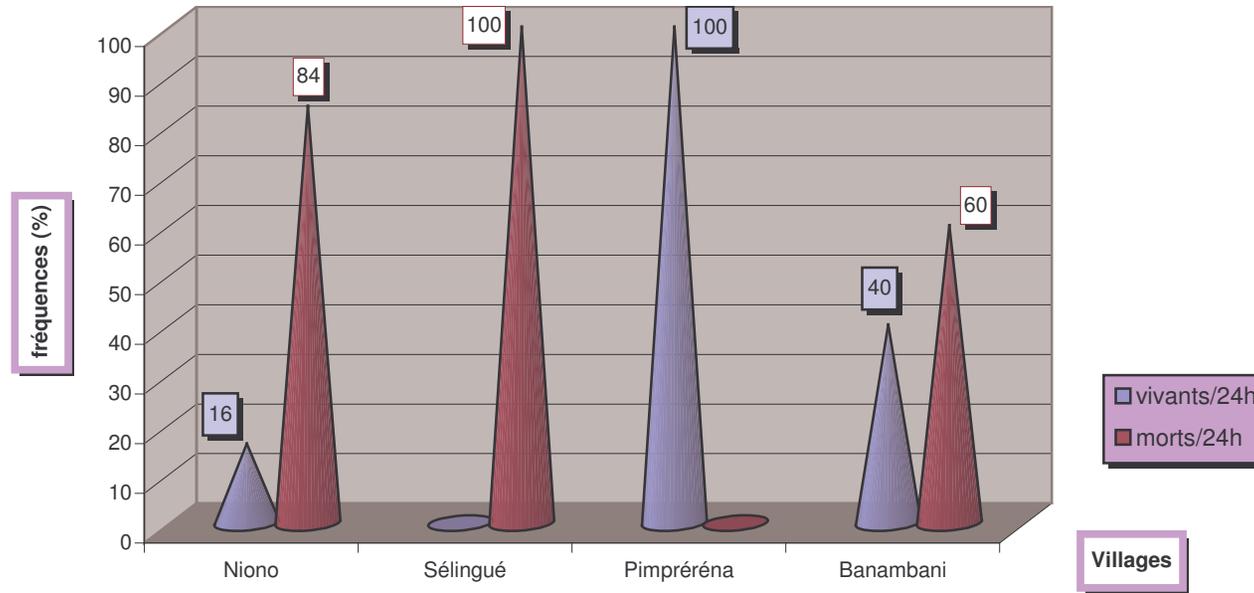


Figure 22 : Fréquence d’*An. gambiae* phénotypiquement résistants à la perméthrine 0.75% dans les différentes localités

En zone exondée, la proportion de moustiques phénotypiquement résistants était plus élevée qu’en zone inondée (figure22). En effet, c’est uniquement dans la localité de Niono que les moustiques ont survécu après 24 heures (16%). A Sélingué, tous les moustiques testés à la perméthrine se sont tous révélés sensibles. Par contre, à Pimpréréna, tous les moustiques testés ont résisté après 24 heures, pendant qu’à Banambani, 40% de la population exposée au même insecticide a résisté.

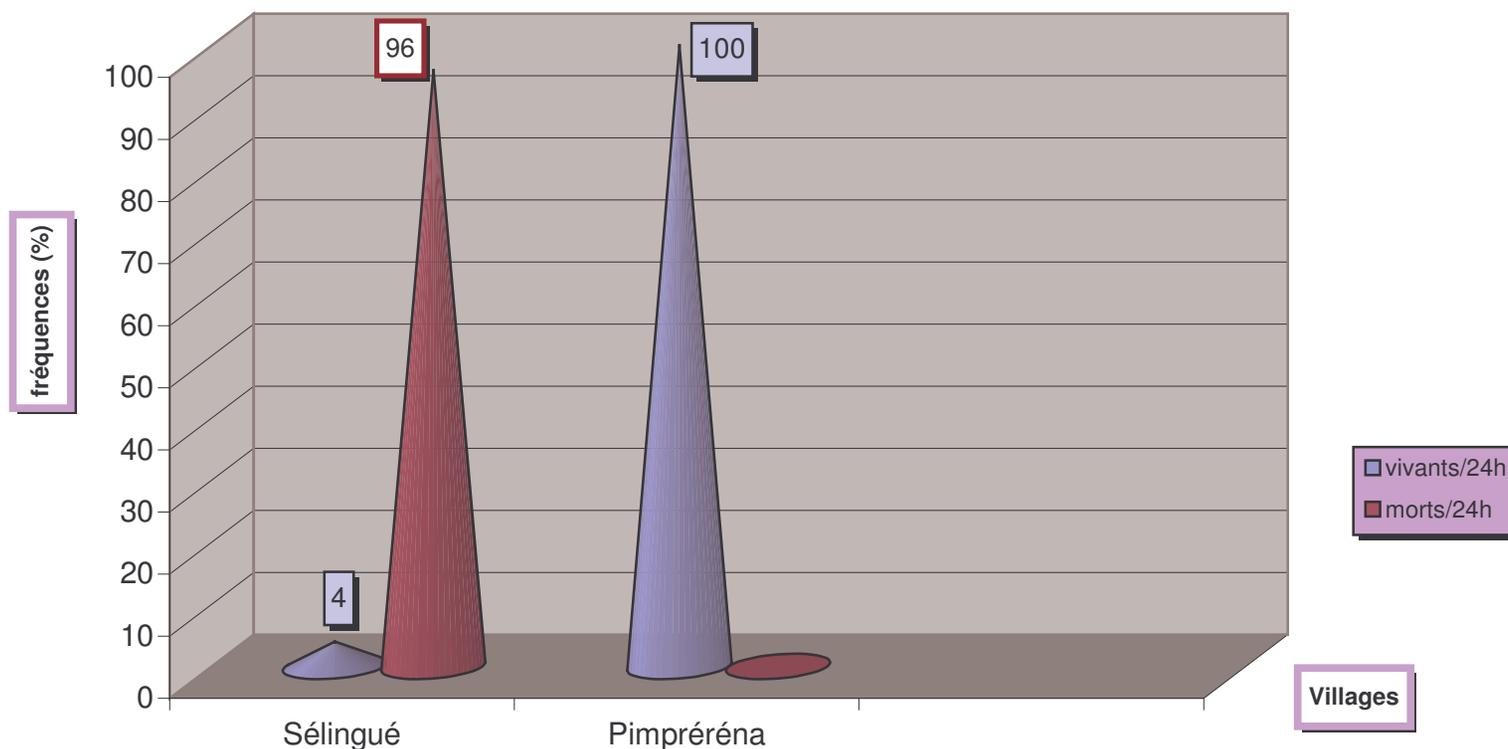


Figure 23 : Fréquence d'*An. gambiae* phénotypiquement résistants au DDT 4% dans les différents sites d'étude

La résistance phénotypique d'*An. gambiae s.l.* exposée au DDT n'a été déterminée que dans un village par zone (Sélingué et Pimpréréna), du fait de la forte utilisation de cet organochloré dans ces localités. A Pimpréréna, tous les moustiques testés ont survécu après 24 heures. En revanche, à Sélingué, seulement 4% de moustiques phénotypiquement résistants ont été observés (figure 23).

5.3.3 Fréquence du gène *kdr* dans la population d'*An. gambiae s.l.* testée à la perméthrine 0.75% et au DDT 4% dans les différentes localités étudiées

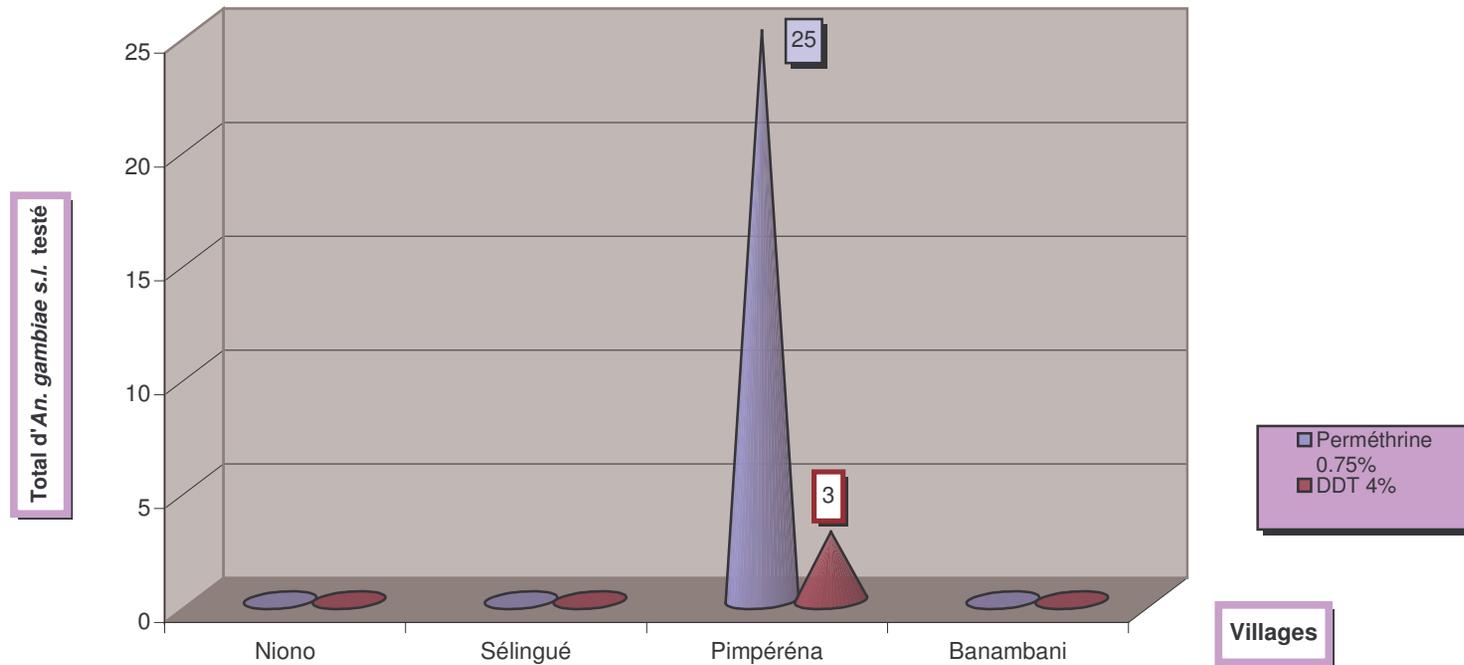


Figure 24: Fréquence du gène *kdr* chez *An. gambiae s.l.* testées à la perméthrine 0.75% et au DDT 4% dans les différents sites d'étude

Sur les 25 moustiques testés par insecticide et par village, le gène *kdr* n'a été retrouvé qu'à Pimpéréna. 100% (25) des moustiques testés à la perméthrine portaient le gène *kdr* et seulement 12% (3) de ceux testés au DDT en possédaient également (figure 24).

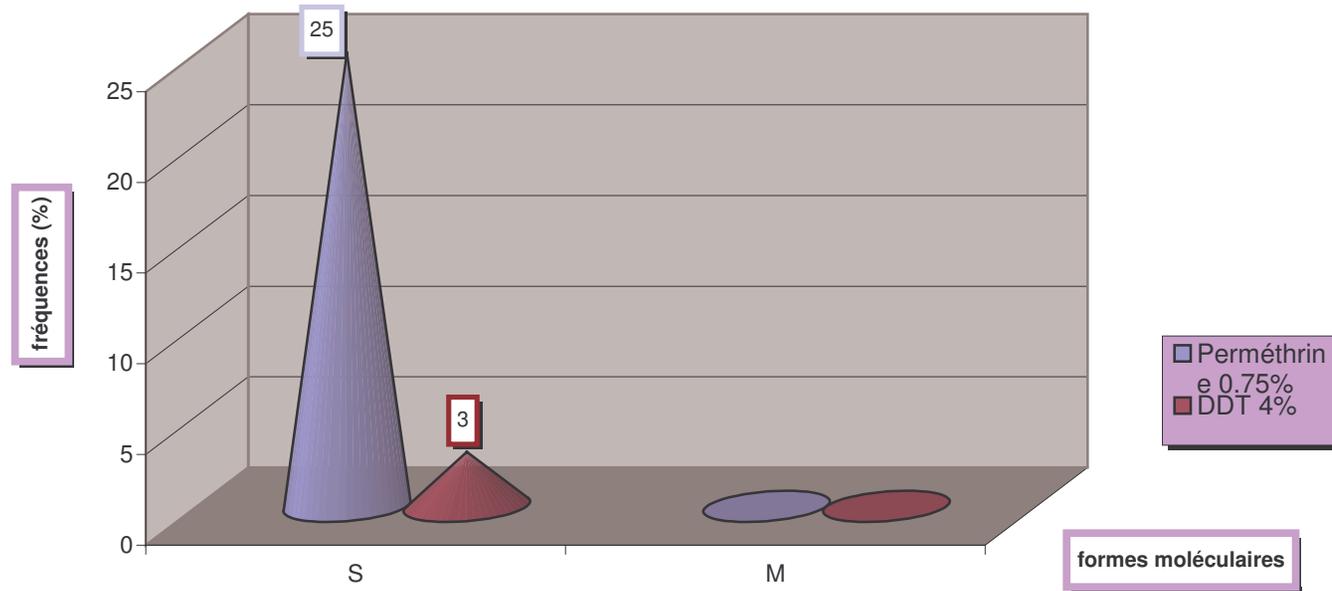


Figure 25: Fréquence du gène *kdr* chez les formes moléculaires d'*An. gambiae s.l.* testées à la perméthrine 0.75% et au DDT 4% à Pimpéréna

La figure 25 nous indique donc que parmi les populations de l'espèce *An. gambiae s.s.* testées à la perméthrine et au DDT, seule la forme S porte l'allèle mutant *kdr*.

6.4 DETERMINATION QUALITATIVE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DE GENE CONFLICTUELS IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE DES VECTEURS

Les travaux du centre se faisant en collaboration avec des universités américaines, nous leur avons envoyé nos échantillons contenant des gènes conflictuels et des ADN de moustiques génotypiquement résistants, afin de les séquencer.

Les résultats n'ont malheureusement pas pu être disponibles pour cette thèse, mais feront l'objet d'autres études ultérieures.

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

7. DISCUSSIONS

Trois aspects essentiels justifient le choix de la méthodologie et des sites d'études constitués par une zone inondée et une zone exondée ayant différents faciès épidémiologiques de transmission du paludisme:

- d'une part, la zone inondée se caractérise par une transmission plurimodale, du fait de la riziculture et des cultures de contre saison; alors que la zone exondée se caractérise par une transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois (Sangaré, 2000).
- d'autre part, dans ces deux zones, les populations utilisent intensivement les pesticides, soit dans les rizières, soit dans les champs de coton. Cette forte utilisation de pesticides pourrait entraîner une importante pression de sélection de la résistance.
- enfin, les différentes localités de ces zones sont éloignées les unes des autres, ce qui nous a permis d'observer la répartition de la susceptibilité des anophèles aux pyréthrinoïdes et au DDT d'une part et d'autre part, la distribution du gène *kdr* dans la population vectrice dans les deux sites étudiés.

Contrairement aux travaux déjà réalisés suivant le protocole normalisé de l'OMS (1996) [Adasi et *al.*, 2000 ; Akogbeto et *al.*, 2000 ; Diabaté et *al.*, 2000 ; Etang et *al.*, 2000 ; Masendu, 2000 ; Coetzee, 2001 et Sharp, 2001], nos tests de susceptibilité ont été réalisés directement sur les lieux de capture et sur des moustiques sauvages gorgés. En 1999, Chandre et *al.*, ont également suivi le même protocole à Cotonou, au Bénin. Cette méthode a

l'avantage de tester les moustiques dans leur milieu naturel, sans risquer des modifications physiologiques engendrées par les conditions d'élevage de l'insectarium (alimentation, humidité, température, etc.). Mieux, l'un des objectifs de cette étude est d'aboutir à des recommandations pour la vulgarisation des moustiquaires imprégnées de perméthrine.

Une autre particularité méthodologique est la conservation des moustiques dans de l'éthanol à 70% et non dans du carnoy (une part d'acide acétique pour trois parts d'éthanol 100%), afin d'éviter l'action corrosive de l'acide, et d'améliorer la conservation de l'ADN des moustiques.

Pour le diagnostic moléculaire du *kdr* par la PCR, nous avons utilisé les paramètres standards après une optimisation et une adaptation du protocole à nos conditions d'étude (température, conditions d'amplification).

Les épreuves de sensibilité sur les moustiques adultes nécessitent des lots de moustiques uniformes du point de vue de l'âge et du développement ovarien. Ces conditions sont réalisables en menant des tests sur des spécimens d'élevage âgés de 3 à 5 jours. Dans notre étude, compte tenu de la distance entre les localités à prospecter et de leur nombre, nous avons préféré utiliser des femelles gorgées, capturées à l'état sauvage. Dans toutes les localités, seuls les membres du complexe *An. gambiae* ont été testés, sauf à Niono où ils vivent en sympatrie avec *An. funestus*. Dans cette localité, la sensibilité de chacune de ces espèces aux insecticides a été étudiée.

Le niveau de sensibilité ou de résistance était déterminé grâce aux normes fixées par l'OMS (1998). La sensibilité était attestée quand les taux de mortalité étaient supérieurs à 80%, il y avait résistance quand ce taux était inférieur à 80%. Nous avons considéré la sensibilité comme réduite quand le taux de mortalité des moustiques était compris entre 80 et 90%. Akogbeto

(1999) a également interprété ses résultats de la même manière, lors d'une étude similaire menée au Bénin.

En zone inondée, les moustiques étaient tous sensibles à la perméthrine (94.7% de mortalité à Niono et 97.8% à Sélingué). Cette sensibilité était réduite dans les deux localités de cette zone par rapport aux tests effectués en 2001 par Dolo et *al.* (*unpublished*) et aussi par rapport aux observations de Coulibaly et *al.* (2001). En effet, ces auteurs ont observé 100% de mortalité avec cet insecticide.

Par contre, dans la zone exondée, *An gambiae s.l.* était résistant à la perméthrine. Ce résultat corrobore les observations de Akogbeto (2001) et de Chandre (1999) en Côte d'Ivoire, au Bénin et au Burkina Faso, où toutes les populations d'*An. gambiae* étaient résistantes à cet insecticide. Cependant, il faudrait noter que les tests réalisés dans ces pays ont utilisé la perméthrine à la dose diagnostique de 0.25%, alors que dans la présente étude, elle a été utilisée à 0.75%, c'est à dire une dose trois fois plus élevée. Ces auteurs pourraient avoir surestimé le niveau de résistance des moustiques dans les zones étudiées avec l'usage d'un faible dosage de la perméthrine. Chandre et *al.* (1999), abondent dans le même sens que nous en proposant une augmentation de la dose de la perméthrine de 0.25% à 0.5% voire même 1%.

Par ailleurs, cette différence entre les zones d'étude, pourrait s'expliquer par la prédominance de la forme Mopti dans les autres localités, au moment de l'échantillonnage et par la présence dominante de la forme Savane, à Pimpéréna (77.97%), qui, nous savons, était la seule à supporter l'allèle de résistance (Elissa et *al.*, 1993.; Touré et *al.*, 1994). Cependant, au Bénin, plusieurs études ont prouvé que la forme Mopti supporte également l'allèle

résistant *kdr*. Parmi elles, il y a celles de Diabaté et *al.*, (2000), Fanello et Della Torre (2000), de Weill et *al.*, (2000) et de Akogbeto (2001).

En ce qui concerne la deltaméthrine, dans la zone inondée, *An. gambiae s.l.* y était sensible (100% de mortalité). En zone exondée, les moustiques se sont comportés différemment. En effet, les populations d'*An. gambiae* de la localité de Pimpéréna étaient résistantes alors que celles de Banambani y étaient sensibles. La différence significative entre ces deux localités pourrait s'expliquer par l'utilisation plus importante des pesticides pour le traitement du coton à Pimpéréna ($p=0.008$). L'usage massif des pesticides en agriculture est probablement responsable de la baisse de sensibilité des moustiques aux insecticides. Cela a été confirmé par Akogbeto (2001) au Bénin, au Burkina Faso, en Côte d'Ivoire, au Sénégal et au Niger lors d'une étude visant à déterminer les facteurs écologiques favorisant l'émergence de la résistance aux pyréthrinoïdes. Il remarqua que la résistance était très forte dans les régions de culture du coton, des légumes, des fruits, du café et du cacao. Il trouva également une diminution de la sensibilité d'*An. gambiae* à la deltaméthrine, au Bénin, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso. En revanche, une autre étude d'Akogbeto (1999) au Bénin, dans deux zones rurales cotonnière et rizicole (région septentrionale), prouva qu'*An. gambiae* était sensible à la deltaméthrine. Ces différentes études ont utilisé des doses diagnostiques de deltaméthrine deux fois plus faibles (0.025%) que dans la présente étude (0.05%). Dans ce cas, nous pourrions affirmer qu'au Mali, précisément à Pimpéréna, *An. gambiae* a un plus haut niveau de résistance à la deltaméthrine que dans les régions de ces pays où ce vecteur est sensible à une dose de 0.025% de deltaméthrine. Ceci est d'autant plus justifié qu'au Burkina Faso, Diabaté et al. (1999), ont obtenu une sensibilité totale des vecteurs à la deltaméthrine dosée à 0.05%. Chandre et al. (1999), ont même estimé que la dose de 0.025% semblait appropriée.

Avec la lambdacyhalothrine, *An. gambiae s.l.* était sensible à ce pyréthrinoïde dans toutes les localités étudiées, bien que cette sensibilité soit

réduite à Pimpéréna (90.41%). En 2000, Akogbeto et *al.*, avaient trouvé une sensibilité de ce vecteur dans la partie nord du Bénin et une résistance dans la partie sud, dans les régions urbaine et de culture des légumes.

Dans une autre étude menée au Bénin, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso, Akogbeto (2001) observa une diminution générale de la sensibilité d'*An. gambiae* à cet insecticide.

Quant au DDT, en zone inondée, notre étude a permis d'observer une sensibilité d'*An. gambiae* à cet organochloré. Des études menées par Dolo et *al.* en 2001 (*unpublished*), dans différentes localités du Mali, notamment à Sélingué et à Niono, ont rapporté une faible résistance de ce vecteur au DDT (4-10%).

En zone exondée, *An. gambiae* était résistant au DDT à Pimpéréna (40.54%) et à Banambani (73.3%). Cette différence statistiquement significative entre les deux zones ($p=0.02$), pourrait s'expliquer par le fait qu'à Pimpéréna les pesticides sont plus massivement employés qu'à Banambani qui est une zone d'agriculture moyenne. En effet, l'agriculture semble être l'un des principaux facteurs responsables de la sélection de résistance chez *An. gambiae* en Afrique occidentale (Chandre, 2000).

Cette observation corrobore la remarque de Diabaté (2001) selon laquelle la résistance au DDT est apparue en 1967 chez *An. gambiae s.l.* dans la région de Bobo-Dioulasso, 7 ans après l'arrêt des pulvérisations au DDT pour le contrôle du paludisme, mais seulement quelques mois après l'introduction de cet insecticide dans une formulation destinée à la protection des cultures du coton. Depuis, cette résistance semble s'être étendue au Burkina Faso ; en effet, Diabaté et *al.* (1999), ont récemment montré une résistance au DDT dans trois sites d'hydro-aménagements.

En revanche, Elissa et *al.* (1994), ont observé à Bouaké (Côte d'Ivoire) que la résistance à la perméthrine et la baisse de l'effet « knock down » de la deltaméthrine et de la lambdacyhalothrine étaient limitées au périmètre urbain de Bouaké et ne se rencontraient pas dans la zone rurale. Selon cette assertion, la résistance aux pyréthriinoïdes serait due à leur emploi massif dans l'usage domestique (Bombes Timor[®] à la deltaméthrine, Baygon[®] au propoxur).

A Niono, *An. funestus* est sensible aux quatre insecticides testés. En 2001, Dolo (*unpublished*) avait trouvé les mêmes résultats dans cette localité et dans la zone du barrage hydroélectrique de Sélingué.

Au Burkina Faso, Baldet et *al.* (2000), ont également observé une sensibilité totale de ce vecteur au DDT et à la perméthrine, bien que les doses discriminatoires qu'ils ont utilisées pour la perméthrine furent de 0.25% et de 1%.

Au Mozambique, *An. funestus* s'est révélé résistant aux pyréthriinoïdes (Brooke, 2000). Cependant, des analyses synergistes et biochimiques ont prouvé que cette résistance était le fait d'une désintoxification des pyréthriinoïdes chez les moustiques, due à des oxydases à fonction mixte. Ils ont également trouvé une résistance croisée à l'insecticide propoxur, du groupe des carbamates. Cette résistance d'*An. funestus* aux pyréthriinoïdes a été confirmée par l'étude de Sharp (2001), qui en plus, trouva de hauts niveaux de résistance avec la lambdacyhalothrine.

A Madagascar, où *An. funestus* est le principal vecteur du paludisme, des tests de susceptibilité menés de 1996 à 1999 (Rakotondraibe, 2000), prouvèrent que ce vecteur, autrefois totalement éradiqué (Chauvet, 1973) par

une campagne massive de pulvérisations intradomiciliaires de DDT, était encore sensible aux pyréthriinoïdes et au DDT.

Par contre, en Afrique du Sud, Coetzee (2001) a démontré que ce vecteur est résistant aux pyréthriinoïdes et sensible au DDT. Les résultats de cette étude ont abouti au Programme de Contrôle du Paludisme au Kwazulu/Natal, qui consiste à faire recours à l'utilisation de DDT dans les habitations traditionnelles afin d'endiguer l'épidémie.

Tous les moustiques que nous avons testés étaient de l'espèce *An. gambiae* s.s., sauf 4 spécimens d'*An. arabiensis*, dont 2 ont survécu après 24 heures d'exposition à la perméthrine. Au Sénégal, Chandre et al. (1999), ont observé une résistance de ce vecteur au DDT. La même étude a signalé une sensibilité d'*An. arabiensis* à la perméthrine à Yaoundé (Cameroun), à Dakar (Sénégal), et à Sebina (Botswana).

Dans les échantillons sensibles aux pyréthriinoïdes, nous avons observé l'effet choc qui assomme rapidement 50% des moustiques avant 15 mn d'exposition. Par contre, parmi les populations résistantes à ces insecticides, notamment à Pimpéréna, ce temps de paralysie a été nettement plus long (de 15 à 20 mn). Avec le DDT, nous avons observé une augmentation marquée du KDT₅₀ (entre 15 et 20 mn) et KDT₉₀, avec une importante diminution de l'effet « knock down » dans les localités où la résistance est forte, notamment en zone exondée.

Chandre et al. (1999), ont également observé une augmentation du KDT₅₀ et du KDT₉₀ dans des échantillons résistants, avec une perte presque totale de l'effet « knock down » là où la résistance était plus forte (Cotonou, au Bénin ; Korhogo et Yao Koffifro en Côte d'Ivoire).

Akogbeto (1999), quant à lui, observa à Malanville (une localité du Bénin), qu'après 15mn d'exposition à la perméthrine, 50% des moustiques tombaient assommés par l'effet de l'insecticide. De même, avec la deltaméthrine, le KDT₅₀ a été aussi rapide : il a été obtenu après 20 mn et le KDT₁₀₀ a été observé après 30 mn. Par contre, avec la deltaméthrine, dans une autre localité du Bénin (Ladji), le KDT₅₀ a été obtenu après 120 mn et KDT₁₀₀ n'a pu être observé. Dans cette même localité à forte résistance, sur un total de 389 moustiques, seuls 28 sont tombés après 120 mn d'exposition à la perméthrine.

Ces travaux prouvent qu'il existe une relation entre le degré de résistance d'un moustique à un insecticide et le temps que ce moustique met pour réagir au produit. Chandre et *al.* (1999) et Diabaté et *al.* (1999) ont également établi la même relation. Ces études corroborent les observations de Elissa et *al.* (1994), selon lesquelles il existerait à Bouaké (Côte d'Ivoire), une baisse significative de l'effet « knock down » d'*An. gambiae* vis-à-vis de la deltaméthrine et de la lambdacyhalothrine, qui pourrait être interprétée comme un début de résistance.

La recherche du gène *kdr* chez les moustiques testés à la perméthrine et au DDT nous a paru intéressante, car d'une part, la perméthrine est actuellement le seul insecticide préconisé par le PNLP pour l'imprégnation des moustiquaires au Mali et d'autre part, il fallait vérifier l'existence d'une résistance croisée entre la perméthrine et le DDT.

Dans la zone exondée, à Pimpéréna, nous avons observé une présence de 100% du gène *kdr* chez les moustiques testés à la perméthrine. Ce résultat suggère que la mutation des canaux sodium serait le principal mécanisme de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes dans cette localité. De même, la présence de ce gène chez les moustiques testés au DDT suggère l'existence

d'une résistance croisée pyréthriinoïdes–DDT dans cette localité. Koffi et *al.* (2000) ont également observé une résistance croisée d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthriinoïdes et au DDT associée à une résistance au «knock down».

A Pimperena, la fréquence du *kdr* était de 98.2% en 1996 (*unpublished*). Ces taux sont plus bas que ceux que nous avons observés dans notre étude. Ces résultats confirment les observations de Dolo, selon lesquelles la résistance des vecteurs aux insecticides serait en croissance exponentielle dans notre pays (*unpublished*)

Nous avons retrouvé le gène *kdr* uniquement chez les populations Savane de Pimpéréna. En Côte d'Ivoire, Koffi et *al.* (2000) ont également trouvé le gène mutant chez les populations Savane d'*An. gambiae s.s.*, surtout au nord, où la fréquence de mutation *kdr* avait atteint 80 à 95%. Au Burkina Faso, Diabaté (2000) n'a retrouvé la mutation *kdr* ni chez *An. arabiensis* ni chez la forme Mopti. Il explique ce résultat par la faible pression de sélection des insecticides rencontrée chez ces moustiques. Fanello et Della Torre (2001), dans une étude menée sur différents échantillons d'*An. gambiae s.s.* en provenance de faciès écologiques différents, en Afrique occidentale, n'ont retrouvé l'allèle *kdr* que dans les populations «S». Ils n'ont pas retrouvé l'allèle *kdr* parmi les populations «M». Cependant, sur les échantillons provenant du Bénin l'allèle *kdr* était à la fois présent chez les formes moléculaires «S» et «M». Ils ont expliqué ce résultat par l'existence probable d'une hybridation-introgression, c'est à dire, un échange de gènes entre les deux taxons. Cela corrobore les études de Weill (2000).

Au vu de ces résultats, il semble que la mutation *kdr* soit responsable de la résistance des vecteurs du paludisme dans la localité de Pimpéréna, contrairement aux autres. En effet, en zone inondée et également à

Banambani, nous n'avons pas retrouvé la présence du gène mutant alors que certains moustiques étaient résistants à la perméthrine et au DDT lors des tests de bio-essai. Ceci suggère la présence d'autres mécanismes de résistance chez ces vecteurs. Les observations de Guillet (1995), Chandre (2000) et Hemingway (2001) convergent dans ce même sens. Small (2001) propose quant à lui, un moyen efficace pour déceler les différents mécanismes en jeu lors de la résistance d'un vecteur à un insecticide. En effet, les synergistes inversent les mécanismes de résistance métaboliques basés sur des types d'enzymes particuliers. Ainsi, le butoxyde de pipéronyle inverse les mécanismes de résistance à base de monooxygénases (pyréthinoïdes et DDT).

La résistance aux pyréthrinoïdes est un phénomène très grave dans la mesure où elle risque d'hypothéquer l'usage des moustiquaires imprégnées, seule solution opérationnelle de remplacement aux traitements intradomiciliaires. Toutefois, avant de prendre une position alarmiste, il faut déterminer l'extension spatiale de la résistance en zone rurale et étudier dans quelle mesure cette résistance nuit au bon fonctionnement des moustiquaires imprégnées.

C'est pour tenter d'apporter une réponse à cette interrogation que nous avons réalisé des tests de rémanence de la perméthrine sur les moustiquaires.

Les moustiques provenant de la zone rurale de Sélingué étaient sensibles à la perméthrine (97.8% de mortalité). Cette sensibilité a été confirmée par une bonne rémanence (96.4% de mortalité) après 6 mois d'utilisation des moustiquaires. Ce taux de rémanence était cependant plus faible que ceux obtenus par Traoré (1990). En effet, cet auteur avait observé des taux de mortalité variant de 98 à 100% après 5 mois et de 96% après un an d'utilisation des rideaux imprégnés à la perméthrine. Les résultats de Traoré

(*loc. cit.*) étaient similaires à ceux des essais effectués par Loong et *al.* (1985) et Li Zuzi et *al.* (1987), en Asie. Ces derniers ont constaté une rémanence de 95% un an après l'installation des moustiquaires imprégnées. Au Burkina Faso, Darriet et *al.* (1984) observèrent 4 mois après l'installation des moustiquaires imprégnées, une mortalité de 90% chez les vecteurs du paludisme. Ce taux est plus faible que celui que nous avons observé dans notre étude.

Traoré (1990) recommanda que les supports imprégnés d'insecticides fussent intégrés au système national des Soins de Santé Primaires, comme moyen de lutte antipaludique. Son étude prouva en effet, que l'utilisation des supports imprégnés conduisait à une forte diminution des densités anophéliennes, à une réduction considérable de l'agressivité et à une interruption de la transmission à l'intérieur des habitations humaines. Avec un taux de couverture de 80%, l'OMS estime que l'on obtient une protection collective et non plus uniquement une protection individuelle contre le paludisme.

CONCLUSION

8. CONCLUSION

Nos tests de susceptibilité ont été réalisés sur le terrain, dans les conditions naturelles du milieu avec l'avantage d'éviter les modifications physiologiques des femelles d'anophèles élevées à l'insectarium. Les moustiques du complexe *gambiae* testés appartenaient essentiellement à l'espèce *An. gambiae s.s.*. Seuls 4 spécimens d'*An. arabiensis* ont été identifiés. Ce faible nombre n'a pas permis l'exploitation des résultats des tests réalisés à la perméthrine.

En zone exondée, les moustiques étaient tous sensibles à la perméthrine, quoique l'on ait noté une certaine baisse de cette sensibilité par rapport à des observations antérieures de 4 ans.

En zone exondée, *An. gambiae s.l.* était résistant à la perméthrine comme dans la plupart des pays de la sous-région.

Si les populations d'*An. gambiae s.l.* étaient totalement sensibles à la deltaméthrine en zone inondée, elles ont manifesté des degrés différents de sensibilité en zone exondée : résistants à Pimpéréna et sensibles à Banambani. Cette différence de sensibilité serait due à un usage plus important de pesticides à Pimpéréna, zone de culture de coton.

Les populations d'*An. gambiae s.l.* étaient sensibles à la lambdacyhalothrine dans toutes les localités étudiées, même si cette sensibilité était quelque peu réduite à Pimpéréna.

An. gambiae s.l. était sensible au DDT en zone inondée, mais ce vecteur était résistant à cet organochloré en zone exondée. Ceci confirme le constat fait plus haut, à savoir que les zones d'activités agricoles avec utilisation

massive de pesticides sont des facteurs favorables à l'apparition de la résistance des vecteurs aux insecticides.

An. funestus est sensible au DDT et aux trois pyréthrinoïdes testés dans notre étude.

Le KDT₅₀ a été atteint avant 15mn pour les populations sensibles aux pyréthrinoïdes et a été plus long avec le DDT dans les localités de forte résistance.

Le gène *kdr* était présent chez 100% des populations d'*An. gambiae s.l.* à Pimpéréna, en zone exondée. La mutation des canaux sodium serait le principal mécanisme de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes dans cette localité où la présence de ce gène chez les moustiques testés au DDT suggèrerait une résistance croisée pyréthrinoïdes-DDT dans cette même localité.

L'absence du gène mutant en zone inondée et à Banambani, malgré la présence de populations d'*An. gambiae s.l.* résistantes, suggère l'existence d'autres mécanismes de résistance chez ces vecteurs.

La sensibilité des moustiques de la zone rurale de Sélingué a été confirmée par une bonne rémanence après 6 mois d'utilisation des moustiquaires imprégnées de perméthrine.

RECOMMENDATIONS

9. RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude, certaines recommandations s'imposent :

❖ **Au PNLP :**

- Bien que la sensibilité des moustiques soit diminuée aux pyréthriinoïdes, l'effet excito-repulsif de ces insecticides conserve l'efficacité des supports imprégnés.
- Les pyréthriinoïdes peuvent donc continuer à être utilisées pour l'imprégnation au Mali

❖ **Aux chercheurs :**

- Continuer la recherche d'autres mécanismes de résistance afin d'éviter les résistances croisées entre les insecticides
- Déterminer le statut des moustiques dans les localités où la sensibilité est limitée
- Effectuer des tests périodiques de sensibilité pour la détection précoce de la résistance

❖ **Aux populations :**

- Utiliser uniquement les pesticides indiqués par les services habilités à cet effet, afin d'éviter l'utilisation anarchique des pesticides, principal facteur favorisant l'apparition de résistance.

BIBLIOGRAPHIE

10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adasi K., Boakye D., Wilson M., 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Résistance des *An. gambiae s.l.* et ses implications sur le contrôle du paludisme au Ghana.

Ag Iknane A., Diabaté M. A., Le Borgne S., 1996

Plan Quinquennal de Développement Socio-Sanitaire de la Zone Sanitaire de Sélingué : 1990-1994, Analyse de Situation.

Akogbeto M. et Nahum A., Bull Soc Pathol Exot, 1996, 89, 291-298.

Impact des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine sur la transmission du paludisme dans un milieu côtier lagunaire, Bénin.

Akogbeto M., Noukpo N., Ahoueya G., 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Analyse de la résistance des *An. gambiae* aux pyréthriinoïdes et leurs formes moléculaires et chromosomiques, par des méthodes de titrage biologiques de l'OMS et du CDC et par des techniques PCR au Bénin.

Akogbeto M., Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Etat actuel de la résistance aux pyréthriinoïdes chez les vecteurs du paludisme en Afrique occidentale, centre de recherche Médicale Entomologique, Bénin.

Anonyme, 1992

Déclaration mondiale sur la lutte antipaludique, conférence ministérielle d'Amsterdam, OMS.

Anonyme, 1996

Rapport d'une réunion, OMS/CTD/TDR du Siège et Bureau Régional de l'OMS pour l'Afrique, Brazzaville.

Anonyme, 2001

Symposium sur la résistance aux insecticides chez les vecteurs africains du paludisme, Harare, Zimbabwe.

Anonyme, 28-30 September 1998(OMS/CDS/CPC/MAL/98.12) Report of the WHO Informal Consultation

Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and persistence of Insecticides on Treated Surfaces, WHO, Geneva, Switzerland.

Baldet T., Diabaté A., Dabre R., Ido K., Guiguemdé T.R., Chandre F., Hougard J.M., Guillet P., 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Etat de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides au Burkina Faso (Afrique occidentale).

Brooke B. D., Hunt R. H., Kloke G., Koekemoer L. L., Taylor M. E., Small G., Hemingway J., Coetzee M., 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Résistance aux insecticides chez l'*An. funestus* du site de l'usine d'aluminium Mozal, dans la partie sud du Mozambique.

Carnevale P., Robert V., Boudin C., Halna J.M., Pazart L.H., Bull Soc Pathol Exot, 1988, 81 , 832-842

La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthriinoïdes au Burkina Faso.

Carnevale P., Robert V., Molez J.f., Baudon D., 1984 : 3;123-33

Faciès épidémiologiques du paludisme en Afrique sub-saharienne
Etudes médicales.

Chandre F., Baldet T., Hemingway J., Koffi A.A., Tia E., Diabaté A., Yacoubou S., Masendu R., Darriet F., Hougard J.M., Carnevale P., Guillet P., Akogbeto M. 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001.

Usage des insecticides en agriculture et résistance des vecteurs du paludisme en Afrique.

Chandre F., Darriet F., Manga L., Akogbeto M., Faye O., Mouchet J. et Guillet P., Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, recueil d'articles N°1, 77 (3) : 230-234, 1999

Situation de la résistance aux pyréthriinoïdes chez *Anopheles gambiae* sensu lato.

Coetzee M., Loekemoer L. L., Brooke B. D., Hargreaves K., Govere J., Taylor M. E., Hunt R. H., 2001, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001.

Anopheles funestus en Afrique du Sud.

Chauvet G., Rajaonarivelo E., *Cah ORSTOM, Série Entomol Med Parasitol* 1973 ; **11** : 155-167

Modification de comportement d'une espèce et variation de la composition d'une population appartenant au complexe *Anopheles gambiae* pendant et après des pulvérisations d'insecticides intradomiciliaires dans les environs de Tananarive (Madagascar).

Coulibaly M.B., Bah B., Dolo G., Bagayoko M., Sogoba N., Traoré S.F., Sangaré D., Bouaré M., Dao A., Niaré O., Sakai R., touré Y. T., 1998, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001.

Sensibilité/résistance aux insecticides des *Anopheles gambiae s.l.* au Mali.

Coulibaly A., Mémoire de D.E.A. I.S.F.R.A., Bamako, 1982

Sensibilité aux insecticides des vecteurs majeurs du paludisme. Situation actuelle au Mali.

Curtis C. F., *Medical and Veterinary Entomology* (1994) **8**, 107-112

Should DDT continue to be recommended for malaria vector control ?

Darriet F., Robert V., Thovien N. et Carnevale P. (1984) W.H.O./VBC/84-899 (mimeographed document)

Evaluation of the efficacy of Permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vector of malaria

De Mellion (B.), 1934. Publ. South Afr. Inst.med.Pes., 6, 1995.

Observation on Anopheles funestus and Anopheles gambiae in the Transvaal.

Diabaté A., Small G., Hemingway J., Baldet T., Chandre F., Akogbeto M., Koffi A., Yacoubou S., Guillet P., Hougard J.M, 2001, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001.

Analyse des résidus de pesticides dans les gîtes larvaires d'*An. gambiae s.l.*.

Diabaté A., Baldet T., Ido K., Dabiré R. & Guiguemdé T.R. : Sensibilité aux pyréthriinoïdes d'*An. gambiae s.l.* dans les hydro-aménagements au Burkina Faso, , 2001, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Implications opérationnelles dans la lutte contre le paludisme. Laboratoire de parasitologie/Entomologie centre Muraz, Bobo-Dioulasso.

Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Akogbeto M., Guillet P., Guiguemdé T.R. & Hougard J.M., 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001.

Impact des variations spatio-temporelles chez les espèces *An. gambiae* et les formes moléculaires sur l'état de résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT au Burkina Faso (Afrique occidentale).

Diani F., Thèse de Doctorat de Pharmacie, Bamako 1985

Evaluation de la situation sanitaire au Mali.

Dicko A.A, Thèse de Doctorat de Médecine 1995, Bamako, Mali

Epidémiologie de paludisme dans la région de Mopti en vue de l'élaboration d'un programme régional de lutte.

Doumbo O., Thèse de doctorat en Médecine, Université de Montpellier, 1992

Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chloroquinoresistance, Essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systémique des accès fébriles.

Dolo G., Traoré S., Sacko A., Coulibaly M. & Touré Y. T., 2001 (unpublished)

Le contrôle des vecteurs du paludisme au Mali.

EDSM-III/CPS/DNSI/, Juin 2002

Troisième Recensement Général de la Population et de l'Habitat.

Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY , Yao K, Ann Soc Belge Méd Trop, 1993, 73, 291-294

Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroïds in Cote d'Ivoire.

Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier J-Y, Yao K, Cahiers Santé, 1994, 4 : 95 – 99

Sensibilité d'*anophèles gambiae s.l* en Côte d'Ivoire.

Etang J., Manga L., Chandre F., Toto J.C., Guillet P., Fondjo E., Fontenille D., 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Evaluation de la sensibilité des *An. gambiae* au DDT et aux pyréthrinoïdes au Cameroun.

Fanello C., A. Della Torre, 2001, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Distribution du gène *KDR* dans les formes chromosomiques et moléculaires des *An. gambiae s.s.* en Afrique occidentale.

Favia, G., A. Ianfrancotti, L. Spanos, I. Siden-Kiamos, and C. Louis. 2001
Insect Mol Biol **10** :19-23

Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.*

Gillies M. T., & De Meillon B. (1968), *Pub. Sth. Afr. Inst. Med. Res.* **54**, Pp: 343. of Africa South of the Sahara.

The Anophelinae

Guillet P, Chandre F, Akobeto M, Darret F, Faye O, Meeting on Insecticide impregnated Materials, Brazaville, Congo 18-20 Mach 1996

Resistance of *Anopheles gambiae s.l.* to pyrethroids in Africa and the use of impregnated materials.

Guillet P., Mai 1995, ORSTOM / Centre de Montpellier

La résistance des vecteurs aux insecticides.

Guillet P., Chandre F., Mouchet J., Méd Mal Infect. 1997 : 27. N Spécial: 552-7.

L'utilisation des insecticides en santé publique : Etat et perspectives.

Guillet P., Atelier Lutte Antivectorielle, Montpellier, OMS, 31 / 08 – 2 / 09 / 1999

Les principales familles d'insecticides et leurs modes d'action.

Hamon J. et Sales S., Bull. Org. Mond. Santé, 1970,43,757-762.

Etude de la relation existant chez les moustiques adultes, entre la durée d'exposition à un insecticide et la mortalité résultante.

Hamon, J., Eyraud, M., Diallo, B., Dyenkouma, A., Choumara, H.B. et Sylla, O., 1961

Les moustiques de la république du Mali (*Dipt. Culidae*)

Hemingway J., School of tropical Medecine, University of Liverpool, 2002
Biologie of Disease Vectors, Colorado State University

Known Insecticide Resistance Mechanisms in Mosquitoes.

Koïta O., Thèse de pharmacie, P.26, Bamako, 1989.

Contribution à l'étude épidémiologique du paludisme le long du tronçon de la route trans-saharienne du Mali août-septembre 1988.

Koffi A.A., Chandre F., Tia E., Darriet F., Touré M., N'Guessan R., Konan Y.L., Doannio J.M.C., Carnevale P., 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Résistance aux pyréthrinoides chez les populations d'*An. gambiae s.l.* de la Côte d'Ivoire.

Lalèyè GT et Akinotcho RM, Mémoire de fin de cycle, Université Nationale du Bénin, 1996, 83p

Efficacité de deux pyréthrinoides de synthèse sur les vecteurs du paludisme. Etude de la sensibilité et de la rémanence sur les tulles moustiquaires.

Lebel J., 2002

Le dilemme du DDT, bannir ou non : là n'est pas la question.

http://www.idrc.ca/reports/read_article_french.cfm?article_num=850

Loong K.P, Naidu S., Thevasagayam E.S., Cheong W.H., Southeast Asian J Trop Med Public Health 1985 Dec;16(4):554-9.

Evaluation of the effectiveness of permethrin and DDT impregnated bed-nets against *Anopheles maculatus*.

Li Zuzi, Xu Jingjiang, Li Banquan, Zhu Taihua and Li Mingxin (1987). W.H.O. mimeographed document W.H.O./VBC/87-939

Mosquito nets impregnated with deltamethrin against malaria vectors in China.

Martinez-Torres, D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Berge, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur, and D. Pauron. 1998. *Insect Mol Biol* 7:179-84

Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae s.s.*

Masendu Ron, Institut de Recherche Blair, Zimbabwe, 2000, Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

Etat de la résistance aux insecticides parmi les vecteurs du paludisme (complexe *An. gambiae*), au Zimbabwe.

OMS, N°857,1995,Génève.

Rapport d'un groupe d'études de l'OMS Lutte contre les vecteurs du paludisme et autres maladies transmises par les moustiques.

Ranson, H., B. Jensen, J.M. Vulule, X. Wang, J. Hemingway and F.H. Collins. 2000. *Insect Mol. Biol.* 9: 491-497.

Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids.

Razafimahefa Mbolatiana, Thèse de Doctorat en Médecine, Madagascar, décembre 2000), <http://www.madanews.com/full.cfm?IdArticle=4985>

«Moustiquaires imprégnées d'insecticide à Farafangana : quels sont les facteurs influant pour une meilleure utilisation ? »

Sangaré D., Thèse de Doctorat de Spécialité de l'ISFRA, 2000.

Dynamique des populations d'*An. gambiae s.l.*, d'*An. funestus* et de *Plasmodium falciparum* dans le système de transmission par relais du paludisme à Donéguédougou (Arrondissement Central de Kati).

Scott, J. A., W. G. Brongdon, and F. H. Collins 1993, Am J Trop Med Hyg **49** :520-9.

Identificaton of single specimens of the *Anopheles gambiae* complexe by the polymerase chain reaction.

Sharp B., Mohloai P., Casimiro S., Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001

An. funestus au Maozambique

Sinou V., Juin 1998 Thèse de Doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle. *Discipline* : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Nouvelles approches dans la morphogenèse du *Plasmodium* et du trypanosome : Incidences en chimiothérapie.

Small G., Cahiers techniques AFRO,1993, 23, 1

Titrages biologiques pour évaluer la résistance croisée chez les insectes, Université de Caardiff, R-U. Stratégies de lutte contre le paludisme dans la région africaine et étapes pour leur mise en œuvre.

Telly M., Mémoire de fin d'étude, IPR/IFRA Katibougou, 1999

Contribution à l'évaluation de l'effet de l'extrait de Pourghère (*Jatropha curcas*. L) sur des panicules (*Eurystylus marginatus*. O) du sorgho au champ et sur les acridiens (*Cartaloïpus cymbiferus*. Krauss, 1877) au laboratoire.

Traoré M.Y.S., Thèse de Doctorat de 3^{ème} Cycle en Biologie Animale-Ecologie, Option : Entomologie Médicale, 1990.

Utilisation de rideaux imprégnés à la perméthrine dans la lutte contre le paludisme à Tiènèguèbougou (Cercle de Kati).

Traoré S.K., Mémoire de fin d'études, Ecole Nationale Supérieure Bamako, 1986.

Sensibilité des Vecteurs Importants du Paludisme dans une Zone d'inondation du Mali.

Traoré S., Thèse de Doctorat en Médecine, 1993.

Epidémiologie du paludisme en zone de savane Sud-Soudanienne, au Mali : le village de Pimprérena dans la Région de Sikasso, de Juin 1992 à Septembre 1993.

Touré, Y.T., Cah. O.R.S.T.O.M., sér.Ent.Méd. et Parasitol., vol.XX, n°2, 1982 : 125-131

Etude de la sensibilité d'*Anopheles gambiae* senso lacto aux insecticides dans la zone rurale de savane soudanienne au Mali.

Touré Y.T., V. Petrarca, S.F. Traoré, A. Coulibaly, H.M. Maiga, O. Sankaré, M. Sow, M.A. Di Deco et M. Coluzzi. (1994) *Genetica*, **94** 213-223

Ecological genetics studies in the chromosomal form Mopti of *An. gambiae* s.s. in Mali, West Africa.

Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Roberts JM, Mount DI et Mwanfi RW, *Med Veter Entomol*, 1994, 8, 71-75.

Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated betnets and curtains in Kenya.

Weill M., Chandre F., Brengues C., Manguin S., Akogbeto M., Pasteur N., Guillet P. and Raymond M., *Insect Molecular Biology* (2000) **9** (5), 451-455.

The *kdr* mutation occur in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s through introgression.

ANNEXES

ANNEXES 1

TEST INSECTICIDE

Pays :..... Région :.....

Cercle :..... Village :.....

Insecticide :.....Espèce testée :.....

Date du test :.....Période d'exposition (minutes) :.....

Conditions tu test

Période d'exposition	Température		Humidité relative	
	De	A	De	A
Période d'attente				

Résultats du test

	Reprise 1	Reprise 2	Reprise 3	Reprise 4	Test total	Contrôle total
Nbr. De moustiques exposés						
Pas d'insectes assommés après des périodes d'exposition de : *						
5'						
10'						
15'						
20'						
30'						
40'						
50'						
60'						
Nombre tué à la fin de la période d'attente						
Mortalité observée (%)						
Mortalité corrigée (%)						
Espèces survivantes & identifiées						
Mécanisme(s) de résistance **						

* = pour DDT et pyréthriinoïdes ** = si identifié

ANNEXE 2

RESPONSE OF ADULT OR NYMPHAL STAGES OF VECTORS/RESERVOIRS TO DISCRIMINATING DOSAGES OF PESTICIDES

COUNTRY :				REGION :				INVESTIGATORS(S) :					
District													
Locality or village													
Geographical Coordinates	N/S												
	E/W												
Date last sprayed													
Resting site/surface													
Species tested													
Source of sample													
Sex (& physiological stage)													
Adult/Instar													
Date and TIME of test													
Test method : WHO / other													
Exposure method		Top. / Imp. P.	Top. / Imp. P.	Top. / Imp. P.	Top. / Imp. P.	Top. / Imp. P.	Top. / Imp. P.						
Papers impregnated by													
Date impregnated													
Date removed from pack													
Times paper previously used													
Pesticide tested													
Dosage / Concentration used													
Exposure period													
Temperature range (°C)	Exposure period												
	Holding period												
R. humidity range (%)	Exposure period												
	Holding period												
Test group		Contr.	Exper.	Contr.	Exper.	Contr.	Exper.	Contr.	Exper.	Contr.	Exper.	Contr.	Exper.
Number of replicates													
Total number exposed													
Number dead													
% mortality (observed)													
% mortality (corrected)		0		0		0		0		0		0	

PLEASE DO NOT WRITE IN THE SPACE BELOW

Interpretation													
Verified by													
Entered by													
Record number													

WHO / VBC / 1 / 88

RESUME

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : DIARRASSOUBA

Prénom : Fatoumata

Titre : Evaluation du niveau de sensibilité des vecteurs du paludisme au DDT et aux insecticides préconisés pour l'imprégnation des supports au Mali

Année de Soutenance : 2002

Ville de Soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).

Secteur d'intérêt : Santé publique, Lutte antivectorielle, Paludisme

RESUME :

Le paludisme est une maladie parasitaire grave qui tue plus d'un million d'enfants de 0 à 5 ans, chaque année, dans le monde. La lutte antivectorielle, notamment, la réduction du contact homme-vecteur est l'un des axes prioritaires de contrôle de cette maladie. Dans ce cadre, l'OMS recommande la vulgarisation des matériaux imprégnés d'insecticides aux Programmes Nationaux de Lutte contre le paludisme.

Cette stratégie pourrait être dangereusement compromise par le phénomène de la résistance des vecteurs aux insecticides. Cette étude avait donc pour but d'évaluer le niveau de sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides préconisés pour l'imprégnation des supports au Mali. Elle devait par ailleurs, étudier la répartition de l'allèle mutant *kdr* au sein de la population vectrice.

Les tests de sensibilités ont été effectués sur des femelles d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus*, dans les conditions naturelles du milieu. Les populations d'*An. gambiae s.l.* testées étaient composées de 96% d'*An. gambiae s.s.* et de 4% d'*An. arabiensis*.

Le test de rémanence a été réalisé selon le protocole standard de l'OMS, avec des moustiquaires imprégnées de perméthrine.

En zone inondée, tous les vecteurs étaient sensibles à tous les insecticides testés. Par contre, en zone exondée, *An. gambiae s.l.* était résistant à la perméthrine et au DDT. La sensibilité de ce vecteur était réduite à la deltaméthrine et à la lambdacyhalothrine.

Les temps de «knock down» ont été plus rapidement observés en zone inondée qu'en zone exondée, où le niveau de résistance aux insecticides était plus élevé.

Le gène *kdr* n'a été retrouvé qu'à Pimpéréna (zone exondée) et uniquement sur la forme S de l'espèce *An. gambiae s.s.*

L'efficacité des moustiquaires imprégnées après six (6) mois d'utilisation a confirmé la bonne sensibilité des moustiques de la zone rurale de Sélingué à la perméthrine.

Mots clés: Paludisme, lutte antivectorielle, insecticides, rémanence, sensibilité

DESCRIPTIVE CARD**Name :** DIARRASSOUBA**First name :** Fatoumata**Title :** Evaluation of susceptibility of malaria vectors to DDT and to selected pyr  thrinoids for supports impregnating in Mali**Year of defense :** 2002**City of defense :** Bamako**Country of origin :** Mali**Place of deposit :** Library of the Faculty of Medecine, Pharmacie and Dentistry (FMPOS).**Sector of interest :** Public Health, Malaria, antivector fight**Abstract:**

Malaria is a dangerous disease, which kills annually over a million of children less than five (5) year old in the world. Vector control, particularly, reduction of man/vector contact is one of priority methods of controlling this disease.

In this situation, World Health Organization (WHO) recommends popularisation of insecticide impregnated bed nets for malaria control. This strategy can be dangerously impaired by the phenomenon of vector resistance to insecticides.

The objective of this study was then to evaluate the susceptibility of malaria vectors to selected insecticides for supports impregnating in Mali.

Another aim of this work was to study the distribution of the mutant gene *kdr* in vector populations.

Susceptibility tests were carried out with *An. gambiae s.l.* and *An. funestus* females in natural conditions. The population of tested *An. gambiae s.l.* were composed of 96% of *An. gambiae s.s.* and 4% of *An. arabiensis*. Remanence tests were carried out with permethrin impregnated bed nets according to WHO's method.

In flooded zone, the vectors were susceptible to all tested insecticides, but in drought zone, *An. gambiae s.l.* was resistant to permethrin and to DDT. This vector had a reduced susceptibility to deltamethrin and to lambda-cyhalothrin. Knock-down time was shorter in flooded zone than in drought zone, where a high level of resistance to insecticide was observed.

Kdr gene was found only at Pimperena (drought zone) and uniquely in the form S of *An. gambiae s.s.* species.

The efficacy of impregnated bed nets after six (6) months of use confirmed the high susceptibility of mosquitoes to permethrin in the Selingue rural zone.

Key words: Malaria, insecticides, remanence, susceptibility, knock down

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de cette faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et des condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque !